

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

СОЛДАТКІНА ОЛЬГА ВАСИЛІВНА

УДК 543.06+577.15+544.076.32

ДИСЕРТАЦІЯ
ВИКОРИСТАННЯ НАНО- ТА МІКРОРОЗМІРНИХ МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ
РОЗРОБКИ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ СЕНСОРІВ З ПОКРАЩЕНИМИ
АНАЛІТИЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

03.00.20 – біотехнологія

091– біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



О. В. Солдаткіна

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор Дзядевич С.В.

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Солдаткіна О.В. Використання нано- та мікророзмірних матеріалів для розробки електрохімічних сенсорів з покращеними аналітичними характеристиками. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

Розробка сенсорних приладів - це один із сучасних напрямків аналітичної біотехнології. Важливими перевагами біосенсорних методів є висока чутливість, селективність, простота використання і низька ціна аналізу [1].

Успішним напрямком сучасної біотехнології є використання мікро- та нанорозмірних матеріалів. Завдяки своїм унікальним фізичним та хімічним властивостям, такі матеріали використовуються в розвитку біосенсорних технологій для покращення основних робочих характеристик біо- та хемосенсорів. Тому, дана дисертаційна робота присвячена дослідженню можливостей використання деяких мікро- та наноматеріалів з метою розробки нових та вдосконалення вже існуючих електрохімічних сенсорів.

Одним з перспективних матеріалів для модифікації біосенсорів є цеоліти. Цеоліти привертають увагу дослідників завдяки низці своїх унікальних властивостей. Вони є низькотоксичними, хімічно, механічно та термо стабільними, а також стійкими до мікробної деградації. Під час синтезу можна контролювати ряд характеристик цеолітів: змінювати відношення Si/Al, відповідно змінюючи при цьому заряд та ступінь гідрофобності матеріалу; кількість та розмір пор; вбудовувати атоми металів всередину кристалічної решітки, де вони утримуються координаційними зв'язками.

В роботі досліджено різні варіанти створення ферментних біосенсорів з використанням цеолітів та порівняно отримані результати з біосенсорами на основі ферментів, іммобілізованих традиційним методом, а саме – зшиванням ферментів за допомогою глутарового альдегіду. Перший варіант застосування цеолітів при створенні біосенсорів - це коіммобілізація ферментів з цеолітами в складі біоселективного елементу біосенсора. За використання такого методу іммобілізації, було перевірено вплив різних модифікацій цеолітів на характеристики сенсорів на їх основі, в результаті чого було отримано певне покращення чутливості біосенсорів.

Набагато перспективнішим виявився другий варіант застосування цеолітів при розробці біосенсорів, а саме адсорбція ферментів на електрохімічних перетворювачах, попередньо вкритих шаром цеоліту. Було показано можливість використання цеолітів як адсорбентів різних ферментів при виготовленні біосенсорів на основі трьох різних типів перетворювачів: кондуктометричного, амперометричного та потенціометричного. Зокрема, силікаліт (варіант цеоліту) був успішно використаний як ефективний адсорбент для низки ферментів (уреази, рекомбінантної уреази, глюкозооксидази, глутаматоксидази та ацетилхолінестерази). Усі отримані біосенсори мали кращі аналітичні характеристики ніж при застосуванні традиційного методу іммобілізації. Показано, що при застосуванні нового методу іммобілізації на основі адсорбції ферментів на цеолітах можна покращити такі параметри біосенсорів як чутливість до субстрату, швидкість аналізу, відтворюваність, операційну стабільність, лінійний діапазон роботи тощо. Слід підкреслити також переваги самого методу адсорбції ферментів на цеолітах при виготовленні біосенсорів – простоту і швидкість приготування, гарну відтворюваність процедури виготовлення біосенсорів, а також, відсутність необхідності використання токсичних сполук. Усі перераховані переваги є особливо важливими для процесу стандартизації біосенсорів та при подальшому їх масовому виробництві.

Крім того, було продемонстровано ефективне застосування біосенсорів при аналізі реальних зразків сироватки крові, а також високу кореляцію біосенсорних результатів з традиційними методами аналізу, що свідчить про перспективність практичного використання розроблених біосенсорів.

Однією з найбільш важливих аналітичних характеристик будь-якого сенсорного приладу є його селективність, тобто здатність визначати лише одну цільову сполуку, не реагуючи, при цьому, на інші речовини. В електрохімічних амперометричних біосенсорах значною проблемою є окиснення або відновлення ряду електроактивних сполук на поверхні електроду, що може призводити до помилкового сигналу біосенсора. Одним із варіантів щодо запобігання окиснення інтерферуючих речовин на електродній поверхні є нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до поверхні електрода цільову речовину. Мембрана на основі поліфенілендіаміну (ПФД) містить пори, розмір яких є достатнім для проходження низькомолекулярних сполук, зокрема перекису водню, до поверхні електрода, та недостатнім - для проходження більших за розміром речовин. Відомі з літературних джерел методики нанесення ПФД мембрани є складними та суперечливими, а іноді, навіть, суперечать одна іншій.

Тому, одним із завдань даної роботи було порівняти різні методики нанесення поліфенілендіаміну та розробити нову методику нанесення поліфенілендіаміну на амперометричні перетворювачі. Перш за все, було порівняно дві найкращі відомі з літературних джерел методики нанесення поліфенілендіаміну на дискові платинові електроди. Показано, що електрополімеризація *m*-фенілендіаміну за допомогою циклічної вольтамперометрії відбувається простіше, і забезпечує високу відтворюваність та значно кращі властивості додаткової мембрани порівняно з електрополімеризацією при постійному потенціалі. Далі було проведено оптимізацію вибраної методики. Перевірено залежність ефективності ПФД мембран від кількості проведених циклічних вольтамперограм і концентрації *m*-фенілендіаміну. Було встановлено, що вплив інтерферуючих речовин на

роботу сенсора може бути майже повністю усунено шляхом використання трьох циклічних вольтамперограм у 20 мМ розчині *m*-фенілендіаміну. Показано, що така мембрана з поліфенілендіаміну може використовуватись, щонайменше, протягом 2 годин безперервної роботи, і зберігатися не менше 8 діб. При цьому, перетворювач майже не втрачає чутливості до пероксиду водню. Також показано переваги отриманих сенсорів, такі як швидкість і ефективність запропонованої методики нанесення ПФД у порівнянні з існуючими методиками. Показано, що амперометричний перетворювач з нанесеною на його поверхню ПФД мембраною не проявляє чутливості до електроактивних речовин, що містяться у біологічних зразках (аскорбінової кислоти, цистеїну, сечової кислоти та дофаміну), і може з успіхом використовуватись при розробці амперометричних біосенсорів.

На наступному етапі роботи було описано використання каліксаренів з метою створення нових високочутливих і селективних сенсорів. Каліксарени - синтетичні макроциклічні наночастинки, що легко піддаються верхній або нижній ободовій функціоналізації макроциклічного скелету. Через їх здатність до різних взаємодій, мульти-сайтних водневих зв'язків, специфічної зборки і узагальнених електростатичних взаємодій, похідні каліксаренів можуть бути використані в якості селективних елементів у біосенсориці. Тому, було вирішено розробити новий тип хемосенсора на основі каліксарену для визначення L-аргініну. L-аргінін є мультифункціональною амінокислотою, що відіграє ключову роль в підтримці гомеостазу судин і функції ендотелію, і є причетною до патогенезу багатьох серцево-судинних захворювань. Визначення концентрації L-аргініну у сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких захворювань як аргінінемія, бронхообструктивний синдром, туберкульоз легень, рак шлунка та колоректальний рак.

В роботі розроблено та досліджено новий кондуктометричний хемосенсор для визначення аргініну на основі каліксаренової мембрани.

Було визначено оптимальну концентрацію каліксарену у складі селективної мембрани та показано, що відтворюваність сигналів сенсора була високою, з похибкою вимірювання 2,5 %. Окрім того, був проведений аналіз основних робочих параметрів розробленого хемосенсора (шум та дрейф базової лінії, мінімальна границя визначення, чутливість, лінійний діапазон роботи). Хроматографічним методом вивчено утворення каліксарен-аргінінового комплексу, та порівняно з комплексоутворенням каліксарен-інша амінокислота, перевірено селективність розробленого сенсора на основі каліксарена відносно інших амінокислот. Основні аналітичні характеристики розробленого хемосенсора було порівняно з характеристиками двоферментного кондуктометричного біосенсора на основі уреазу та аргінази. Показано, що в залежності від потреб та сфери подальшого застосування сенсора, можна виготовляти або хемосенсор на основі каліксарену, або біосенсор на основі ферментів. Кожен з цих сенсорів може використовуватись для напівселективного визначення аргініну, а також в якості елемента мультисенсора для аналізу амінокислот.

На основі усіх запропонованих в роботі методів формування біо-(хемо)селективних елементів з використанням мікро- і нанорозмірних матеріалів, створено діючі лабораторні прототипи електрохімічних сенсорів, вивчено їхні аналітичні характеристики, і продемонстровано можливість їх роботи з реальними зразками.

Ключові слова: наноматеріали, амперометрія, кондуктометрія, потенціометрія, біосенсор, хемосенсор, фермент, *m*-фенілендіамін, цеоліт, каліксарен, наночастинка.

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

1. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Kasap BO, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. Novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. *Nanoscale Research Letters*.

2017;12(260):1-8. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного біосенсора для визначення глутамату з використанням адсорбції глутаматоксидази на силікаліті)*

2. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Pyeshkova VM, Alekseev SA, Soldatkin OO, Dzyadevych SV. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):594.

(Особистий внесок здобувача: дослідження умов нанесення напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну для зменшення впливу інтерферуючих речовин на роботу сенсорів)

3. Кучеренко ІС, **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ. Адаптація процедури нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові перетворювачі. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017;14(1):48-57. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація процедури нанесення та складу додаткової поліфенілендіамінової мембрани на амперометричні перетворювачі)*

4. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Dudchenko OY, Akata Kurç B, Dzyadevych SV. Development of electrochemical biosensors with various types of zeolites *Applied Nanoscience Int.*2018.doi: 10.1007/s13204-018-0725-9. *(Особистий внесок здобувача: використання цеолітів при виготовленні трьох типів електрохімічних ферментних біосенсорів)*

5. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Cherenok SO, Kalchenko OI, Prynova OS, Sylenko OM, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Conductometric sensor with calixarene-based chemosensitive element for arginine detection. *Chemical Papers* 2018; 72(11):2687–97. *(Особистий внесок здобувача: створення та оптимізація роботи сенсора на основі каліксарена для визначення аргініну)*

6. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Velychko TP, Prilipko VO, Kuibia MA, Dzyadevych SV. Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*. 2018;124:40-46. *(Особистий внесок*

здобувача: розробка біосенсора на основі коїммобілізованих уреаз та аргінази)

Патент на корисну модель:

7. **Солдаткіна ОВ**, Марченко СВ, Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Черенок СО, Пріньова ОС, винахідники; Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, патентовласник. Кондуктометричний сенсор на основі каліксарену для кількісного аналізу аргініну в водних розчинах. Патент України № 129983. 2018 Лис 26. (Особистий внесок здобувача: розробка хемосенсора на основі каліксаренової мембрани)

Тези:

8. **Soldatkina OV**, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B, Dzyadevych SV. Zeolite as a perspective material for amperometric biosensor creation. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 3-4.

9. Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Akata B, Dzyadevych SV. Biosensor based on urease, adsorbed on silicalite. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 4-5.

10. **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Кучеренко ІС, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі уреазы адсорбованої на силікаліті для визначення сечовини. 5-а Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2016 трав. 12-13; Київ. Київ: Компринт; 2016, с. 123-124.

11. Soldatkin OO, Kasap BO, **Soldatkina OV**, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. A novel amperometric glutamate biosensor based on

glutamate oxidase adsorbed on silicalite. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2016), 2016 Aug 24-27; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016, p. 503.

12. Soldatkin OO, Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Dzyadevych SV. Analysis of using various modifications of zeolites in electrochemical biosensors. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2017), 2017 Aug 23-26; Chernivtsi. Kyiv: SME Burlaka, 2017, p. 659.

13. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Kalchenko VI, Kalchenko OI, Cherenok SO, Prynova OS, Dzyadevych SV. Calixarene-based sensor for the arginine determination. 8-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8), 2018 трав. 28-черв. 01; Одеса. Одеса: Астропринт, 2018, с. 119.

14. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Prilipko VO, Kuibida MA, Cherenok SO, Prynova OS, Sylenko O.M, Kalchenko OI, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Comparison of the possibility of using a calixarene based sensor and a two enzymes based biosensor for the arginine analysis. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 2018 Aug 27-30; Kyiv: SME Burlaka, 2018, p. 66.

SUMMARY

Soldatkina O.V. Application of nano- and microscaled materials for the development of electrochemical sensors with improved analytical characteristics.
– Manuscript.

Dissertation for scientific degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D) on a speciality 03.00.20 – biotechnology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The development of biosensors is one of the current trends in analytical biotechnology. Important advantages of biosensor methods are high sensitivity and selectivity, ease of use and low cost of analysis [1]. Today, a very promising tendency in the development of biosensor technologies is the usage of new micro- and nano-sized materials. Due to unique physical and chemical properties, these materials can be used for the regulated improvement of basic working characteristics of biosensors. Therefore, this thesis is devoted to studying the possibility of using some micro- and nanomaterials to create new and upgrade existing electrochemical biosensors.

One of the promising materials for modifying biosensors are zeolites. They attract the attention of researchers due to a number of unique properties. They are low toxic, chemically, mechanically and thermally stable, resistant to microbial degradation. The synthesis of zeolite allows the regulation of their characteristics. It is possible to change the Si/Al ratio, the charge and hydrophobicity of the material, the number and size of pores; the metal atoms can be built into the crystal lattice and held there by the coordination bonds. By changing the Si/Al ratio, it is possible to synthesize zeolites with regulated characteristics. Thus, the charge and hydrophobicity of the material, the number and size of pores can be varied; the metal atoms can be built into the crystal lattice and held there by the coordination bonds.

In the work, different variants of the creation of enzyme biosensors using zeolites were investigated; the obtained results were compared with the biosensors based on the enzyme immobilization by the traditional method of cross-linking with glutaraldehyde. The first option was the coimmobilization of enzymes with zeolites in the bioelement of biosensor. The effect of various modifications of zeolite on the sensor characteristics was evaluated; some improvement in the sensitivity was observed.

The second option of using zeolites in the biosensor development, the enzyme adsorption on the electrochemical transducers covered with a zeolite layer, appeared to be much more promising. It was demonstrated a possibility of using zeolites as adsorbents of various enzymes in the creation of biosensors based on three different types of transducers - conductometric, amperometric and potentiometric.

In particular, silicalite (a variant of zeolite) was successfully used as an effective adsorbent for a number of enzymes (urease, recombinant urease, glucose oxidase, glutamic oxidase and acetylcholinesterase). All biosensors under investigation had better analytical characteristics as compared with the biosensors using traditional method of immobilization. A new immobilization method based on the enzyme adsorption on zeolites was shown to improve such biosensor characteristics as sensitivity to the substrate, speed of analysis, reproducibility, operational stability, linear range of work, etc. Noteworthy, in the biosensors manufacture the method of enzymes adsorption on zeolites is advantageous by a simple and fast procedure, good reproducibility, no need for toxic compounds. It is particularly important for the biosensor standardizing and mass production. Additionally, the developed biosensors were demonstrated to be effective in the real assays of blood serum. A high correlation of the results obtained by biosensor with the data of traditional methods testifies to the suitability of developed biosensors in practice.

One of the most important analytical characteristics of any biosensor is its selectivity, an ability to detect the target substrate with no response to other

substances. In electrochemical amperometric biosensors, a significant challenge is the oxidation or reduction of electrically active compounds on the electrode surface, which can be a cause of wrong results of biosensor measurements.

One of the options to avoid the presence of interfering substances on the electrode surface is the use of additional semipermeable membranes, through which only the target substance can penetrate. The polyphenylenediamine (PPD) membrane has pores, the size of which is sufficient for penetration of low molecular compounds, hydrogen peroxide in particular, to the electrode surface and insufficient - for larger substances. The methods of deposition of the additional PPD-based membrane known from literature are complex; the data presented are sometimes even contradictory. Therefore, one of the tasks of this work was the comparison of different methods of polyphenylenediamine application and the development of a new technique of deposition of PPD film on amperometric transducers. First of all, two methods of polyphenylenediamine application on disk platinum electrodes, which are best known from literature, were compared.

It was shown that the electropolymerization of *m*-phenylenediamine by cyclic voltammetry as compared with electropolymerization at a constant potential is simpler and provides higher reproducibility and significantly better properties of the additional membrane. Next, the optimization of the chosen method was carried out. The dependence of PPD membrane efficiency on the number of cyclic voltammograms and the *m*-phenylenediamine concentration was studied. It was found that the effect of interfering substances on the sensor operation can be almost completely eliminated by using three cyclic voltammograms in 20 mM *m*-phenylenediamine solution. It was also shown that such polyphenylenediamine membrane can be used over not less than two-hour continuous operation, and stored over not less than 8 days. Noteworthy, the transducer almost does not lose its sensitivity to hydrogen peroxide. Additional advantages are high rate and efficiency of the proposed procedure of PPD-membrane deposition compared with the existing techniques. The amperometric transducer with a PPD-membrane

deposited on its surface was shown to be insensitive to the electroactive substances present in biological samples (ascorbic acid, cysteine, uric acid and dopamine); thus, it can be successfully used for the development of amperometric biosensors. At the next stage, the application of calixarenes for the creation of new highly sensitive and selective sensors was investigated. Calixarenes are synthetic macrocyclic nanoparticles, which are easily functionalized at the upper or lower rim of the macrocyclic skeleton. Due to capability of different interactions, multisite hydrogen bonds, specific assembly and generalized electrostatic interactions, the calixarene derivatives can be used in biosensorics as selective elements.

Therefore, a new type of calixarene-based chemosensor was elaborated for the L-arginine determination. Because L-arginine is multifunctional, it plays a pivotal role in maintainance of vascular homeostasis and endothelial function, and is involved in the pathogenesis of a number of cardiovascular diseases. Determination of the L-arginine concentration in serum allows diagnostics and evaluating the course of such diseases as argininemia, broncho-obstructive syndrome, pulmonary tuberculosis, stomach cancer and colorectal cancer. Therefore, in this work a new conductometric chemosensor for the determination of arginine based on a calixarene membrane was developed and investigated. The optimal calixarene concentration in the selective membrane was determined. High reproducibility of the sensor signals was shown, an error of measurement was 2.5%. Key working characteristics of the developed conductometric chemosensor (baseline noise and baseline drift, minimum detection limit, sensitivity, linear range of work) were analyzed. The formation of a calixarene-arginine complex was studied and compared with the calixarene complexation with other amino acids; the sensor selectivity regarding other amino acids was estimated.

The developed chemosensor was compared with the bienzyme conductometric biosensor based on urease and arginase by their analytical parameters. It was shown that either the calixarene-based chemosensor or the bienzyme biosensor can be used depending on the needs and scope of further

application. Each of them is appropriate for semiselective determination of arginine and as an element of the multisensor for the amino acids analysis.

Based on all the methods proposed for the formation of bio(chemo)selective elements using micro- and nanosized materials, the laboratory prototypes of electrochemical sensors were created; their analytical characteristics were studied; the possibility to analyze real samples was demonstrated.

Key words: nanomaterials, amperometry, conductometry, potentiometry, biosensor, chemosensor, enzyme, m-phenylenediamine, zeolite, calixarene, nanoparticle.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1	29
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	29
1.1. Загальні уявлення про біосенсиори.....	29
1.2. Методи включення наноматеріалів до складу біосенсорів	31
1.3. Використання неорганічних НМ при розробці ферментних біосенсорів	32
1.3.1. Наночастинки золота	34
1.3.2. Наночастинки платини	36
1.3.3. Наночастинки срібла	37
1.3.4. Наночастинки паладію	38
1.3.5. TiO_2 нанотрубки	39
1.3.6. Цеоліти та інші нанорозмірні алюмосилікати	40
1.3.7. Неорганічні квантові точки.....	41
1.4. Використання органічних наноматеріалів при розробці ферментних біосенсорів	42
1.4.1. Карбонові нанотрубки.....	44
1.4.2. Вуглецеві квантові точки	45
1.4.3. Графенові квантові точки	46
1.4.4. Графен і його похідні	47
1.4.5. Фулерени.....	48
1.4.6. Каліксарени	49
1.5. Перспективність, тенденції подальшого розвитку в біосенсориці з використанням наночастинок.....	50
РОЗДІЛ 2.....	53
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	53
2.1. Матеріали.....	53

2.2. Термічна модифікація цеолітів.....	57
2.3. Електрохімічні перетворювачі, що використовувались в роботі	58
2.3.1. Амперометричні платинові дискові електроди	58
2.3.2. Планарні амперометричні перетворювачі.....	59
2.3.3. Кондуктометричні перетворювачі на основі золотих гребінчастих електродів	60
2.3.4. Потенціометричні перетворювачі на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ).....	61
2.4. Модифікація поверхні електрохімічних перетворювачів мікро- та наноматеріалами	62
2.4.1. Методика нанесення додаткової мембрани на основі ПФД на поверхню амперометричного перетворювача	62
2.4.2. Покриття чутливої поверхні електрохімічних перетворювачів шаром цеолітів	63
2.4.3. Нанесення каліксарену на золоті гребінчасті електроди кондуктометричного перетворювача.....	63
2.5. Методики іммобілізації ферментів	64
2.5.1. Іммобілізація в БСА-мембрані з використанням парів ГА	64
2.5.2. Адсорбція ферментів на цеолітах.....	65
2.5.3. Коіммобілізація ферментів з цеолітами	66
2.6. Схеми експериментальних установок	66
2.6.1. Вимірювальна установка для проведення амперометричних досліджень	66
2.6.2. Вимірювальна установка для проведення потенціометричних досліджень	68
2.6.3. Вимірювальна установка для проведення кондуктометричних досліджень на основі портативного аналізатора МХР-3	70
2.6.4. Стаціонарна вимірювальна установка для проведення кондуктометричних досліджень.....	71
2.7. Методики проведення аналізу	73

2.7.1. Біосенсорна методика визначення субстратів	73
2.7.2. Традиційний метод спектрофотометричного визначення сечовини.....	73
2.7.3. Спектроскопічний аналіз моно та поліфенілендіаміну	74
2.7.4. Хроматографічний аналіз комплексоутворення каліксарену з аргініном та іншими амінокислотами.....	74
РОЗДІЛ 3.....	76
ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ЦЕОЛІТІВ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ.....	76
3.1. Цеоліти як матеріал для оптимізації біосенсорів	76
3.2. Підходи до використання цеолітів при створенні біосенсорів	77
3.3. Покращення характеристик біосенсорів за рахунок ко-іммобілізації цеолітів і ферментів	78
3.3.1. Вплив різних модифікацій цеолітів Бета в складі біоселективного елементу на роботу біосенсорів	78
3.3.2. Вплив концентрації цеолітів у біомембрані на роботу біосенсора	80
3.3.4. Вплив температурної модифікації Бета-цеолітів на функціонування біосенсорів.....	82
3.3.5. Вплив гідрофобності цеолітів на роботу біосенсора	84
3.4. Адсорбція на цеолітах як альтернативний метод іммобілізації ферментів.....	85
3.4.1. Розробка кондуктометричних біосенсорів на основі адсорбції ферментів на цеолітах.....	85
3.4.2. Розробка амперометричних біосенсорів на основі ферментів, адсорбованих на цеолітах	90
3.4.3. Розробка потенціометричних біосенсорів на основі ферментів, адсорбованих на цеолітах	99
3.5. Підсумки	101
РОЗДІЛ 4.....	104

ПОКРАЩЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ПЕРЕТВОРЮВАЧА ЗА РАХУНОК ВИКОРИСТАННЯ НАНОРОЗМІРНИХ ФЕНІЛЕНДІАМІНОВИХ ПЛІВОК.....	104
4.1. Проблема селективності амперометричних перетворювачів та варіанти її вирішення.....	104
4.2. Дослідження чутливості перетворювача до електроактивних речовин без додаткової мембрани.....	106
4.3. Вплив розведення біологічного зразка при роботі з амперометричними біосенсорами	108
4.4. Вибір оптимального методу нанесення ПФД мембрани на перетворювач.....	110
4.5. Підтверження та оцінка процесу електрополімерізації <i>m</i> -фенілендіаміну на поверхні перетворювача	114
4.6. Підбір оптимальних умов нанесення ПФД мембрани методом циклічної вольтамперометрії	115
4.8. Перевірка можливості тривалого зберігання ПФД мембран	119
4.9. Порівняння отриманих результатів з літературними джерелами.....	120
4.10. Підсумки	122
РОЗДІЛ 5.....	125
РОЗРОБКА ХЕМОСЕНСОРА НА ОСНОВІ КАЛІКСАРЕНУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ	125
5.1. Каліксарен як селективний елемент хемосенсорів.....	125
5.2. Підбір оптимального складу мембрани на основі каліксарену	126
5.3. Дослідження аналітичних характеристик розроблених хемосенсорів..	129
5.4. Дослідження комплексоутворення каліксарену з аргініном та іншими амінокислотами.....	130
5.5. Перевірка селективності розробленого хемосенсора на основі каліксарену	132
5.6. Порівняння характеристик розробленого хемосенсора з біосенсором на основі двох ферментів	133

5.6.1. Принцип роботи двоферментного біосенсора для визначення аргініну.....	133
5.6.2. Оптимізація основних параметрів коїммобілізації уреазы та аргінази.....	134
5.6.3. Визначення відтворюваності сигналу та операційної стабільності ферментного біосенсора.....	138
5.6.4. Вивчення селективності біосенсора	139
5.6.5. Порівняння основних аналітичних характеристик розробленого біосенсора для визначення аргініну.....	140
5.7. Підсумки	142
РОЗДІЛ 6.....	145
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	145
ВИСНОВКИ	154
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	156
ДОДАТОК А.....	175

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АК – аскорбінова кислота

АцХЕ – ацетилхолінестераза

БС - біосенсор

БСА – бичачий сиворотковий альбумін

БуХЕ – бутирилхолінестераза

БШКНТ – багатошарові карбонові нанотрубки

ВЕ – вуглецевий електрод

ВНТ – вуглецеві нанотрубки

ГА – глутаровий альдегід

ГлОД – глутаматоксидаза

ГОД - глюкозооксидаза

ДА – дофамін

ДМСО – диметилсульфоксид

ІСПТ – іон-селективний польовий транзистор

НКЕ – насичений каломельний електрод

КТ – квантові точки

КХВ – квадратно-хвильова вольтаметрія

МДН – метал діелектрик напівпровідник

МЕ – мікроелектрод

МКС - мезопористі кремнієві сфери

НКЕ – насичений каломельний електрод

НМ – наноматеріали

НТ – нанотрубки

НЧ – наночастинка

ОЮ – електрод з оксиду індія-олова

ОШКНТ – одношарові карбонові нанотрубки

ПП – постійний потенціал

ПТ – польовий транзистор

ПФД - поліфенілендіамін

СВЕ – скловуглецевий електрод

СК – сечова кислота

СКЕ – скляний карбоновий електрод

ТЕОС – тетраетоксисилан

ФБ – фосфатний буфер

ХАМ – хроноамперометрія

ЦВ – циклічна вольтамперометрія

ЦВА – циклічна вольтамперограма

ЯМР – ядерно магнітний резонанс

AuE – золотий електрод

НЕРЕС – 4-(2-гідроксиетил) піперазин-1-етансульфонова кислота

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогодні у всьому світі все більше зусиль спрямовано на розробку експресних та точних біоаналітичних методів аналізу для потреб медичної діагностики, спрощення біотехнологічних процесів та екологічного моніторингу довкілля. Біосенсорні методи представляють собою один із перспективних біотехнологічних підходів, адже мають ряд переваг у порівнянні з методами аналізу, що традиційно застосовують для даних цілей. Біосенсори являють собою групу новітніх аналітичних пристроїв, що складаються з біоселективного матеріалу і перетворювача, що знаходяться у тісному контакті [1]. Розробка біосенсорів є актуальним завданням біотехнології, оскільки вони є високо селективними, чутливими, портативними і простішими у використанні у порівнянні з класичними методами аналізу. Не менш важливими перевагами біосенсорів є також їхні вартісні характеристики, які є значно нижчими у порівнянні з майже усіма альтернативними та загальноприйнятими методами.

Спектр використання біосенсорів є досить широким. Передбачається, що у майбутньому біосенсори будуть широко застосовуватись в медицині, сільському господарстві, ветеринарії, для контролю різних біотехнологічних процесів, а також для моніторингу навколишнього середовища. Слід відмітити, що в цих галузях застосування біосенсорів щорічно збільшується приблизно на 30%.

Новим перспективним напрямком біосенсорики є використання нанорозмірних матеріалів різної природи, яким притаманні певні унікальні фізичні та хімічні властивості. Наноматеріали (НМ) — сучасні перспективні речовини з розміром елементів структури 1–100 нм. [2]. Властивості та функції наноматеріалів значно відрізняються від аналогічних матеріалів у макророзмірному стані. При розробці біосенсорів, наноматеріали використовують для покращення основних аналітичних характеристик

біосенсорів, таких як чутливість, лінійний діапазон визначення, селективність, відтворюваність, стабільність, швидкість аналізу тощо. Наноматеріали мають унікальні властивості, зокрема високий рівень співвідношення площа/об'єм. Отже, при необхідності, такі особливості будови наноматеріалів дають можливість значно збільшити площу чутливої ділянки перетворювача для забезпечення більш ефективної адсорбції на ній біологічного матеріалу. Крім того, наноматеріали характеризуються високими реактивністю та електропровідністю, магнітними властивостями, каталітичною активністю, тощо [3].

Активні ділянки та функціональні групи на поверхні наноматеріалів забезпечують їх високу каталітичну та адсорбційну активність, що пояснює їхню популярність як при розробці біосенсорів, так і в інших біотехнологічних методах аналізу [4]

У біосенсорних технологіях застосовують неорганічні наночастинки (метали та їх оксиди, цеоліти, квантові точки тощо) та органічні (каліксарени, фулерени та ін.). Неорганічні наноматеріали характеризуються досить простим процесом синтезу, є каталізаторами деяких електрохімічних реакцій, а також беруть участь у процесі прискорення переносу електронів. Органічні наночастинки характеризуються низкою властивостей, які сприяють підсиленню електрохімічного сигналу та проявляють високу ступінь біосумісності [4]. Це, безперечно, робить їх зручними при розробці електрохімічних сенсорів [5].

При розробці сенсорів можливі різні шляхи використання наночастинок для покращення робочих параметрів сенсорів: вони можуть бути коїммобілізовані разом із біологічною компонентою, або ж інтегровані в поверхню перетворювача. Також, деякі наночастинки можна застосовувати як селективний елемент хемосенсорів. Це забезпечує широкий спектр підходів до вдосконалення аналітичних характеристик біосенсорних пристроїв. Отже, в залежності від поставлених задач, можна контролювано

змінювати необхідні характеристики сенсорів, підібравши відповідний наноматеріал та розробивши процедуру його застосування.

Тому, розробка нових та вдосконалення існуючих методів покращення аналітичних характеристик біосенсорів за рахунок використання нано- та мікроматеріалів є вельми актуальним напрямком аналітичної біотехнології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках проектів: НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних нанокompatитних комплексів» та УНТЦ «Використання функціональних наноматеріалів для сворення біосенсорних кондуктометричних приладів для визначення аргініну» (№ 0116U007099).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала в розробці нових біотехнологічних підходів використання мікро- та нанорозмірних матеріалів для покращення аналітичних характеристик електрохімічних сенсорів.

Для досягнення вказаної мети було поставлено ряд завдань:

- Оцінити можливість та перспективність методики коїммобілізації цеолітів з ферментами при розробці електрохімічних біосенсорів з покращеними аналітичними характеристиками.
- Розробити новий метод іммобілізації біологічного матеріалу на основі адсорбції ферментів на електрохімічних перетворювачах, модифікованих наночастинками цеолітів.
- Розробити методику покращення аналітичних характеристик амперометричного перетворювача за рахунок нанесення додаткової мембрани на основі поліфенілендіаміну.

- Показати принципову можливість створення хемосенсорів на основі каліксаренів для визначення аргініну.
- Створити лабораторні прототипи біо- і хемосенсорів на основі запропонованих методик використання мікро- і нанорозмірних матеріалів та дослідити їхні аналітичні характеристики.

Об'єкт дослідження: біохімічні реакції за участі ферментів, іммобілізованих на поверхню перетворювачів з використанням різних мікро- та наноматеріалів.

Предмет дослідження: електрохімічні ферментні біосенсиори на основі цеолітів; амперометричний перетворювач, вкритий шаром поліфенілендіаміну; кондуктометричний хемосенсор на основі каліксарену.

Методи дослідження: електрохімічні та спектрофотометричні методи дослідження ферментативних реакцій, амперометричний метод, кондуктометричний метод, потенціометричний метод, хроматографічний метод, методи іммобілізації ферменту (ковалентна зшивка та фізична сорбція), статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше показано можливість використання цеолітів у складі електрохімічних біосенсорів на основі низки ферментів (уреаза, глюкозооксидаза, глутаматоксидаза, ацетилхолінестераза, аргіназа) для прямого визначення відповідних субстратів.

Запропоновано новий метод іммобілізації біологічного матеріалу - адсорбцію ферментів на поверхні електрохімічних перетворювачів, модифікованих шаром цеолітів.

Вперше оптимізовано методику нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові електроди, що забезпечує значне зменшення впливу електроактивних інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

Вперше було розроблено кондуктометричний хемосенсор на основі каліксаренової мембрани для селективного визначення аргініну та проведено аналіз основних аналітичних характеристик розробленого сенсора.

Практичне значення одержаних результатів. Створено низку лабораторних зразків електрохімічних сенсорів на основі мікро- та наноматеріалів для визначення глюкози, сечовини, глутамату, ацетилхоліну, аргініну з використанням розроблених в роботі нових підходів покращення аналітичних характеристик сенсорів. Простота і швидкість виготовлення, гарна відтворюваність приготування, відсутність необхідності використання при створенні сенсорів токсичних сполук, поряд з покращеними параметрами самих сенсорів є важливими характеристиками для процесу їх метрологічної атестації, стандартизації та подальшого виробництва.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником складено план проведення досліджень, поставлено ряд завдань, підбрано методи дослідження для виконання поставлених задач і самостійно виконано експерименти, що описані в даній дисертаційній роботі. Автором опрацьовано літературу за темою дисертаційної роботи. Спільно із співавторами було здійснено підготовку статей та тез доповідей до друку у профільних наукових виданнях. Здобувачем самостійно розроблено лабораторні прототипи біосенсорів на основі нанорозмірних матеріалів з удосконаленими основними аналітичними характеристиками.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень були представлені на 6 фахових конференціях: 4 Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Актуальні наукові дослідження в сучасному світі» (21-22 серпня 2015, Переяслав-Хмельницький, Україна); International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2016)» (24-27 серпня 2016, Львів, Україна); 5-а Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звернення та надії» (12-13 травня, Київ, 2016); International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017)» (23-26 серпня 2017, Чернівці, Україна); 8-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (SEMST-8) (28 травня – 1 червня 2018 Одеса,

Україна); International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018)» (27-30 August 2018, Kyiv, Ukraine).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка складається з трьох розділів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який включає 174 найменувань. Робота викладена на 177 сторінках машинописного тексту. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 51 рисунку та представлено в 13 таблицях.

Обговорення та аналіз результатів досліджень проведено з науковим керівником д.б.н., професором Сергієм Вікторовичем Дзядевичем, якому здобувач висловлює вдячність за надану допомогу та велику увагу до дисертаційної роботи.

Дисертантка щиро вдячна с.н.с., к.х.н. Черенку С.О. за допомогу в проведенні хроматографічного аналізу, та с.н.с., к.х.н. Алексеєву С.А. за проведення спектроскопічних досліджень. Також автор виражає подяку н.с., к.б.н. Кучеренку І.С. за допомогу у плануванні і проведенні експериментів стосовно розробки методики нанесення *m*-фенілендіамінової мембрани. Частина експериментальних досліджень по розробці сенсора для визначення аргініну проведено за участю н.с., к.б.н. Марченко С.В., якій дисертантка дуже вдячна за отриманий досвід та надані поради.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні уявлення про біосенсори

Біосенсори – мініатюрні аналітичні прилади, що перетворюють біологічну реакцію в електричний вимірювальний сигнал [1]. Біосенсорні прилади є прикладом «продуктів», створених із застосуванням новітньої біотехнології. Їх можна використовувати для визначення біохімічних аналітів у медицині, кількості шкідливих речовин у харчових продуктах, концентрацій токсичних речовин у навколишньому середовищі, тощо [6–9].

Згідно з визначенням IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), електрохімічний біосенсор - це автономний інтегрований пристрій, здатний надавати кількісну або напівкількісну аналітичну інформацію, використовуючи біологічний розпізнавальний елемент, який знаходиться в прямому просторовому контакті з електрохімічною компонентою (перетворювачем) [10]. Біоматеріал зв'язується або вступає в біохімічну реакцію з цільовим аналітом, а перетворювач забезпечує реєстрацію сигналу і його перетворення в електричну форму. В якості біологічного елемента можуть використовуватись аптамери, ферменти, антитіла, клітини, тканини, нуклеїнові кислоти та ін. [11, 12].

Біосенсори на основі ферментів є найбільш часто використовуваними та найбільш дослідженими порівняно з імуносенсорами, аптамерними сенсорами чи клітинними біосенсорами [4]. Перевагами ферментів є висока афінність до відповідних субстратів, здатність селективно каталізувати біохімічні реакції, висока активність і комерційна доступність.

Імобілізація біологічного матеріалу на поверхню перетворювачів є одним із важливих етапів при створенні біосенсорів, від якого прямо залежить ефективність роботи розроблених приладів. Процес імобілізації біоматеріалу, впливає майже на всі аналітичні характеристики біосенсора

(величину відгуку, форму калібрувальних кривих, чутливість, лінійний діапазон роботи, рівень шуму, відтворюваність та операційну стабільність сигналу тощо). З цієї причини, вдосконалення методів іммобілізації біоматеріалу було і залишається актуальним завданням біосенсорики [13]. Нові перспективи в цьому напрямку відкрилися завдяки досягненням нанотехнологій.

Нанотехнології – сукупність наукових знань, способів і засобів, спрямованого, регульованого синтезу із окремих атомів і молекул різних речовин, матеріалів і виробів із лінійним розміром елементів структури до 100 нм. Продуктами нанотехнологій є наноматеріали (НМ) [14].

Властивості та функції наноматеріалів значно відрізняються від макророзмірних матеріалів [15–19]. Як правило, НМ є більш активними завдяки високій поверхневій енергії [20]. До того ж, наноматеріали мають унікальні властивості, такі як високий рівень співвідношення площа поверхні / об'єм, висока електропровідність, магнітні властивості, каталітична активність тощо [15, 21]. Зокрема, активні ділянки та функціональні групи на поверхні НМ, призводять до високої каталітичної активності та адсорбційної здатності, що робить їх широко використовуваними в біосенсорах [4].

За хімічною будовою НМ можуть бути розділені на органічні та неорганічні. До неорганічних нанорозмірних матеріалів належать метали та їх оксиди, квантові точки, цеоліти тощо; до органічних - вуглецеві НМ, такі як фулерени, карбонові нанотрубки, графен та оксид графену, каліксарени тощо [22].

Протягом останніх десятиліть електрохімічні біосенсори з інтегрованими наноструктурованими матеріалами здобули надзвичайно широкого використання. Завдяки своїм унікальним фізичним та хімічним властивостям наноматеріали можуть бути застосовані для поліпшення адсорбції молекул ферменту, підвищення швидкості відгуку, покращення чутливості, відтворюваності та стабільності біосенсора [23]. У біосенсорах

можна використовувати різноманітні наночастинки, такі як: благородні метали, оксиди металів, напівпровідникові або композитні наночастинки [24].

В огляді літератури розглянуто застосування та вплив різних типів НМ на роботу електрохімічних ферментних біосенсорів, призначених для виявлення забруднювачів навколишнього середовища, токсинів і інших речовин у харчових продуктах, та клінічних маркерів у біологічних зразках. Окрім того, в даному розділі представлено загальне уявлення про останні досягнення біотехнології в галузі біосенсорів, що пов'язані з використанням різноманітних НМ, а також описано переваги та певні обмеження при використанні НМ для аналітичних цілей.

1.2. Методи включення наноматеріалів до складу біосенсорів

НМ можуть бути іммобілізовані на поверхню перетворювача у складі біологічного рецепторного компонента, або ж перетворювач може бути модифікований НМ перед іммобілізацією біоматеріалу. Ферменти можуть бути легко іммобілізовані на наночастинках безпосередньо, оскільки в ферментах є багато функціональних груп, таких як карбоксильні ($-\text{COOH}$), аміногрупи ($-\text{NH}_2$), меркаптогрупи ($-\text{SH}$) та ін [10]. В якості адсорбентів для ферментів можуть виступати НМ, які містять на своїй поверхні гідрофобні або заряджені ділянки, здатні зв'язувати ферменти, або НМ з хімічними групами, які можуть утворювати зв'язки з відповідними групами ферментів. В першу чергу, в якості адсорбентів привабливими є неорганічні мезопористі матеріали, які мають велику площу поверхні кристалу та можуть нести різноманітні хімічні групи, наприклад, силікаліти та мезопористі кремнієві сфери [25].

Можливим є поєднання обох варіантів використання НМ. Наприклад, друкований вуглецевий електрод було модифіковано композитною мембраною, яка містила вуглецеві нанотрубки, нанорозмірний оксид

цирконію, берлінську лазур та полімерну електролітичну мембрану «Нафіон» (фірми Dupont), і паралельно ацетилхолінестеразу, що має велику кількість $-SH$ груп, і була іммобілізована на поверхні магнітних наночастинок Fe_3O_4/Au через ковалентні зв'язки $Au-S$ [26]. При дії зовнішнього магнітного поля, наночастинки з ацетилхолінестеразою вступали в контакт з модифікованим електродом і утворювали біосенсор. Після використання даного біосенсора для аналізу зразку, магнітне поле вимикали, наночастинки з ферментом змивали, а модифікований електрод – використовували повторно для створення нових біосенсорів. Таким чином, вдалося досягти високої чутливості біосенсора до органофосфорного пестициду диметоату. Мінімальна межа визначення становила $5,6 \times 10^{-4}$ нг/мл, а лінійний діапазон – від 1.0×10^{-3} до 10 нг/мл.

Включення НМ до складу біосенсора призводить до наступного:

- Покращення переносу електронів, утворених або використаних в ході ферментативної реакції, між поверхнею перетворювача та ферментом.
- Збільшення чутливої поверхні датчика, завдяки чому можливо іммобілізувати більшу кількість молекул ферментів.
- Покращення стабільності ферментів.
- Каталізу додаткових хімічних реакцій [21].

1.3. Використання неорганічних НМ при розробці ферментних біосенсорів

Найпоширенішими неорганічними НМ є нанорозмірні частинки металів та оксидів металів (TiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZrO_2 , MoO_3 , CeO_2), квантові точки та цеоліти. Завдяки своїм унікальним фізичним та хімічним властивостям, металеві наночастинки здобули широкого використання в біосенсориці [27–29].

Неорганічні НМ відносно просто отримати двома групами методів – фізичними (зазвичай включають дроблення вихідного матеріалу до

нанорозмірних часток) і хімічними (синтез з попередників). При цьому синтез призводить до формування наночастинок з меншою розбіжністю за своїми розмірами та формою. Окрім простоти отримання, до переваг неорганічних НМ належить можливість різноманітних модифікацій поверхні, участь у каталізі хімічних реакцій, прискорення процесу переносу електронів, біосумісність і покращення умов іммобілізації ферментів, що робить НМ зручними при розробці електрохімічних ферментних біосенсорів [5]. Деякі приклади використання неорганічних НМ наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Приклади використання неорганічних НМ при розробці ферментних біосенсорів

Чутливий елемент	Аналіт	Метод визначення	Межа визначення	Зразок	Джерело
1	2	3	4	5	6
Лакказа/AuНЧ/ AuE	Форметанат	КХВ	0,095 мкМ	Манго, виноград	[30]
Тирозиназа/Графен/PtНЧ/СВЕ	Хлорпірифос Профенофос Малатіон	ХАМ	0,2 ppb 0,8 ppb 3 ppb	-	[31]
Глюкозооксидаза/ВНТ/PtНЧ/СВЕ	Глюкоза	ХАМ	6 мкМ	-	[32]
Глюкозооксидаза/PdНЧ/ВНТ	Глюкоза	ЦВ	150 мкМ	-	[33]
Глутаматоксидаза/ВНТ/AuНЧ/AuE	Глутамат	ХАМ	1,6 мкМ	Сироватка крові людини	[34]
Ацетилхолін-естераза/ZnO/SPE	Параксон	ХАМ	0,035 ppm	-	[35]

1	2	3	4	5	6
Ацетилхолін- естераза /Fe ₃ O ₄ НЧ/ВНТ/ ОІО	Малатіон, хлорпіри-фос, монокрото- фос, ендосульфат	ЦВ	0,1 нМ	капуста, цибуля, шпинат, зразки грунту	[36]
Пероксидаза хрону/TiO ₂ НТ	Пероксид водню	ХАМ	0,1 мкМ	-	[37]
Пероксидаза хрону/TiO ₂ НТ	Пероксид водню	Детекція фотоструму	0,7 нМ	-	[38]
Лактатоксидаза/ AgНЧ	Лактат	ХАМ	1 мМ	-	[39]
Тирозиназа/ Квантові точки CdS/хітозан	фенольні сполуки	ХАМ	0,3 нМ	Зразки води	[40]
Холестерол- естераза/холесте- рооксидаза/ квантові точки CdS/хітозан	холестерол і його естерів	ЦВ	0,47 мМ	-	[41]

Примітки: AuНЧ – наночастинки золота; AuЕ – золотий електрод; ВЕ – вуглецевий електрод; ВНТ – вуглецеві нанотрубки; КХВ - квадратно-хвильова вольтаметрія; НТ – нанотрубки; НЧ – наночастинки; ОІО – електрод з оксиду індія-олова; СВЕ – скловуглецевий електрод; ХАМ – хроноамперометрія; ЦВ – циклічна вольтаперометрія/

1.3.1. Наночастинки золота

Наночастинки золота широко використовуються при створенні ферментних біосенсорів. Зокрема, це пов'язано з можливістю утворення

міцних тілових зв'язків між органічними речовинами та поверхнею наночастинок [21].

Вченими було запропоновано біосенсор для визначення органофосфорного пестициду форметанату, на основі лаккази, іммобілізованої на золотому електроді, що був модифікований електрохімічно осадженими наночастинками золота [30]. Детекція базувалася на інгібуванні активності лаккази пестицидом. Біосенсор виявився чутливим до пестициду, нижня межа визначення складала 95 нМ, і був успішно використаний для визначення даного пестициду у фруктах.

Розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення пероксиду водню на основі пероксидази хрину, іммобілізованої в плівці з хітозану з та без золотих наночастинок розміром 11 нм [42]. Цікаво, що додавання наночастинок зменшило відгук кондуктометричного біосенсора, що пояснювалось авторами різницею в окисних станах золотих наночастинок і активного центру пероксидази хрину.

Описано потенціометричний біосенсор для визначення пестициду гліфосату на основі уреазы, іммобілізованої із золотими наночастинками розміром 2,54 нм [43]. Гліфосат інгібував уреазу, що призводило до зменшення відгуку амоній-чутливого іон-селективного електроду. Лінійний діапазон визначення гліфосату становив 0,5-50 ppm, а мінімальна межа визначення – 0,5 ppm.

Нещодавно було запропоновано біосенсор для визначення активності протеїнкінази А на основі пероксидази хрину, IgG і золотих наночастинок [44]. Використання наночастинок дозволило знизити робочий потенціал до 0,08 В.

При зміні діаметра золотих наночастинок внаслідок агрегації або зростання під час синтезу, відбувається зміна оптичних властивостей їх суспензії (збільшення адсорбції світла з довжиною хвилі від 400 до 700 нм, що супроводжується зміною забарвлення). Це явище можна використовувати для візуальної детекції певної реакції. Зокрема,

запропоновано біосенсор для колориметричного визначення інгібіторів ацетилхолінестерази [45]. При відсутності інгібіторів, фермент каталізував розщеплення ацетилтіохоліну на оцтову кислоту та тіохолін. Останній відновлював AuCl^4 , що призводило до збільшення діаметра золотих наночастинок, а також, зміни кольору суспензії зі слабо рожевого до фіолетового. За наявності у зразку інгібіторів ацетилхолінестерази, зростання золотих наночастинок розміром 2-3 нм не відбувалось і колір не змінювався.

1.3.2. Наночастинки платини

Платинові наночастинки вирізняються від наночастинок інших металів своєю здатністю каталізувати розщеплення пероксиду водню (H_2O_2) – поширеного продукту окисних реакцій. Внаслідок окиснення чи відновлення пероксиду водню утворюються або поглинаються електрони, що реєструється амперометричними методами. Пероксид водню розкладається і спонтанно, але каталізатор дозволяє значно прискорити цю реакцію і збільшити відгук біосенсора. Такою ж каталітичною активністю володіють і звичайні платинові електроди, але перевагами наночастинок є значно більша площа поверхні і більша кількість каталітичних сайтів. Модифікація електродів наночастинками платини може проводитись шляхом хімічного відновлення, електрохімічного та фотохімічного осадження сполук платини (зазвичай PtCl^{6-}). Вибір методу синтезу наночастинок буде впливати на їх хімічну інертність, стійкість, низький фоновий струм, та каталітичні властивості [46–48].

Тому, запропоновано багато амперометричних біосенсорів, які у своєму складі містять ферменти-оксидази і платинові наноматеріали.

Наприклад, було порівняно біосенсори для визначення глюкози на основі глюкозооксидази і алмазних мікрОВОЛОКОН, легованих бором, без та з

додаванням платинових наночастинок, і показано значне збільшення чутливості біосенсора при наявності наночастинок [49].

Описано амперометричний біосенсор на основі глюкозооксидази, іммобілізованої разом з нанокompозитом на основі платинових наночастинок та SnS₂ [50]. За твердженням авторів, використання нанокompозиту покращувало пряму передачу електронів між ферментом та поверхнею скловуглецевого електроду, і дозволило використати потенціал $-0,4$ В відносно НКЕ. Біосенсор мав два лінійних діапазони ($0,1-1,0$ мМ та $1,0-12$ мМ), а нижня межа визначення глюкози становила $2,5$ мкМ.

Хоча платинові наночастинок в першу чергу корисні для амперометрії, було описано потенціометричний біосенсор для визначення сульфідів на основі сульфідоксидази, іммобілізованої в плівці з поліпірролу разом з платиновими наночастинокками [51]. Біосенсор був дуже чутливим до субстрату – мінімальна межа становила $12,4$ нМ, лінійний діапазон – $0,75-65$ мкМ, а час відгуку $3-5$ с.

1.3.3. Наночастинокки срібла

Застосування срібних наночастинок практично таке саме, як і в наночастинок більшості інших металів – забезпечення високої провідності матриці, та посилення електрохімічного сигналу.

У роботі [52] було розроблено амперометричний ферментний біосенсор для визначення сечовини на основі уреазі, іммобілізованої в композитній матриці з поліаніліну, полівінілацетату та срібних наночастинок стабілізованих у полівініловому спирті. Для порівняння було досліджено характеристики сигналу біосенсора без використання таких срібних наночастинок. Було встановлено, що при додаванні срібних наночастинок форма циклічної вольтамограми змінювалась і катодний пік при додаванні сечовини ставав значно виразніший, що дозволяло точніше визначати концентрацію сечовини.

Описано амперометричний біосенсор на основі лактатоксидази і срібних наночастинок синтезованих з фенілгідазином, який призначено для визначення лактату у виділеннях поту людини [39]. Біосенсор вирізнявся гнучким електродом і мав лінійний діапазон визначення лактату 1-25 мМ, що співпадає з можливими концентраціями субстрату в зразках. Слід відмітити, що біосенсор працював при досить високому робочому потенціалі 0,65 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, а вплив аніонних інтерферуючих речовин усувався за рахунок нанесення додаткової зарядженої мембрани «Нафіон».

З іншого боку, при розробці амперометричного біосенсора на основі лаккази було показано, що додавання до складу біосенсора високої концентрації срібних наночастинок призводить до зменшення чутливості в 2390 разів [53].

1.3.4. Наночастинки паладію

Наночастинки паладію в останній час привертають все більше уваги не тільки завдяки електронним властивостям та каталітичній активності, а й завдяки їх меншій вартості у порівнянні з наночастинками срібла чи платини [22]. Крім того, подібно до платини, наночастинки паладію здатні каталізувати реакції за участю пероксиду водню. Так, нещодавно було показано, що скловуглецевий електрод, модифікований наночастинками паладію розміром 9 нм, ефективно відновлює пероксид водню при потенціалі -0,12 В, що може бути корисним при розробці амперометричних біосенсорів на основі ферментів-оксидаз [54]. Межа визначення пероксиду водню становила 0,34 мкМ. Аналогічно було запропоновано сенсор на основі відновленого оксиду графену, модифікованого паладієвими наночастинками, який був придатним для визначення пероксиду водню при потенціалах від -0,6 до +0,8 В, лінійний діапазон до 12 мМ, і межу визначення в 2,5 мкМ [55]. В одній з небагатьох робіт було порівняно вплив

наночастинок різних металів (золото, платина, родій та паладій) на роботу ферментного біосенсора, а саме, біосенсора на основі супероксиддисмутази для визначення іонів алюмінію [56]. Було показано, що найбільша чутливість біосенсора спостерігалась саме при використанні паладієвих наночастинок, мінімальна межа визначення при цьому становила 2 мкМ.

Зазвичай, паладієві наночастинок використовуються не самостійно, а у комбінації з іншими НМ. Таким прикладом є запропонований біосенсор для визначення глюкози на основі глюкозооксидази, паладієвих наночастинок і БШКНТ [57]. Діапазон можливих робочих потенціалів складав від -0,2 до -0,5 В. Також було перевірено додавання золотих наночастинок до складу біосенсора, що дозволило збільшити тривалість роботи біосенсора на 2 тижні. Біосенсор було застосовано для визначення глюкози в меді та сироватці крові. Схожий біосенсор було запропоновано з використанням паладієвих наночастинок, графену і хітозану [58].

1.3.5. TiO_2 нанотрубки

Нанотрубки з диоксиду титану мають фізичні, оптичні та електричні характеристики, які нещодавно привернули увагу до їх використання у виготовленні ферментних біосенсорів. Наявність великої кількості нанопор та внутрішньої порожнини збільшує площу активної поверхні нанотрубок. До інших властивостей нанотрубок належать хімічна стабільність, нетоксичність та здатність до гарного переносу заряду крізь усю структуру трубки. Ці властивості роблять нанотрубки з TiO_2 потенційним матеріалом для іммобілізації біомолекул при виготовленні ферментних електрохімічних біосенсорів [37].

Наприклад, було використано композитний матеріал на основі титанових нанотрубок і поліаніліну для іммобілізації глюкозооксидази [59]. Біосенсор характеризувався низькою межею визначення глюкози (0,5 мкМ) і динамічним діапазоном визначення глюкози – 10 - 2500 мкМ. Втім, дані

характеристики не є суттєво кращими за інші біосенсори на основі глюкозооксидази, які не використовують наноматеріали.

Запропоновано фотоелектрохімічний біосенсор для визначення пероксиду водню на основі пероксидази хрину і масиву TiO_2 нанотрубок, вкритих шаром полідофаміну [38]. Біосенсор мав високу чутливість і селективність, мінімальна межа визначення субстрату становила 0,7 нМ, а діапазон визначення – від 1 нМ до 50 мкМ.

1.3.6. Цеоліти та інші нанорозмірні алюмосилікати

Відомо декілька типів нанорозмірних алюмосилікатів, зокрема цеоліти і наноцеоліти, мезопористі кремнієві сфери, та ін. [60, 61]. Цеоліти, в свою чергу, поділяються на Бета, А, Y, LTA, та ін. Загальною властивістю наночастинок є високо впорядкована структура із складною системою пор та каналів, в основі якої лежить кристалічна ґратка з атомів алюмінію та силіцію (інколи лише з силіцію). Це дає можливість значно збільшити площу поверхні кристалу, на якій можуть адсорбуватися ферменти [62]. Можливо проводити різні варіанти модифікації поверхні наночастинок для покращення іммобілізації ферментів [63]. Найпоширенішою модифікацією є приєднання до поверхні різних функціональних молекул, які містять карбоксильні групи, аміногрупи та ін. Така модифікація посилює електростатичні зв'язки між наночастиною і ферментом і дозволяє утворювати міцні ковалентні зв'язки, наприклад між карбоксильними групами на наночастиці та аміногрупами в складі ферментів. Крім того, були описані різні варіанти наночастинок з інтегрованими в їх структуру іонами металів.

При розробці електрохімічних ферментних біосенсорів найважливішими є адсорбційні властивості цеолітів, які дозволяють використовувати їх при іммобілізації ферментів. На основі різних типів цеолітів на сьогоднішній день були створені амперометричні,

потенціометричні і кондуктометричні біосенсиори з використанням таких ферментів: глюкозооксидази [64–66], уреази [67–70], ацетилхолінестерази [71], бутирилхолінестерази [72], креатиніндеїмінази [73] та ін. Використання цеолітів в біосенсорах дозволяє спростити методику іммобілізації і відмовитись від токсичних реагентів типу глутарового альдегіду. Крім того, була показана краща відтворюваність приготування біосенсорів при використанні адсорбції. В деяких роботах чутливість біосенсорів на основі цеолітів була збільшена на 20-30%.

1.3.7. Неорганічні квантові точки

Квантові точки є напівпровідними нанорозмірними кристалами з унікальними оптичними властивостями [74]. Вони можуть складатися як з неорганічних матеріалів, так і з карбону чи графену. Передусім, квантові точки використовуються як флуорофори для генерації світла, тому їх застосування в електрохімічних ферментних біосенсорах є не дуже доцільним. Втім, в декількох випадках вони все ж використовувались.

Запропоновано фотоелектрохімічний біосенсор на основі глюкозодегідрогенази, іммобілізованої на електроді, вкритому квантовими точками з ZnS та CdS і багаторашовими карбоновими нанотрубками [75]. Біосенсор був придатний для визначення глюкози в амперометричному та фотоамперометричному (при опроміненні світлом) режимах, а наноматеріали взаємодіяли з утвореним в ензиматичній реакції НАДН і генерували відгук біосенсора. При фотоамперометричних вимірюваннях спостерігалось покращення нижньої межі визначення глюкози (з 6 до 4 мкМ), у порівнянні зі звичайною амперометрією. В іншій роботі описано амперометричний біосенсор для визначення фенольних сполук на основі тирозинази, іммобілізованої в композитній матриці з квантових точок (CdS) та хітозану [40]. Біосенсор мав широкий лінійний діапазон визначення катехолу (від 1 нМ до 100 мкМ) і нижню межу визначення в 0,3 нМ, що, на

думку авторів, пояснювалось використанням при іммобілізації ферменту згаданого нанокompозиту з високою пористістю, гідрофільністю та біосумісністю.

Запропоновано амперометричний біосенсор для визначення концентрації холестеролу і його естерів, створений на основі двоферментної системи холестеролестераза/ холестеролоксидаза, яку було іммобілізовано в композитну матрицю з квантових точок (CdS), та хітозану [41]. Автори вважають, що квантові точки виступали посередниками при переносі електронів між активними центрами ферментів і електродом. Також автори припускали орієнтовану іммобілізацію ферментів біля поверхні квантових точок, що пришвидшувало процес переносу зарядів між квантовими точками та ферментами. Участь квантових точок (CdTe-CdS) у переносі електронів в чутливому шарі біосенсора припускали автори і іншої роботи [76].

Запропоновано фотоелектрохімічний біосенсор для визначення раково-ембріонального антигену на основі антитіл і пероксидази хрому [77]. В присутності антигену, пероксидаза опинялась біля поверхні електроду і каталізувала багатоступеневу реакцію, що призводила до утворення CdS квантових точок на поверхні оксиду графену. При дії світла, точки генерували фотострум, який детектувався як сигнал біосенсора. Даний біосенсор мав широкий лінійний діапазон визначення - від 2,5 нг/мл до 50 мкг/мл з нижньою межею визначення - 0,72 нг/мл.

1.4. Використання органічних наноматеріалів при розробці ферментних біосенсорів

Органічні НМ представлені КНТ [78], графеном [79], фулеренами [80], каліксаренами [81], різновидами органічних квантових точок, тощо, і широко використовуються для розробки електрохімічних біосенсорів внаслідок їх різноманітних властивостей, які призводять до підсилення

електрохімічного сигналу (табл.1.2). Крім того, органічні наноматеріали, як і неорганічні, мають високу біосумісність [4].

Таблиця 1.2

Приклади використання органічних НМ при розробці ферментних біосенсорів

Чутливий елемент	Аналіт	Метод визначення	Межа визначення	Зразок	Джерело
1	2	3	4	5	6
ГОД/КНТ/муцин	Глюкоза	ХАМ	3 мкМ	Плазма крові людини	[82]
Пероксидаза хрому/КНТ	Пероксид водню	ЦВ	22 нМ	-	[83]
Уреаза/БШКНТ	Сечовина	ХАМ	30 мкМ	Плазма крові	[84]
Лізиноксидаза/БШКНТ/SnO ₂ /графен/хітозан	Лізін	ХАМ	0,15 мкМ	Дієтичні добавки	[85]
Лаккази/графенові і квантові точки	Епінефрин	ЦВ	83 нМ	Фармакологічні зразки	[86]
Тирозиназа/оксид графену	Фенольні сполуки	ХАМ	30 нМ	Водо-провідна вода	[87]
Пероксидаза сої/відновлений оксид графену	Пероксид водню	ХАМ	50 нМ	Розчин для контактних лінз	[88]
ГОД/відновлений оксид графену/Fe ₃ O ₄	Глюкоза	КХВ, ХАМ	-	-	[89]

1	2	3	4	5	6
Уреаза/ фулерен C ₆₀ /полі-н- бутилакрилат	Сечовина	Потенціо- метрія	42 мкМ	Сечовина	[90]

Примітки: КХВ - квадратно-хвильова вольтаметрія; ХАМ - хроноамперометрія

1.4.1. Карбонові нанотрубки

Карбонові нанотрубки (КНТ) належать до одних з найпоширеніших НМ, які застосовуються в електрохімічних ферментних біосенсорах. КНТ представляють собою трубки із згорнутих листів графену, які вирізняються високою електричною провідністю, міцністю, великою площею поверхні. Також, при розробці біосенсорів важливими є біосумісність і сумісність з іншими НМ та матеріалами електродів [22]. В першу чергу, важливими є електропровідні властивості КНТ, завдяки яким, значно покращується перенос заряду між ферментами і електродом і відповідно збільшується чутливість і швидкість реакції біосенсора. КНТ класифікують як одношарові (ОШКНТ) і багатшарові (БШКНТ), в залежності від числа згорнутих у трубку листів графену. Обидва типи КНТ використовують в біосенсорах, але в основному, використовуються саме багатшарові КНТ.

Однак, щойно синтезовані КНТ мають низьку розчинність у воді, відповідно до чого їх складно поєднувати з ферментами, які зазвичай розчиняють саме у водних розчинах. Для поліпшення розчинності та біосумісності КНТ функціоналізують карбоксильними чи аміногрупами, або ж використовують у комбінації з іншими матеріалами, такими як полімери або наночастинки металів. [23]. Функціоналізовані КНТ зберігають високу електропровідність та механічну стійкість не-модифікованих КНТ, але вже можуть утворювати суспензії у водних розчинах і взаємодіяти з ферментами

через функціональні групи. Це дає можливість розробки високочутливих електрохімічних біосенсорів на основі КНТ.

Описано велику кількість амперометричних біосенсорів на основі ГОД і КНТ. Наприклад, створено біосенсор, в якому ГОД іммобілізовано шляхом поперечного зшивання глутаровим альдегідом з додаванням муцину і КНТ. Показано, що без КНТ біосенсор мав меншу чутливість і більший час аналізу [82]. В іншій роботі також показано, що використання БШКНТ, модифікованих аміногрупами, при іммобілізації ГОД зшиванням глутаровим альдегідом, розширює лінійний діапазон визначення глюкози і збільшує чутливість біосенсора [91]. Запропоновано біосенсор на основі ГОД і БШКНТ, модифікованих поліаніліном [92], а також на основі ГОД, ОШКНТ і термічно розширеного графіту [93].

Окрім ГОД, було використано і інші ферменти разом з КНТ для створення біосенсорів. Нещодавно описано біосенсор на основі пероксидази хрому і КНТ, який вирізняється лінійним діапазоном визначення пероксиду водню в області низьких концентрацій – від 0,1 мкМ до 120 мкМ [83]. Використано БШКНТ разом з провідним полімером полі-*o*-толуїдином для іммобілізації уреазу при створенні біосенсора, чутливого до сечовини [84]. Біосенсор мав широкий діапазон визначення субстрату – від 0,1 до 11 мМ, що практично повністю покриває можливі концентрації сечовини у зразках крові, але нижня межа визначення була відносно високою (30 мкМ). Також КНТ використовували при створенні біосенсорів на основі лаккази [94], пероксидази [95] лізиноксидази [85], та низки інших ферментів.

1.4.2. Вуглецеві квантові точки

Вуглецеві квантові точки, або просто вуглецеві точки, є нанорозмірними структурами з карбону [96]. Вони є досить маленькими (зазвичай розміром в декілька нанометрів), хімічно інертними, придатними до різноманітних модифікацій поверхні, біосумісними, і дешевими. Втім,

найбільшу увагу привертають їх фотолюмінесцентні властивості. Було розроблено велику кількість оптичних (в першу чергу флуоресцентних) біосенсорів з вуглецевими точками, які знаходяться поза межами даного огляду, але були описані в інших роботах [97–99]. Нами виявлено лише один електрохімічний ферментний біосенсор, який використовує вуглецеві квантові точки. Це амперометричний біосенсор для визначення пероксиду водню на основі пероксидази хрину і вуглецевих точок, які були нанесені на поверхню скловуглецевого електроду [100]. Точки містили на своїй поверхні аміногрупи і були використані як матриця для іммобілізації ферменту. Розмір точок становив $2,8 \pm 0,5$ нм. Біосенсор виявився дуже чутливим, з мінімальною межею визначення у 1,8 нМ і лінійним діапазоном 5 - 590 нМ.

Також, описано сенсор на основі вуглецевих точок, модифікованих магнетитовими частинками. Такий сенсор був здатний визначати НАДН в діапазоні від 0,2 до 5 мкМ [101]. Використання даних наночастинок може бути корисним при розробці електрохімічних біосенсорів на основі ферментів, які продукують або використовують НАДН.

1.4.3. Графенові квантові точки

Графенові квантові точки є нанорозмірними листами графену, які володіють тими ж властивостями, що й інші квантові точки (біосумісність, низька токсичність, фотостабільність, відмінна флуоресценція, висока площа поверхні). Вони досить рідко використовуються в звичайних електрохімічних біосенсорах. Описано амперометричний біосенсор для визначення епінефрину на основі лаккази, іммобілізованої з графеновими квантовими точками на поверхні скловуглецевого електроду [86]. Біосенсор характеризувався лінійним діапазоном від 1 мкМ до 120 мкМ і нижньою межею визначення в 83 нМ, і був успішно використаний для детекції епінефрину у фармацевтичних зразках. Була показана відсутність впливу інтерферуючих речовин (аскорбінової і сечової кислот, цистеїну, глутатіону,

і триптофану) на відгуки біосенсора, що свідчить про високу селективність біосенсора.

1.4.4. Графен і його похідні

Графен - це перший матеріал, товщина якого дорівнює одному атому, що був ізольований у природі. Він є самозбірним листом з сотоподібно розміщених атомів карбону з дуже високою площею поверхні, відмінною електричною провідністю, високою механічною жорсткістю і теплопровідністю [102]. За більшістю з цих параметрів графен значно перевищує КНТ [103].

Велика площа поверхні графену збільшує кількість ферментів, яку може бути іммобілізовано на певній площі. Графен також підвищує прямий перенос електронів між ферментами та електродами через його високу провідність [104]. Втім, подібно до КНТ, графен є практично нерозчинним у воді і багатьох інших розчинниках. З метою збільшення гідрофільності у структуру графену вводять додаткові атоми азоту, або ж використовують оксид графену, який відносно легко утворює стабільні дисперсії у водному середовищі [105]. З іншого боку, включення хімічних груп, які містять кисень, значно погіршує електропровідні властивості графену, і тому оксид графену відновлюють, зменшуючи кількість кисень-вмісних груп і досягаючи балансу між електропровідними властивостями і розчинністю.

Описано амперометричний біосенсор на основі тирозинази і оксиду графену для визначення фенольних сполук [87]. Спершу скловуглецевий електрод модифікували оксидом графену, після чого до вільних гідроксильних груп було приєднано біфункціональний агент – глутаровий альдегід. Іншим кінцем глутаровий альдегід утворював ковалентний зв'язок з тирозиназою. Лінійний діапазон визначення катехолу складав 50 нМ – 50 мкМ, а нижня межа визначення – 30 нМ.

Запропоновано біосенсор на основі ацетилхолінестерази і польового транзистора, модифікованого відновленим оксидом графену [106]. Такий біосенсор було використано для визначення активності ацетилхолінестерази, а також її інгібіторів – ліків донепезилу і рівастигміну.

Для визначення пероксиду водню запропоновано біосенсор на основі пероксидази сої і відновленого оксиду графену [88]. За рахунок наноматеріалу вдалося зменшити робочий потенціал до $-0,09$ В відносно Ag/AgCl , і досягти нижньої межі визначення в 50 нМ. Наявність потенційних інтерферуючих речовин (аскорбінової і сечової кислот, дофаміну) не впливала на визначення пероксиду водню.

Запропоновано біосенсор для визначення глюкози на основі глюкозооксидази, адсорбованої на нанокompозиті з відновленого оксиду графену і наночастинок Fe_3O_4 розміром 50 нм [89]. Автори показали, що застосування нанокompозиту в 4 рази покращило провідність поверхні електроду. Лінійний діапазон визначення глюкози становив $0,5$ - 10 мМ. При робочому потенціалі $-0,4$ В відносно Ag/AgCl , біосенсор не був чутливим до дофаміну, аскорбінової та сечової кислот.

1.4.5. Фулерени

Фулерени – це замкнуті кулеподібні молекули, в основі структури яких лежить 5-кутна «сота» з атомів карбону. Фулерени подібні до КНТ і графену, але мають по 6 атомів карбону в складі мономеру. Висока провідність і велика площа гідрофобної поверхні, на якій легко адсорбуються органічні молекули, роблять фулерени перспективними для використання в якості адсорбентів і медіаторів у складі електрохімічних біосенсорів для підсилення переносу електронів, утворених внаслідок біокаталітичної реакції між ферментами та електродом [107, 108]. Фулерени позначаються за кількістю атомів карбону в молекулі, наприклад C_{60} – фулерен з 60 атомів карбону. Найчастіше використовуються фулерени C_{60} та C_{70} .

Фулерени використовуються в електрохімічних ферментних біосенсорах значно рідше, аніж КНТ та похідні графену, незважаючи на високу подібність між цими наноматеріалами. Фулерени C_{60} та C_{70} були використані як носії для аскорбатоксидази при створенні біосенсорної системи для визначення аскорбінової кислоти та фенолів [109]. Виявилось, що на поверхні фулеренів іммобілізується значно більше молекул ферменту, аніж на одно- та багат шарових КНТ. В іншій роботі фулерен C_{60} використовувався як носій уреазі при розробці потенціометричного біосенсора для визначення сечовини [90]. Кон'югат фулерену і уреазі було захоплено у полімерну мембрану, що забезпечило відмінну стабільність уреазі і міцність її іммобілізації, тому відгуки біосенсора зменшились всього на 5% через 140 діб зберігання в сухому вигляді при $+4^{\circ}\text{C}$.

Прикладами інших біосенсорів з використанням фулеренів є біосенсор на основі лаккази для визначення поліфенолів у вині [108], біосенсор на основі глутатіонредуктази для визначення глутатіону [110] і низка біосенсорів на основі ГОД для визначення глюкози в реальних зразках [111–113].

Слабко дослідженими є каталітичні властивості фулеренів, які можуть бути корисними при розробці ферментних біосенсорів. Так, показано, що фулерен C_{60} каталізує окиснення нандролону (стероїдного гормону) [114], бісфенолу А [115], а також дофаміну і аскорбінової кислоти [116].

1.4.6. Каліксарени

Каліксарени - хімічні сполуки, що складаються з кількох циклічних фенольних олігомерів та мають чашоподібну форму. Завдяки такій специфічній будові каліксарени та їх похідні широко використовують як матриці для іммобілізації ферментів [117, 118]. Ефективна іммобілізація ферменту у добре впорядковану структуру досягається за рахунок утворення ковалентного зв'язку між карбоксильними групами каліксарену та

аміногрупами ферменту [81]. Було розроблено ряд біосенсорів з використанням каліксаренів для визначення глюкози в різних напоях [119], також каліксарени мають перспективу для розробки кондуктометричних ферментних біосенсорів для виявлення амонію у зразках води [120].

1.5. Перспективність, тенденції подальшого розвитку в біосенсориці з використанням наночастинок

Набуває популярності поєднання декількох типів наноматеріалів у складі одного біосенсора. Металеві наноматеріали можна з'єднувати з вуглецевими нанотрубками, графеном тощо, і використовувати для іммобілізації ферментів. Це може призвести до синергічного впливу наноматеріалів на характеристики біосенсорів. Більш детально використання гібридних композитних матеріалів в біосенсорах було розглянуто в огляді [121].

В роботі [122] було запропоновано біосенсор на основі глюкозооксидази, іммобілізованої на золотому електроді, модифікованому відновленим оксидом графену, і платиново-золотими наночастинками. Біосенсор мав не дуже низьку межу визначення глюкози (1 мкМ), але дуже широкий лінійний діапазон (0,01-8 мМ). Біосенсор мав гарну стабільність при зберіганні – протягом місяця його чутливість зменшилася лише на 18%. Незважаючи на використання наноматеріалів, автори використовували відносно високий робочий потенціал +0,6 В. В іншій роботі глюкозооксидазу іммобілізували разом з вуглецевими нанотрубками та платиновими наночастинками, і використали робочий потенціал -0,1 В, при якому спостерігалось відновлення пероксиду водню [32]. Біосенсор характеризувався дуже швидким відгуком (2 с), нижньою межею визначення глюкози в 6 мкМ і лінійним діапазоном визначення від 50 мкМ до 5 мМ. В схожій роботі розробили біосенсор на основі глутаматоксидази, іммобілізованої разом з вуглецевими нанотрубками і золотими

наночастинками, і використали низький потенціал для окиснення пероксиду водню (+0,135 В) [34]. Біосенсор також мав швидкий відгук (2 с), нижню межу визначення глутамату в 1,6 мкМ і лінійний діапазон визначення - 5–500 мкМ.

Нещодавно було описано біосенсор для визначення катехолу на основі тирозинази, іммобілізованої з використанням БШКНТ та золотих нанострижнів. За рахунок синергетичного ефекту двох наноструктур вдалося досягти низької мінімальної межі визначення субстрату (0,027 мкМ).

Запропоновано біосенсор для визначення глюкози на основі глюкозооксидази і нанокомпозиту з нанолістів відновленого оксиду графену і срібних наночастинок [123]. Нанокомпозит мав високу біосумісність і провідність, а біосенсор мав відмінні аналітичні характеристики – мінімальну межу визначення 25 нМ, високу чутливість в 15,32 мА/М*см² і лінійний діапазон від 150 нМ до 10 мМ.

Описано ультрочутливий біосенсор для визначення тирозину на основі тирозингідроксилази, іммобілізованої в композитному матеріалі з хітозану, наночастинок зі сплаву платини й паладію, графену та БШКНТ [124]. Біосенсор мав наднизьку межу визначення – 9 пМ і був високоселективним.

Вченими постійно розробляються і використовуються нові типи і форми НМ. Так, було запропоновано біосенсор для визначення глюкози на основі польового транзистора з глюкозооксидазою, іммобілізованою з графеном, модифікованим паладієвими наноструктурами у формі квіток [125]. Біосенсор мав низьку мінімальну межу визначення глюкози (1 нМ) і не був чутливим до поширених інтерферентів (сечової та аскорбінової кислот).

Інтеграція біомолекул та НМ дає велику перспективу для розробки високочутливих та селективних біосенсорів. На сьогодні модифіковані біосенсори широко використовувались у багатьох галузях, включаючи харчову промисловість, клінічну діагностику, біомедицину, та екологічний моніторинг навколишнього середовища. Нові функціональні наноматеріали є ключовими компонентами багатьох електрохімічних ферментних

біосенсорів. Вони використовуються для підвищення ефективності існуючих біосенсорів або створення нових перспективних пристроїв. Ефекти від використання наноматеріалів в електрохімічних ферментних біосенсорах можна умовно поділити на три групи: покращення переносу заряду між ферментом та електродом (аж до прямого переносу електронів), покращення умов іммобілізації ферментів і відповідно забезпечення їх стабільності і каталіз електрохімічних реакцій. Описано біосенсори на основі НМ, які вирізняються надвисокою чутливістю і відмінною стабільністю при зберіганні. Зараз велика увага приділяється поєднанню різних НМ в одному біосенсорі, що відкриває практично безмежне поле для нових досліджень.

Таким чином, розробка нових та вдосконалення існуючих методів покращення аналітичних характеристик біосенсорів за рахунок використання нано- та мікроматеріалів, є вельми актуальним напрямом біосенсорики.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

У роботі використовувались ферменти: глюкозооксидаза (ГОД, КФ 1.1.3.4) із *Penicillium vitale* з активністю 130 од.акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів), уреаза (КФ 3.5.1.5) із *Canavalia ensiformis* з активністю 66,3 од. акт./мг фірми «Fluka» (Швейцарія), глутаматоксидаза (ГЛОД, КФ 1.4.3.11) із *Streptomyces sp.* з активністю 7 од.акт. /мг фірми Yamasa Corporation (Токіо, Японія), рекомбінантна уреаза із *E.coli sp.* (КФ 3.5.1.5) з активністю 150 од.акт./мг виробництва фірми «Usbiological» (США), аргіназа із печінки бика (КФ 3.5.3.1.) з активністю 105 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich» (США), ацетилхолінестераза (АцХЕ, КФ 3.1.1.7) із електричного вугря з активністю 426 од.акт./мг, бутирилхолінестераза (БуХЕ, КФ 3.1.1.8) із сыворотки крові коня з активністю 13 од.акт./мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США).

Інші компоненти для створення селективних елементів біосенсорів: бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), гліцерин, *m*-фенілендіамін виробництва фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США). Муказол та поліетиленімін були виробництва фірми Sigma-Aldrich (США).

В роботі використовувались такі цеоліти, як силікаліти, бета-цеоліти з різним співвідношенням Si/Al, цеоліт А, цеоліт L та мезопористі кремнієві сфери, які були синтезовані в Середньосхідному технічному університеті (Анкара, Туреччина). Методики їх синтезу та охарактеризації описані в роботі [126].

Властивості мікро- та наночастинок цеолітів, що були використані в роботі, при розробці нових методів іммобілізації біоселективних елементів представлені в табл. 2.1.

Фотографії цеолітів, отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопу наведено на рис. 2.1.

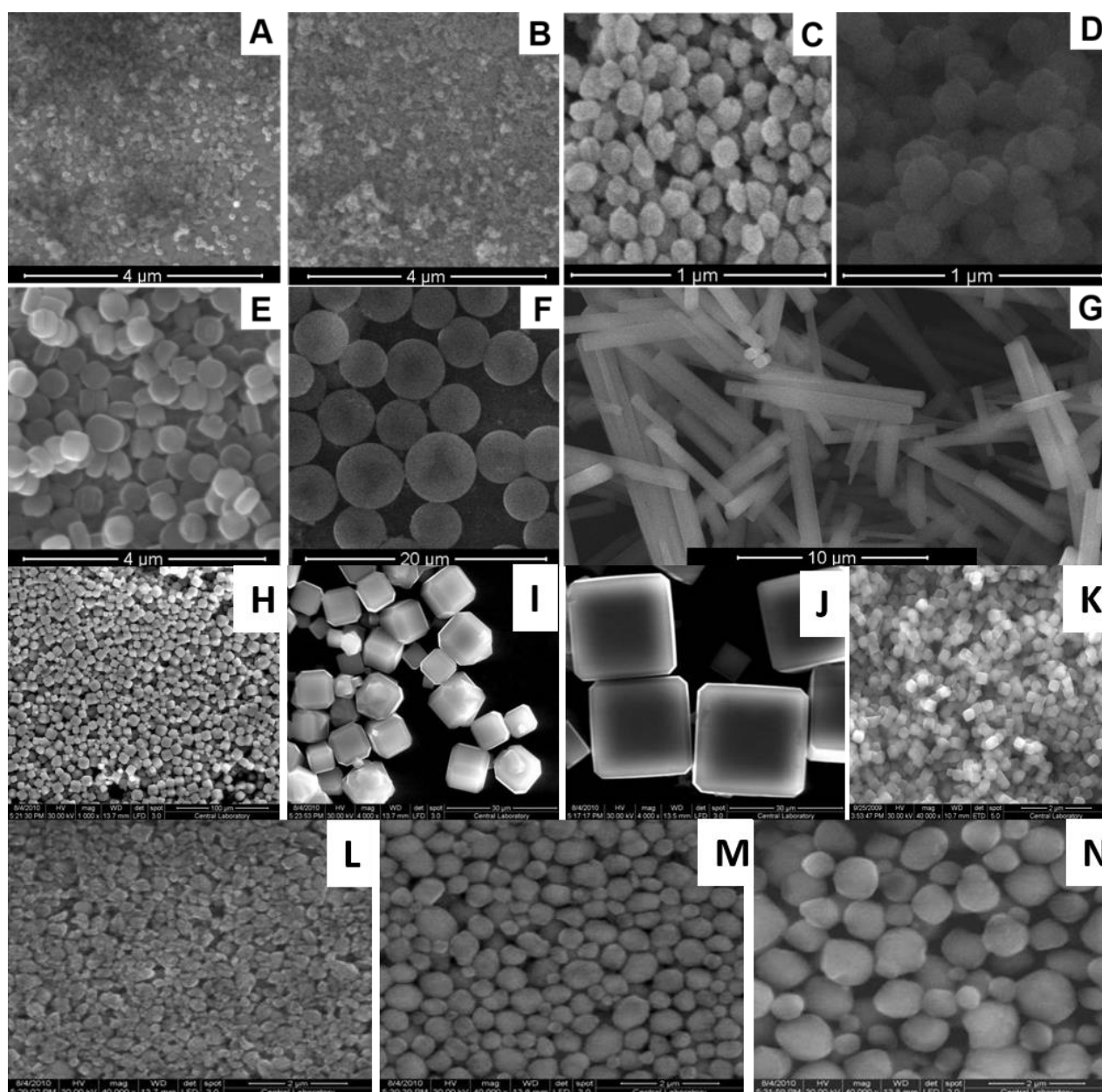


Рис. 2.1. Фотографії різних типів цеолітів, отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопу: наноцеоліт Бета (A), наноцеоліт L (B), силікаліт 80 нм (C), силікаліт 160 нм (D), силікаліт 450 нм (E), мезопористі кремнієві сфери (F), цеоліт L (G), цеоліт LTA-4 (H), цеоліт LTA-9 (I), цеоліт LTA-22 (J), цеоліт A (K), цеоліт Бета-30 (L), цеоліт Бета-40 (M), цеоліт Бета-50 (N).

Таблиця 2.1

Характеристики цеолітів, що використовувались при іммобілізації ферментів

Тип цеоліту	Середній розмір часток (нм)	Площа (м ² / г)	Обсяг пор (см ³ / г)	Діаметр пор (Å)
наноцеоліт Бета	60	472	0,2	4,3
наноцеоліт L	60	419	0,18	4,0
силікаліт 80 нм	80	331,9	0,14	9,5
силікаліт 160 нм	160	502,4	0,21	13,5
силікаліт 450 нм	450	281,7	2,01	5,2
мезопористі кремнієві сфери	4500	483,5	2,01	176,5
цеоліт L	7000	293,7	0,1198	12,0

Субстрати та інтерферуючі речовини: аргінін, ацетилхолін, бутирилхолін хлорид, сечовина, глюкоза, глутамат, аскорбінова, сечова кислоти, водний розчин перекису водню (3 ваг. %), цистеїн, дофамін використано виробництва «Sigma–Aldrich Chemie» (США). Також, в даній роботі використовувався набір амінокислот виробництва фірми «Sigma» (США).

Каліксарен, що використовувався в роботі, було синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України (м. Київ, Україна), та люб'язно надано в рамках спільних досліджень. Він представляв собою каліксаренфосфонову кислоту, яка містила метилсульфідні пропоксильні групи на нижньому вінці макроциклу (рис. 2.2.).

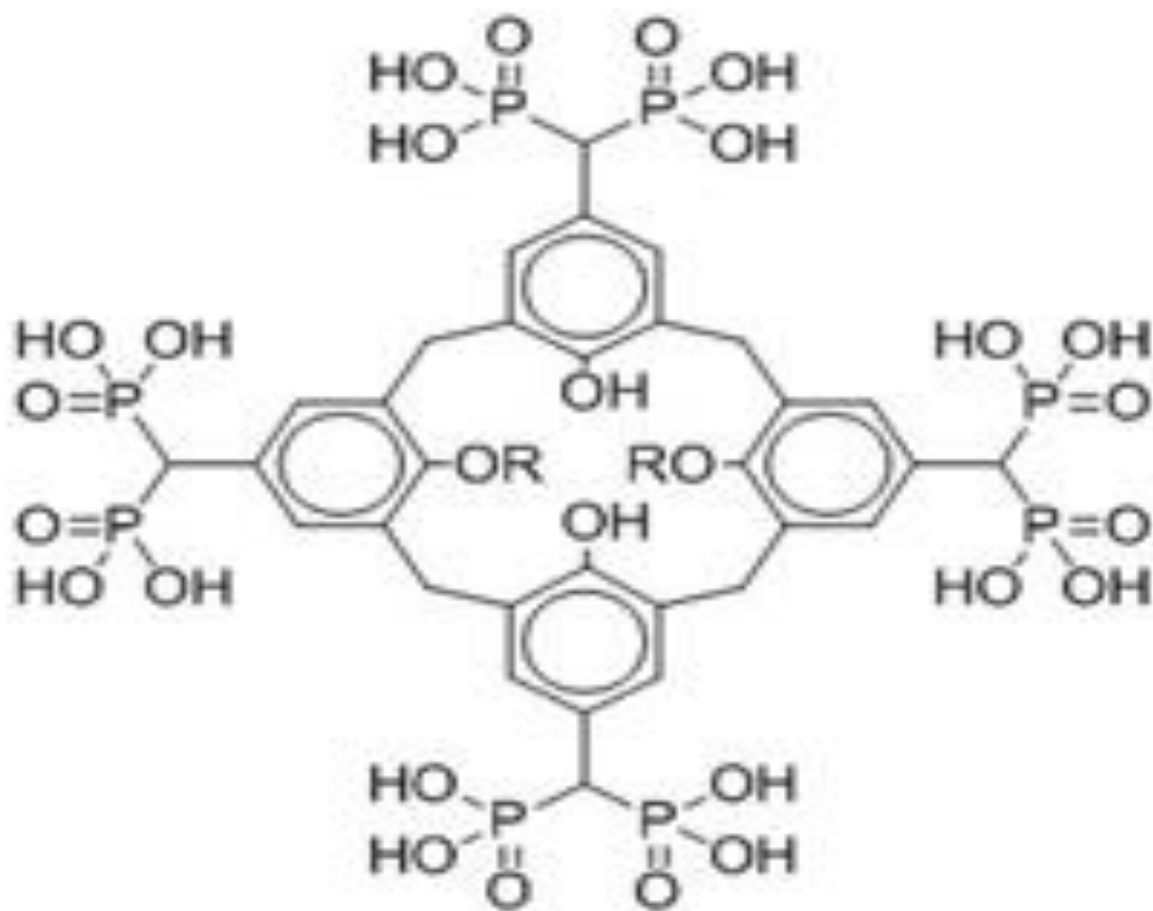


Рис. 2.2. Ди-(3-метилсульфідпропокси) калікс[4]арен метиленбісфосфонова кислота.

Ці групи, завдяки утворенню міцних хімічних зв'язків S-Au, здатні утворювати мономолекулярні шари на атомарній золотій поверхні кондуктометричного перетворювача. Диметилсульфоксид (ДМСО) вітчизняного виробництва використовувався як розчинник для каліксаренів.

Як робочі буферні розчини використовували: калій-фосфатний буферний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$), НЕРЕС, та ТРИС ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, виробництва фірми «Sigma–Aldrich Chemie» (США).

Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. Термічна модифікація цеолітів

Кристали цеоліту Бета у формі NH_4^+ отримували шляхом іонного обміну ассинтезованих кристалів з 1 М водним розчином азотнокислого амонію при температурі $+80\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Іонообмінні кристали (як правило, це 0,2 г зразку) поміщали в тигель та нагрівали у попередньо запрограмованій печі на відкритому повітрі для забезпечення перетворення NH_4^+ форми матеріалу у форму H^+ [127]. Зразок Бета-1 отримували шляхом нагрівання від $+25$ до $+500\text{ }^\circ\text{C}$, зі швидкістю $1\text{ }^\circ\text{C/хв}$, при $+500\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 6 год, з подальшим охолодженням до $+25\text{ }^\circ\text{C}$. Зразки Бета-2 та Бета-3, також, готували з використанням нагрівання, ізотермічного та охолоджувального етапів, але з різними показниками та значеннями температури (Табл. 2.2). Наприклад, Бета-2 виготовляли шляхом нагрівання до $700\text{ }^\circ\text{C}$, зі швидкістю $10\text{ }^\circ\text{C/хв}$, при $+700\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 6 год, з подальшим охолодженням до $+25\text{ }^\circ\text{C}$, а Бета-3 виготовляли з використанням тієїж процедури але зі швидкістю нагрівання зразку до $700\text{ }^\circ\text{C} - 1\text{ }^\circ\text{C/хв}$

Таблиця 2.2

Процедура термічної обробки цеолітів, що використовувалась для отримання різних зразків цеоліту Бета

Назва зразка	Кінцева температура ($^\circ\text{C}$)	Витримка при кінцевій температурі (год)	Швидкість нагрівання ($^\circ\text{C/хв}$)
Бета-1	500	6	1
Бета-2	700	6	10
Бета-3	700	6	1

2.3. Електрохімічні перетворювачі, що використовувались в роботі

2.3.1. Амперометричні платинові дискові електроди

Амперометричні перетворювачі, що використовувались в даній роботі, являли собою платинові дискові електроди власного виробництва (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Схематичне зображення амперометричного біосенсора на основі платинового дискового електроду: 1) біоселективна мембрана, 2) платиновий дріт, 3) внутрішній провідник, 4) сплав Вуда, 5) епоксидна смола, 6) контактна ділянка.

Для створення таких електродів, платиновий дріт довжиною 3 мм і діаметром 0,4 мм запаювали в одній частині скляного капіляра з діаметром 3,5 мм. Перший кінець дроту шліфували і він слугував в якості робочої поверхні перетворювача. За допомогою легкоплавкого сплаву Вуда, інший кінець платинового дроту з'єднували з провідником, який був розташований всередині капіляра. До протилежного кінця провідника приєднували контактну ділянку, через яку підключали даний електрод до вимірювальної установки [128].

Для отримання однорідної поверхні чутливої ділянки платинових електродів, перед іммобілізацією біоселективних елементів, проводили її шліфування за допомогою абразивного паперу фірми Klingspor (ЄС). Далі відшліфовану ділянку протирали 96% етиловим спиртом. Таке ж шліфування проводили через певні проміжки часу - для оновлення електродної поверхні.

2.3.2. Планарні амперометричні перетворювачі

В роботі використовувались амперометричні перетворювачі на основі планарних тонкоплівкових нікелевих електродів (рис. 2.4).

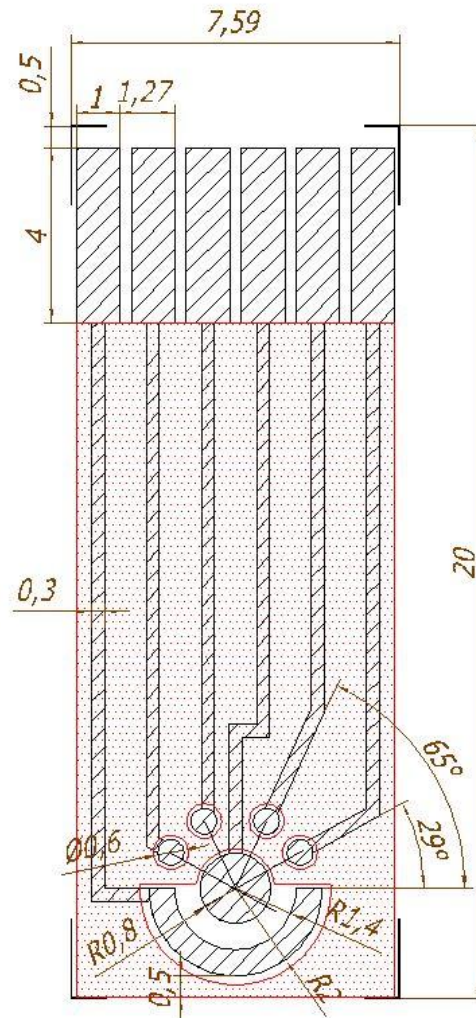


Рис. 2.4. Схема планарного амперометричного мультиперетворювача на основі нікелевих електродів із зазначенням розмірів його електродів.

Усі електроди (чотири робочих, допоміжний та електрод порівняння) були розміщені на єдиній ситаловій підкладинці. Даний тип перетворювачів було виготовлено в Інституті електродінамики НАН України (м. Київ, Україна) [129].

2.3.3. Кондуктометричні перетворювачі на основі золотих гребінчастих електродів

В роботі використовували тонкоплівчасті кондуктометричні перетворювачі, які були виготовлені в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). Перетворювачі такого типу складаються з двох ідентичних пар золотих зустрічно-гребінчастих електродів, нанесених на підкладку з ситалу, і мають розмір 5×30 мм (рис. 2.5).

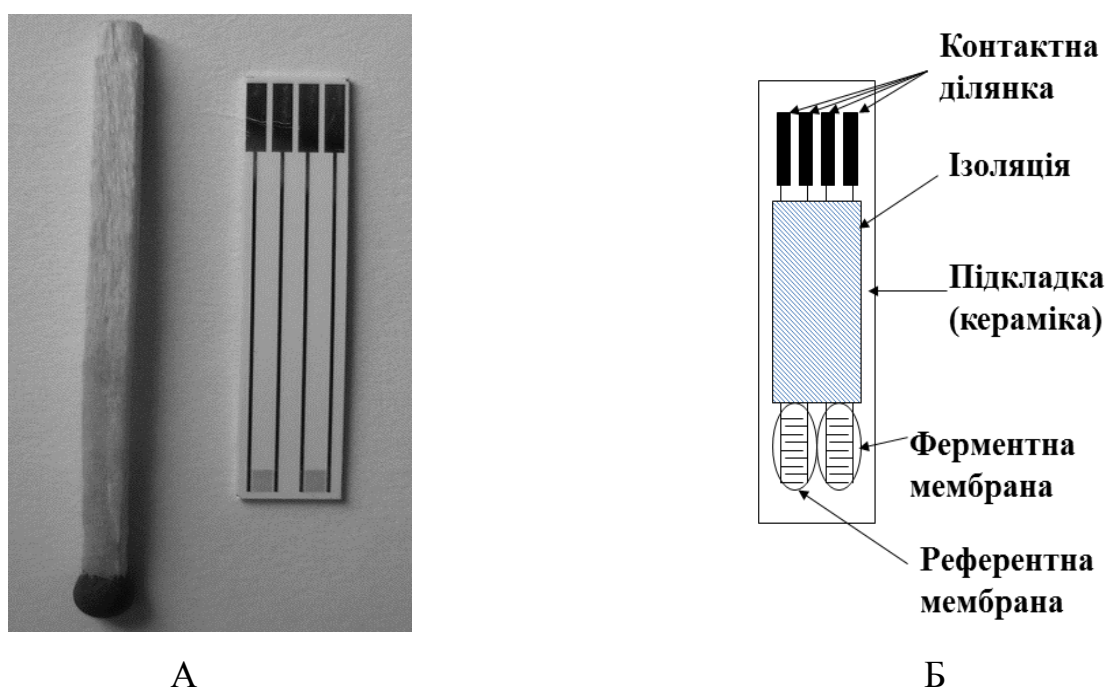


Рис. 2.5. Зовнішній вигляд (А), та схема будови (Б) кондуктометричного перетворювача на основі золотих гребінчастих електродів.

Площа чутливої поверхні кожної пари електродів становить $1,5 \text{ мм}^2$, а відстань між зустрічними пальцями гребінок - складає 20 мкм.

В роботі використовували диференційний режим вимірювань, згідно якого у вимірюваннях одночасно беруть участь дві пари електродів. Одна з цих пар виконує роль референтної, використання якої дозволяє зменшити

вплив неінформативних заряджених частинок на величину відгука сенсора, і тим самим значно підвищити точність вимірювань. Мікрофотографії даних електродів наведені в роботі [130].

2.3.4. Потенціометричні перетворювачі на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ)

В роботі використовували потенціометричні перетворювачі на основі рН-чутливих польових транзисторів - сенсорні чіпи з диференційною парою р-канальних транзисторів на одному кристалі, загальною площею 8×8 мм, що були виготовлені в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна) (рис. 2.6) [131].

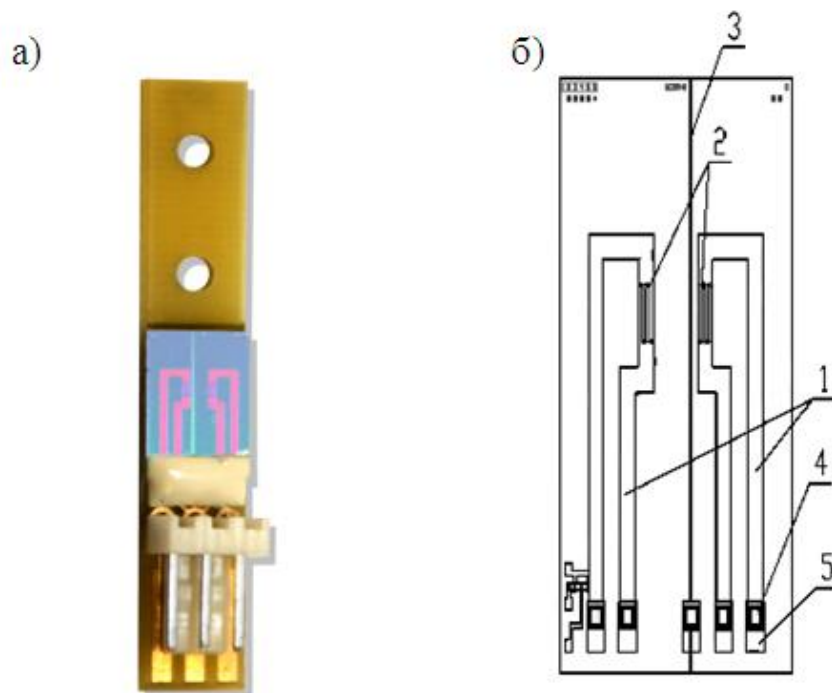


Рис. 2.6. Зовнішній вигляд (а) та схематичне зображення (б) рН-чутливого польового транзистора: 1) p^+ - дифузійні шини від областей стоку і витоку кожного із транзисторів; 2) зигзагоподібні області затворів із діелектричним шаром $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$; 3) захисна n^+ - область з контактом до p -підкладки; 4) області травлення контактних вікон; 5) алюмінієві контактні області до транзисторних виходів.

До складу одного кристалу входять два ідентичних транзистора, розділених між собою захисною n^+ - областю, шириною 50 мкм, що контактує з підкладкою. p^+ - дифузійні шини, виведені на край перетворювача для контакту зі стоком та витоком, вивід до вбудованого мікроелектроду порівняння, а також два тестових МДН-транзистори з металевим затвором, що призначені для перевірки електричних параметрів виготовлених кристалів. Іон-селективні властивості транзистора, обумовлені підзатворним діелектричним шаром, що складається з термічно окисленої плівки SiO_2 товщиною 50 нм, та осадженої в реакторі зниженого тиску, та плівки Si_3N_4 товщиною 70 нм.

2.4. Модифікація поверхні електрохімічних перетворювачів мікрота наноматеріалами

2.4.1. Методика нанесення додаткової мембрани на основі ПФД на поверхню амперометричного перетворювача

Перед початком роботи, амперометричний перетворювач очищували за допомогою ватного тампону, змоченого 96% етиловим спиртом. Після цього проводили шліфування поверхні перетворювача за допомогою алюмінієвих мікрочастинок розміром 0,3 і 0,5 мкм, та ще раз обробляли його спиртом. Очищений перетворювач підключали до експериментальної установки та занурювали у вимірювальну комірку, що містила 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну. Далі отримували циклічні вольтамперограми (ЦВА). Для запобігання швидкого окиснення *m*-фенілендіаміну, його розчин готували безпосередньо перед початком експериментів.

Циклічна вольтамперометрія проводилася у звичайній робочій вимірювальній комірці, але без перемішування. Початковий потенціал становив 0 В, кінцевий - + 0,9 В, швидкість зміни потенціалу - 20 мВ /с, крок зміни потенціалу складав 5 мВ.

2.4.2. Покриття чутливої поверхні електрохімічних перетворювачів шаром цеолітів

Формування шару цеолітів на поверхні перетворювачів на основі золота та платини отримували за рахунок, так званої, процедури повного покриття «*dip coating*». Для цього використовували 5-10% колоїдний розчин цеоліту в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Даний розчин в об'ємі 0,15 мкл, наносили на всі активні ділянки перетворювачів, після чого проводили нагрівання цього перетворювача до 150-200 °С протягом 3-7 хв. (в залежності від перетворювача). Така температура не змінювала властивості цеолітів і, ніяким чином, не впливала на робочі параметри перетворювачів на основі золота та платини.

Окремо було розроблено альтернативну методику нанесення цеолітів на поверхню нікелевих амперометричних перетворювачів та ІСПТ. Спершу поверхню обробляли розчином муказолу протягом 15 хв для збільшення її гідрофільності. Потім наносили шар 0,5% поліетиленіміну за допомогою методу центригування «*spin coating*» (15 с при 3 000 об./хв.), після чого перетворювачі витримували протягом 30 хвилин при температурі +100 °С. Далі наносили мікрочастинки, які прикріплялися до шару поліетиленіміну. Модифікований в такий спосіб перетворювач використовувався для іммобілізації на його поверхню біоселективних елементів.

2.4.3. Нанесення каліксарену на золоті гребінчасті електроди кондуктометричного перетворювача

Для нанесення шару каліксарену на поверхню кондуктометричного перетворювача, використовували різні концентрації розчинів каліксарену у ДМСО. Одну й ту саму кількість (0,1 мкл) каліксаренового розчину наносили на активні ділянки кожної пари золотих електродів, після чого нагрівали перетворювач протягом 5 хвилин до 80 °С (Рис. 2.7).

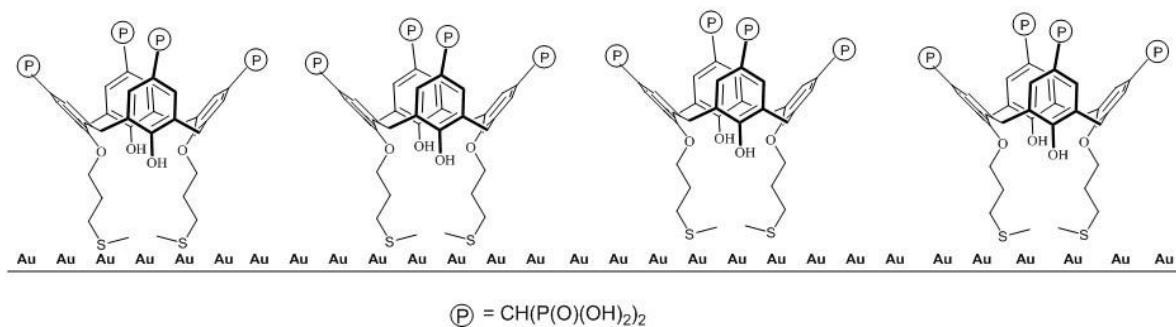


Рис. 2.7. Схема золотої поверхні кондуктометричного перетворювача, покритої мономолекулярним шаром каліксарену.

Даний температурний режим обробки ніяким чином не впливав на робочі параметри даного перетворювача. В результаті описаної процедури відбувалось формування каліксаренового шару на поверхні активних ділянок електродів.

2.5. Методики іммобілізації ферментів

2.5.1. Іммобілізація в БСА-мембрані з використанням парів ГА

Важливою властивістю глутарового альдегіду є те, що він формує ковалентні зв'язки між біокаталітичними частинками або білками, тому ця сполука дуже часто використовується для іммобілізації ферментів, особливо при розробці ферментних біосенсорів [132].

Для виготовлення робочих біоселективних мембран шляхом іммобілізації ферментів в насичених парах ГА використовували наступні розчини: 1) 5% ГОД, 5% БСА, 10% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,75; 2) 10% уреазі, 10% БСА, 10% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері; 3) 8% ГЛОД, 4% БСА, 10% гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів використовували тільки БСА з кінцевою

концентрацією білку 10-20 % в залежності від біосенсора, для забезпечення однакового вмісту білка у робочій і референтній мембранах.

Приготовані суміші для робочих і референтних мембран наносили на відповідні чутливі ділянки перетворювачів за допомогою дозатора Eppendorf (загальний об'єм 0,1-2,5 мкл) до повного покриття їх робочих поверхонь. Об'єм кожної нанесеної мембрани становив близько 0,05 мкл. Після нанесення відповідних мембран перетворювачі занурювали у насичені пари ГА на 15-30 хв, а потім висушували протягом 15 хв на повітрі за кімнатної температури. Для видалення незв'язаних компонентів мембран, отримані перетворювачі промивали в робочому буферному розчині.

2.5.2. Адсорбція ферментів на цеолітах

Для адсорбції ферментів поверх шару цеоліту був використаний вихідний розчин 5 % ферменту (ГОД, ГлОД, АцХЕ, БуХЕ, уреаз та рекомбінантна уреаз) у робочому буфері та розчин 5 % БСА у робочому буфері (для електроду порівняння). Розчин ферменту в об'ємі 0,1-0,15 мкл наносили на чутливу ділянку перетворювача, а розчин БСА наносили, відповідно, на референтну. Далі перетворювач залишали на повітрі при кімнатній температурі впродовж 5-20 хв, після чого проводили відмивку перетворювача від незв'язаного ферменту в робочому буфері (3 рази по 2 хв). При застосуванні даного методу іммобілізації, ні глутаровий альдегід, ні будь-які інші допоміжні сполуки не використовувались.

Після проведення експериментів, поверхню перетворювача очищували від цеоліту та ферменту за допомогою ватного тампону, змоченого 96 % етиловим спиртом.

2.5.3. Коїмобілізація ферментів з цеолітами

Для виготовлення біоселективних елементів шляхом ко-їмобілізації мікро- та наночастинок цеолітів і ферментів в насичених парах ГА, розчин ферменту для робочої мембрани (10 % ферменту, 10 % БСА, 10% гліцеролу у 20 мМ ФБ, рН 6,75) або розчин БСА для референтної мембрани (20% БСА та 10% гліцеролу у такому ж буфері) змішували з 10% розчином мікрочастинок у пропорції 1:1, і наносили на відповідні чутливі області перетворювачів. Одразу після нанесення, перетворювачі занурювали у насичені пари ГА на 30 хв, після чого - висушували протягом 15 хв на повітрі за кімнатної температури. Перед використанням отримані перетворювачі промивали в робочому буферному розчині, аби видалити незв'язані компоненти мембран.

2.6. Схеми експериментальних установок

2.6.1. Вимірювальна установка для проведення амперометричних досліджень

В роботі використовували триелектродну схему амперометричного аналізу. Амперометричні перетворювачі, разом з допоміжним платиновим електродом та електродом порівняння Ag/AgCl, підключали до потенціостату PalmSens (Нідерланди). Загальний вигляд робочої установки для амперометричних вимірювань, що під'єднана до персонального комп'ютера, приведено на рис. 2.8.

Кожен електрод, що використовується при проведенні амперометричних вимірювань, виконує свою індивідуальну функцію. У момент, коли на робочий електрод подається позитивний потенціал, всі молекули даного розчину окислюються на поверхні електрода, і відбувається перехід електронів від розчину до електрода.

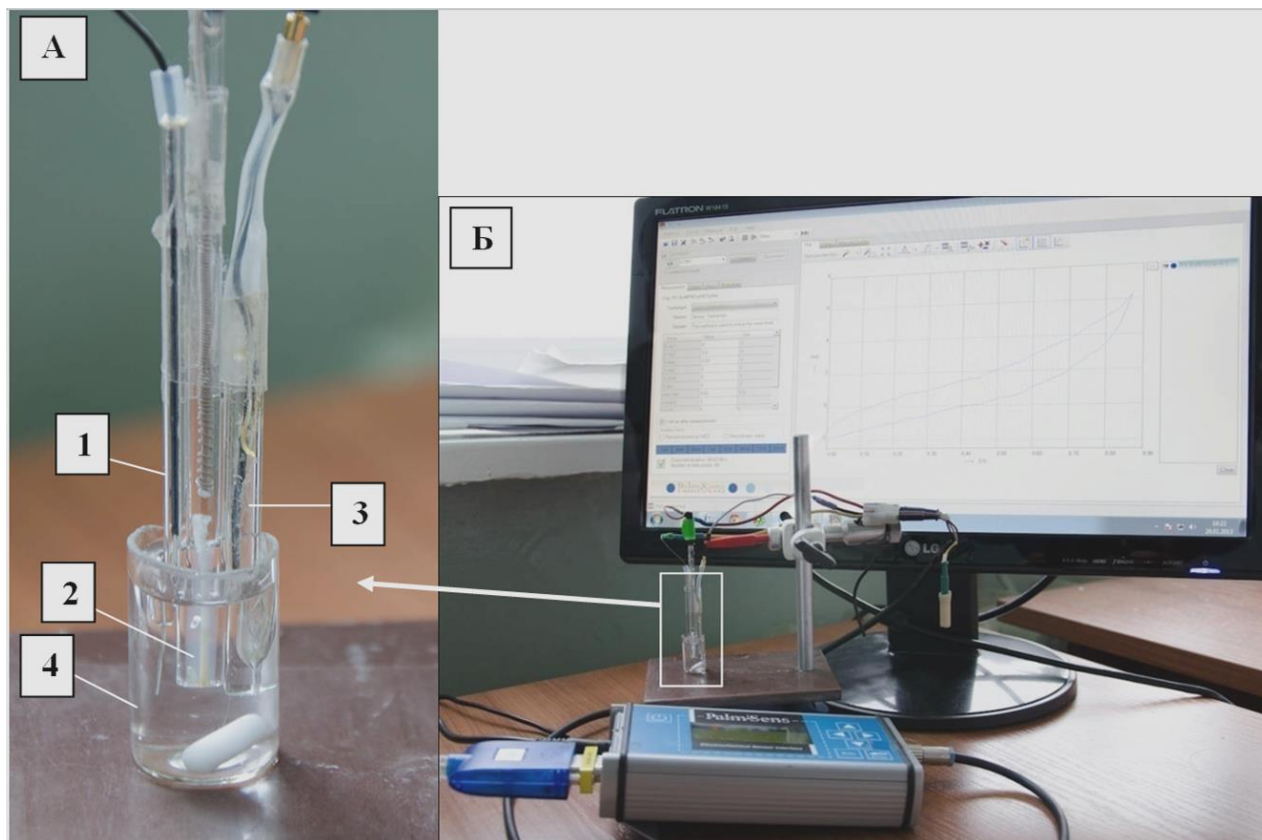


Рис. 2.8. а) Зовнішній вигляд вимірювальної комірки з робочими електродами: 1 – допоміжний електрод, 2 – хлор-срібний електрод порівняння, 3 – робочий електрод, 4 – комірка з робочим буфером об'ємом 2 мл на магнітній мішалці; б) Зовнішній вигляд робочої установки для проведення амперометричних вимірювань.

Допоміжний електрод, що у порівнянні з робочим електродом, має у декілька разів більшу площу платинової поверхні, застосовується для запобігання виникнення великої різниці потенціалів через стехіометричний дисбаланс. Функція допоміжного електроду полягає у формуванні зовнішнього потоку, забезпечуючи електронам шлях назад до аналізованого розчину.

Отже, процес відновлення електронів на допоміжному електроді еквівалентний процесу окислення електронів на робочому електроді. Цей потік електронів генерує струм в амперометричному датчику. Третій

електрод, що є необхідним для забезпечення проведення амперометричних вимірювань - електрод порівняння. Він містить в своєму складі відомі хімічні сполуки, які включають в себе обидві форми окисленої пари. Зазвичай, це або Hg/HgCl_2 (насичений каломельний електрод), або Ag/AgCl (хлор-срібний електрод). Оскільки прикладений потенціал є фіксованим, електрод порівняння має стабільну точку, яку можна використовувати при вимірюваннях робочим електродом.

Тобто, в той час як між робочим та допоміжним електродами вимірюється сила струму, між робочим електродом та електродом порівняння контролюється прикладений потенціал [133].

2.6.2. Вимірювальна установка для проведення потенціометричних досліджень

Вимірювання з використанням рН-чутливих польових транзисторів проводили за допомогою експериментальної установки з використанням портативного приладу (Рис. 2.9), який було сконструйовано в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України [131].

Такий прилад може працювати у складі автоматизованої вимірювальної установки і може служити прототипом промислового приладу. Його основою є ІСПТ-підсилювач, що забезпечує роботу інтегрального потенціометричного сенсора у заданому режимі ($U_{\text{вс}} = \text{const}$ та $I_{\text{в}} = \text{const}$), причому ці параметри задаються експериментатором та можуть змінюватись у ході експерименту. В роботі використовували $I_{\text{в}} = 100 \text{ мкА}$, $U_{\text{вс}} = 1 \text{ В}$.

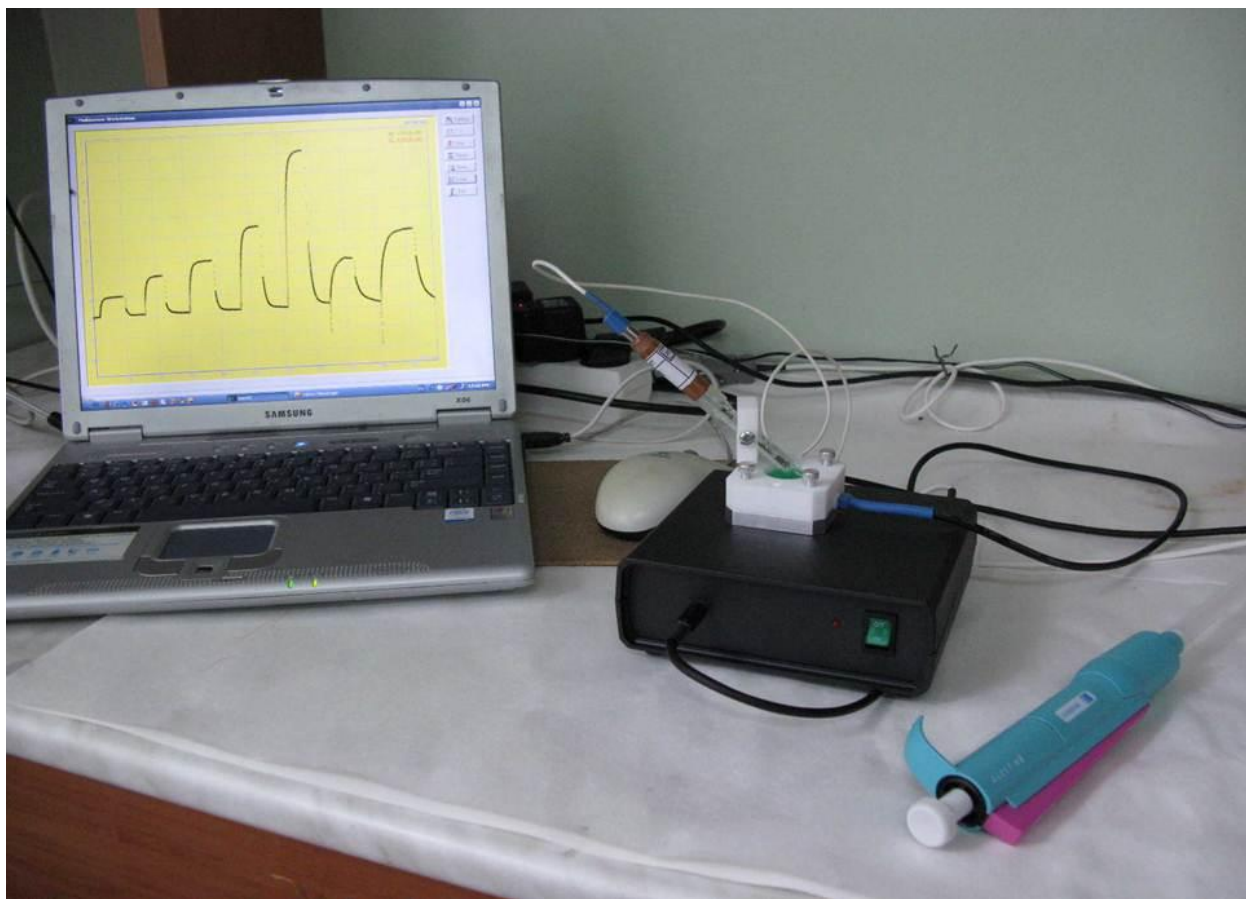


Рис. 2.9. Загальний вигляд експериментальної установки для проведення потенціометричних вимірювань.

Інформаційним сигналом є потенціал підзатворного іон-чутливого діелектричного шару (U_3), або зміна цього потенціалу в результаті ферментативної реакції.

Оскільки виміри проводяться в диференційному режимі, то вихідні сигнали з двох однакових ІСПТ-підсилювачів надходять на диференційний підсилювач з коефіцієнтом підсилення 10 чи 100. З виходу приладу підсилений сигнал, в свою чергу, надходить на реєструвальний пристрій (самописець чи комп'ютер).

2.6.3. Вимірювальна установка для проведення кондуктометричних досліджень на основі портативного аналізатора МХР-3

Кондуктометричні перетворювачі під'єднували до портативного пристрою, призначеного для кондуктометричних вимірювань, що був виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України. Схема підключення приведено на рис. 2.10.

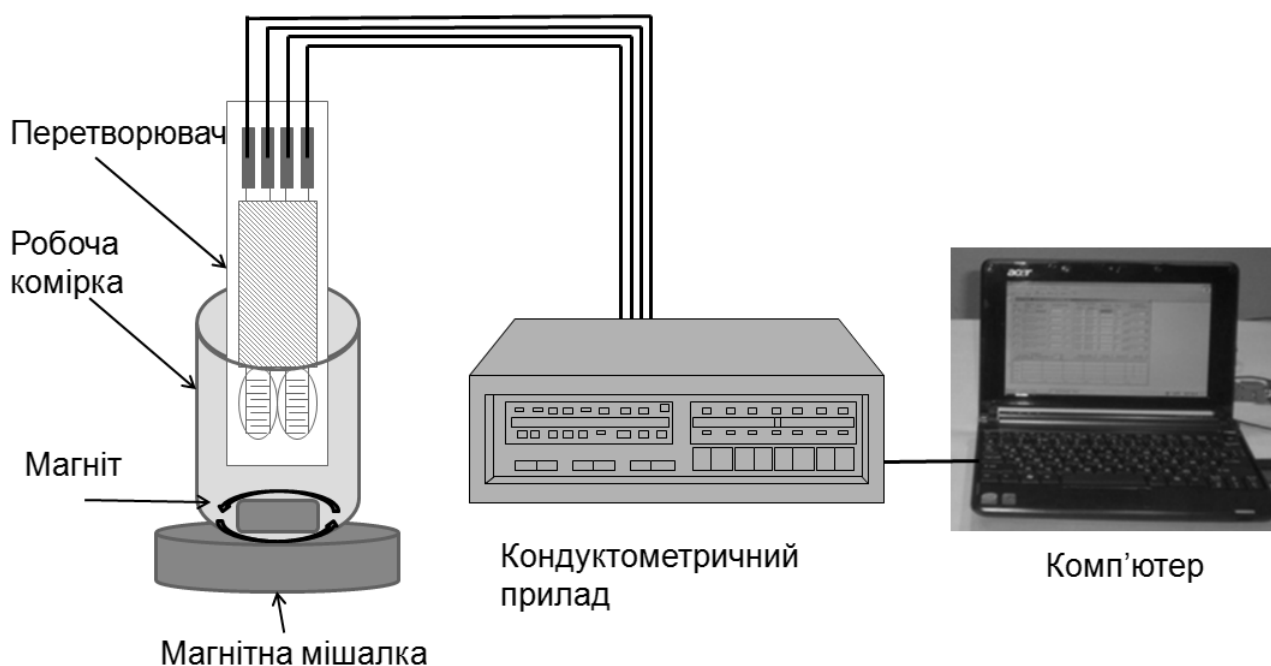


Рис. 2.10. Схема робочої установки для проведення кондуктометричних вимірювань

Кондуктометричний прилад, розміром 9,5 см × 2,5 см × 13,5 см, генерував синусоїдальний потенціал з амплітудою 14 мВ і частотою 36,5 кГц. Технічні характеристики та умови експлуатації даного приладу детально описані у роботі [134].

На рис. 2.11, представлено фотографію загального вигляду робочої установки, під'єднаної до персонального комп'ютера.



Рис. 2.11. Зовнішній вигляд робочої установки для проведення кондуктометричних вимірювань, до складу якої входить: кондуктометр, робоча комірка з перетворювачем і персональний комп'ютер.

Дана експериментальна установка розрахована на використання диференційного режиму вимірювання.

2.6.4. Стаціонарна вимірювальна установка для проведення кондуктометричних досліджень

Також, для вимірювання зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача, в роботі використовувалась стаціонарна кондуктометрична вимірювальна установка, схема якої зображена на рис. 2.12 [135].

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.

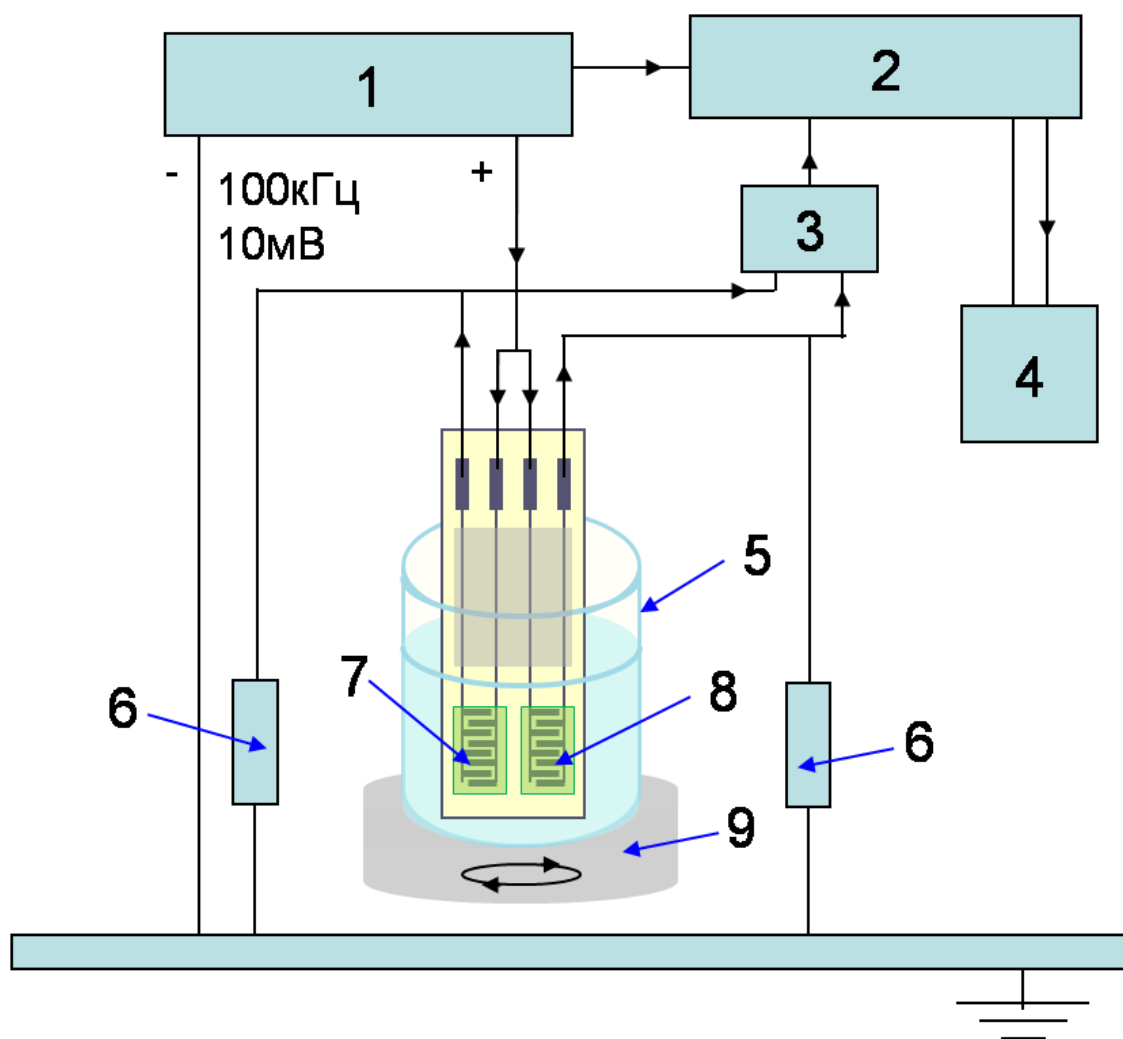


Рис. 2.12. Блок-схема вимірювальної установки: 1 – генератор сигналів, 2 – нановольтметр, 3 – диференційний підсилювач, 4 – реєструючий пристрій, 5 – робоча комірка з буферним розчином об’ємом 2 мл, 6 – опори навантаження, 7, 8 – електроди з нанесеними на них ферментною та референтною мембранами, 9 – 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).

2.7. Методики проведення аналізу

2.7.1. Біосенсорна методика визначення субстратів

Усі біосенсорні вимірювання проводилися при кімнатній температурі у відповідному буферному розчині (для кожного сенсора він змінювався в залежності від поставлених задач та характеристик сенсора) у відкритій робочій комірці (1,5-3 мл) при постійному перемішуванні. Концентрація субстрату у вимірювальній комірці задавалась введенням відповідних аліквот стандартного вихідного розчину субстрату до вимірювальної комірки з робочим буфером. Під час вимірювань, неспецифічні зміни сигналу біосенсора, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, тощо, пригнічувалися завдяки використанню у роботі саме диференційного режиму вимірювання. Всі експерименти виконувалися, принаймні, у трьох повторях.

Отримані дані обробляли за допомогою програми OriginLab OriginPro 8.5. Результати, що наведені в таблицях та представлені на рисунках, є середнім значенням трьох-п'яти послідовних експериментів з урахуванням значення середньоквадратичного відхилення.

2.7.2. Традиційний метод спектрофотометричного визначення сечовини

Для оцінки коректності біосенсорного визначення сечовини в зразках сироватки крові пацієнтів з нирковою недостатністю розробленим біосенсором, отримані результати було порівняно з контрольним, традиційним для клінічної практики, методом колориметричного ферментативного визначення сечовини. Принцип методу полягає у гідролізі сечовини уреазою до амонію та вуглецевої кислоти і колориметричному вимірюванні кількості амонію. В присутності гіпохлориту та саліцилату, амоній дає зелене забарвлення (модифікована реакція Бертло). Величина

поглинання проби при 578 нм пропорційна концентрації сечовини у зразку[136].

2.7.3. Спектроскопічний аналіз моно та поліфенілендіаміну

Оптичні спектри дифузійного відбиття записували у діапазоні довжин хвиль 200 – 900 нм за допомогою спектрометра Thermo Evolution 600, оснащеного інтегруючою сферою. Як еталони порівняння використовували Спектралон (для зразку порошку *m*-фенілендіаміну) та платиновий диск (для електроду, модифікованого поліфенілендіаміном).

2.7.4. Хроматографічний аналіз комплексоутворення каліксарену з аргініном та іншими амінокислотами

Через низьку розчинність каліксарену у водних розчинах, його перетворювали в октанатрову сіль шляхом додавання еквівалентної кількості метилату натрію в розчині метанолу. Натрієву сіль з концентрацією 0,5 % розчиняли у суміші H₂O/MeCN (98/2 за об'ємом) і використовували в якості рухомої фази під час аналізу методом ВЕРХ за допомогою системи хроматографії «Hitachi» (Hitachi, Японія). Хроматографічна колонка (розміром 250 x 4,6 мм) була заповнена насадкою марки «Zorbax CN» (Merck, Німеччина). Ультрафіолетовий детектор працював при довжині хвилі 254 нм (в разі аналізу каліксарену) та при 210 нм (в разі аналізу амінокислот). Швидкість потоку рухомої фази становила 0,6 мл/хв. Експеримент проводили в ізократичних умовах. Хроматограми отримували при температурі +32 °С. Рухома фаза містила каліксаренову добавку в концентраціях від 0,02 до 0,1 мМ. Перед введенням зразки аналітів розчиняли у суміші вода/ацетонітрил (98/2 за об'ємом) з концентрацією 0,01 мМ. Об'єм введеного зразка становив 20 мкл.

Стабілізація колонки з рухомою фазою, що містила каліксарен, тривала 3 години перед початком аналізу. Такі умови дозволяли насичити колонку каліксареном, і таким чином, підготувати її для подальшого аналізу амінокислот в потоці рухомої фази.

РОЗДІЛ 3

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ЦЕОЛІТІВ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

3.1. Цеоліти як матеріал для оптимізації біосенсорів

Цеоліти являють собою мікро та наночастинки, в основі структури яких лежить кристалічна ґратка з атомів силіцію, алюмінію та кисню. Негативний заряд кристалу нейтралізують катіони, що розташовані всередині пор. В немодифікованих цеолітах це, зазвичай, одно- або двовалентні іони металів (наприклад, натрію), які можуть бути замінені на іони амонію шляхом іонного обміну, а після кальцинування – на іони гідрогену.

Кристали цеолітів містять високо впорядковану структуру із складною системою пор та каналів. Таким чином, цеоліти мають велику площу поверхні кристалу, на якій можуть адсорбуватися різні речовини. Саме завдяки таким властивостям, цеоліти широко використовуються в різних галузях як адсорбенти [61].

До інших важливих властивостей цеолітів можна віднести дешевизну і відносну простоту їх синтезу, можливість отримання їх з природних матеріалів, а також можливість різноманітних хімічних модифікацій частинок для отримання цеолітів з бажаними властивостями [137]. Різноманітні властивості цеолітів, такі як іонно-обмінна поведінка, розмір частинок, поверхневі групи, розмір пор, та співвідношення Si/Al, можуть досить легко змінюватись з метою отримання оптимальних характеристик біосенсорів, розроблених на їх основі.

В даному розділі дисертаційної роботи описано можливість використання різних типів цеолітів під час розробки електрохімічних біосенсорів на основі різних ферментів.

3.2. Підходи до використання цеолітів при створенні біосенсорів

Існує два основні підходи до використання цеолітів при розробці біосенсорів: (1) - додавання цеолітів до складу біоселективного елементу біосенсора з метою покращення умов іммобілізації та функціонування ферментів, та (2) - використання цеолітів як носіїв (адсорбентів) ферментів, для чого необхідна модифікація поверхні перетворювача цеолітами з наступною адсорбцією ферментів. Схематично ці варіанти представлені на рис. 3.1.

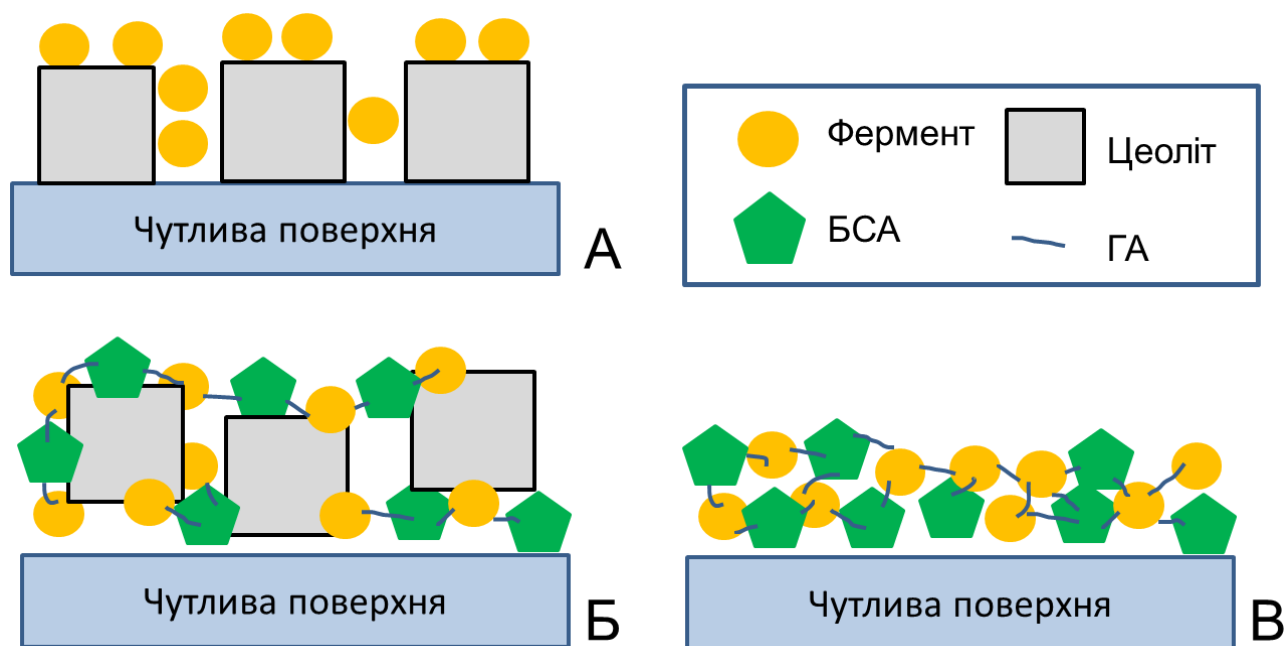


Рис. 3.1. Варіанти використання цеолітів для створення біосенсорів: А – адсорбція ферментів на цеолітах; Б – ко-іммобілізація цеолітів, ферментів і БСА за допомогою ГА; В – метод іммобілізації ферменту та БСА за допомогою ГА

В дисертаційній роботі було досліджено обидва підходи і порівняно характеристики отриманих біосенсорів з біосенсорами, створеними на основі ковалентної зшивки ферментів і БСА за допомогою ГА (традиційний метод).

3.3. Покращення характеристик біосенсорів за рахунок ко-імобілізації цеолітів і ферментів

На першому етапі роботи, цеоліти додавали до складу біоселективних елементів біосенсорів під час ковалентного зшивання ферментів і БСА з використанням ГА. Таким чином була проведена ко-імобілізація цеолітів і ферментів та сформована композитна мембрана, в якій знаходились одночасно і цеоліти, і ферменти.

3.3.1. Вплив різних модифікацій цеолітів Бета в складі біоселективного елемента на роботу біосенсорів

Було перевірено вплив трьох модифікацій цеолітів Бета 30 (Na^+ -Бета 30, NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30), на роботу кондуктометричного та потенціометричного біосенсорів на основі уреазу (рис. 3.2).

В якості контролю виступали біосенсори, які не містили цеолітів у своєму складі. Додавання цеолітів (5 % у мембрані) не змінювало лінійний діапазон роботи біосенсорів, проте, призводило до зміни абсолютної величини відгуків біосенсорів.

Для обох типів біосенсорів, додавання цеоліту Na^+ -Бета 30 не призводило до покращення їх чутливості до сечовини, у той час як додавання NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30 на 40 % збільшувало відгуки кондуктометричного біосенсора і трохи підвищувало чутливість потенціометричного біосенсора до сечовини. За 100 % було прийнято відгуки на сечовину обох типів біосенсорів без додавання в біоселективний елемент цеолітів.

Похибка вимірювань, що оцінювалась як відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж 1 години, була подібною для біосенсорів без цеолітів та біосенсорів, до складу яких входили цеоліти. До того ж, не спостерігалось

суттєвих змін лінійного діапазону роботи біосенсорів. Таким чином, можна зробити висновок, що додавання цеолітів NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30 до біомембрани біосенсорів впливає на величину відгуків та чутливість до субстрату, проте, не змінює інші аналітичні характеристики потенціометричних та кондуктометричних біосенсорів.

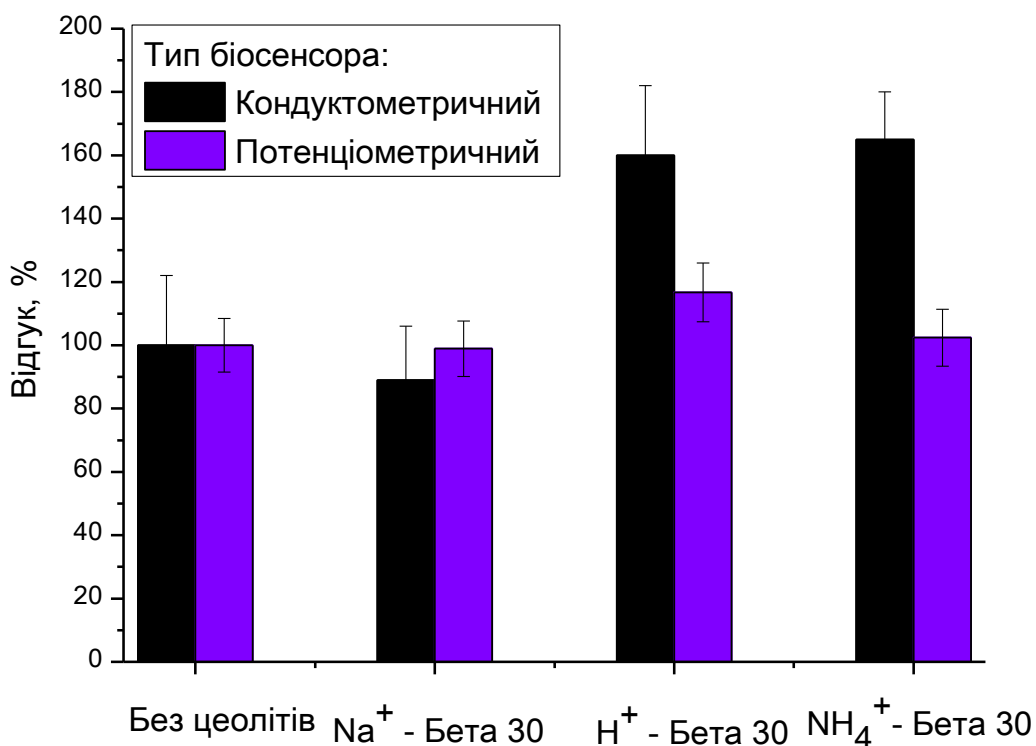


Рис. 3.2. Відгуки кондуктометричних та потенціометричних біосенсорів на основі уреази на додавання сечовини. Біосенсори виготовлені без цеолітів, та з додаванням різних модифікацій цеоліту Бета 30 до біоселективної мембрани. Вміст цеолітів у біомембрані – 5 %. Концентрація сечовини – 6 мМ для кондуктометричного біосенсора, та 1 мМ для потенціометричного. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2.

3.3.2. Вплив концентрації цеолітів у біомембрані на роботу біосенсора

На початку роботи було використано 5 % цеолітів у мембрані. На наступному етапі роботи було вирішено оптимізувати концентрацію цеолітів у мембрані, перевіряючи концентрації від 0,5 до 15 %. Для цього використовували цеоліт Н⁺-Бета 30, застосування якого показало перспективні результати на першому етапі роботи для обох типів біосенсорів (потенціометричного і кондуктометричного). Отримані результати представлені на рис. 3.3.

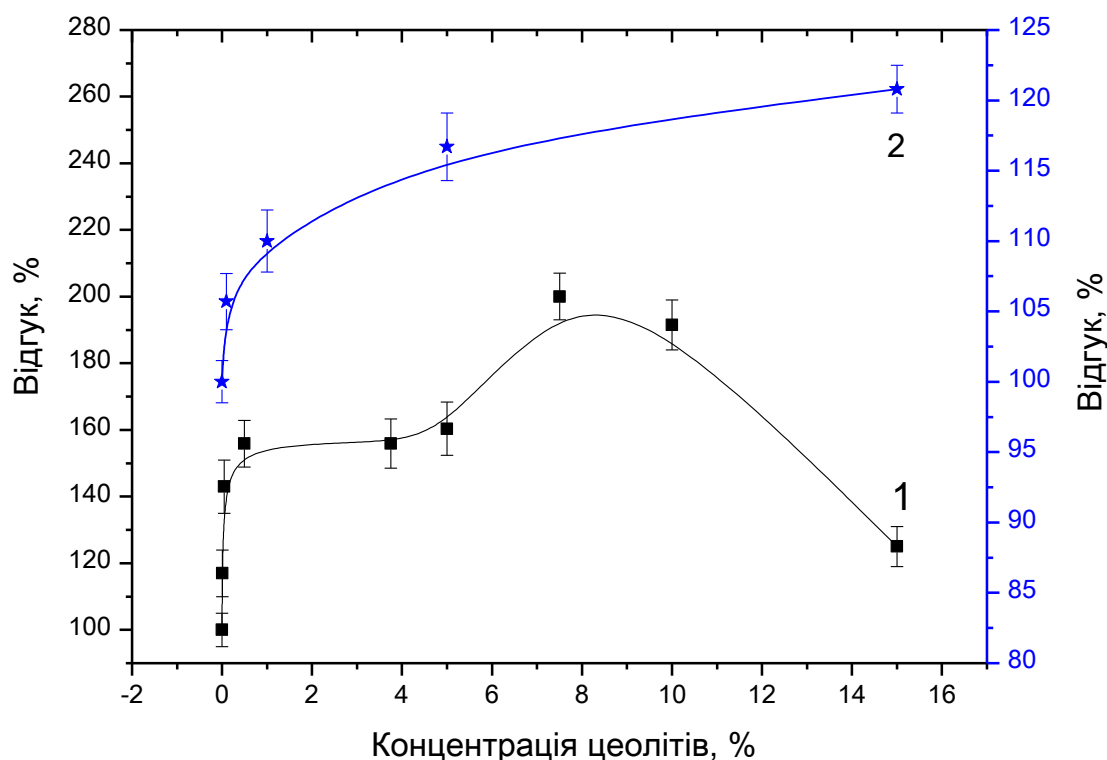


Рис. 3.3. Залежність відгуків кондуктометричних (1) та потенціометричних (2) біосенсорів від вихідної концентрації цеоліту Н⁺-Бета 30, що були використані. Відгуки нормалізовані відносно біосенсора без цеолітів. Концентрація сечовини – 6 мМ для кондуктометричного біосенсора, та 1 мМ – для потенціометричного. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2.

Для кондуктометричного біосенсора оптимальною виявилась концентрація цеоліту 7,5 %, в той час як у потенціометричного біосенсора найбільші відгуки спостерігались при 15 % цеоліту. Більші концентрації було вирішено не перевіряти через погану гомогенізацію, а відповідно, і погану відтворюваність маніпуляцій з висококонцентрованою суспензією цеолітів.

3.3.3. Вплив варіантів ко-іммобілізації цеолітів з ферментом у біомембрані на роботу біосенсора

Підвищення чутливості біосенсорів за присутності цеоліту H^+ -Бета-30 у ферментній мембрані спостерігалось при одночасній іммобілізації ферменту разом з цеолітом у суміші (одношарова іммобілізація). Для підвищення позитивного ефекту була зроблена спроба виконати двошарову іммобілізацію (рис. 3.4).

Для цього було випробувано три варіанти конструювання біоселективних елементів. Перший варіант (1) полягав у нанесенні ферментної мембрани на поверхню перетворювача (перший шар) і цеолітової мембрани в якості другого шару. У другому варіанті іммобілізації (2), мембрани були розміщені навпаки: спочатку цеолітова, а на неї наносилася ферментна. Третій варіант (3) полягав у нанесенні спочатку цеолітового шару на чутливу поверхність електрохімічного перетворювача, поверх якого наносили суміш фермент-цеоліт.

Як видно з рис. 3.4., біосенсор, що містив в своєму складі цеоліт H^+ -Бета-30, іммобілізований відповідно до третього варіанту, мав набагато вищі відгуки на сечовину, ніж біосенсори на основі однієї іммобілізації.

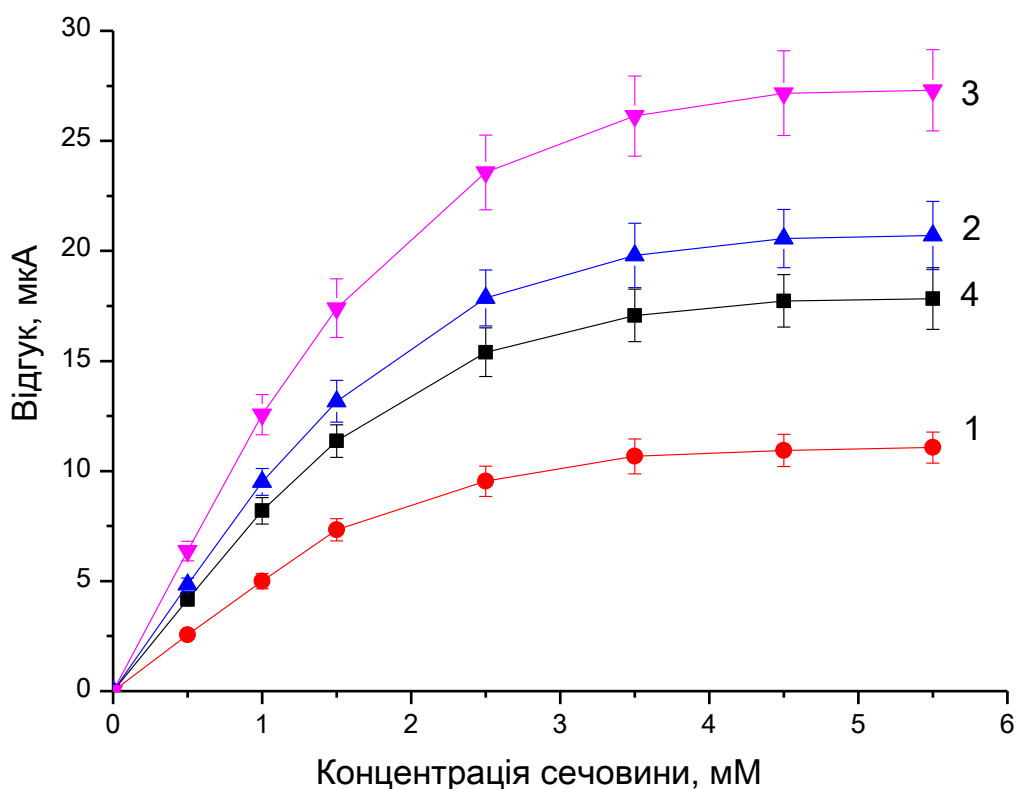


Рис. 3.4. Калібрувальні криві різних біосенсорів на основі уреазі. Біосенсори, основані на першому (1), другому (2), і третьому (3) варіантах ко-іммобілізації уреазі з цеолітом H^+ -Бета-30. Для порівняння використовувався біосенсор на основі уреазі без цеолітів (4). Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2.

3.3.4. Вплив температурної модифікації Бета-цеолітів на функціонування біосенсорів

В роботі було вивчено та порівняно характеристики біосенсорів на основі цеолітів в залежності від типу їх попередньої термічної обробки. Було побудовано калібрувальні криві для біосенсорів на основі уреазі, модифікованих термічно обробленими бета-частинками цеолітів. Слід зазначити, що додавання цеоліту до складу ферментної мембрани

призводило до збільшення величини відгуків біосенсорів. Варіанти температурної обробки цеолітів наведено в розділі 2.2. В залежності від варіанту температурної обробки, цеоліти позначили як Бета-1, Бета-2 та Бета-3. Отже, відгуки біосенсорів, що були модифіковані зразками цеоліту Бета-1, були найвищими. Такі біосенсори характеризувались зростанням величини відгуків приблизно вдвічі порівняно з немодифікованими сенсорами (рис. 3.5).

Відгуки біосенсора, отриманого з використанням зразків цеолітів Бета-2 та Бета-3, були нижчими, а величина відгуку досліджуваних біосенсорів, отримана для всіх трьох зразків цеоліту Бета, зменшувалася у наступному порядку: Бета-1 > Бета-2 > Бета-3.

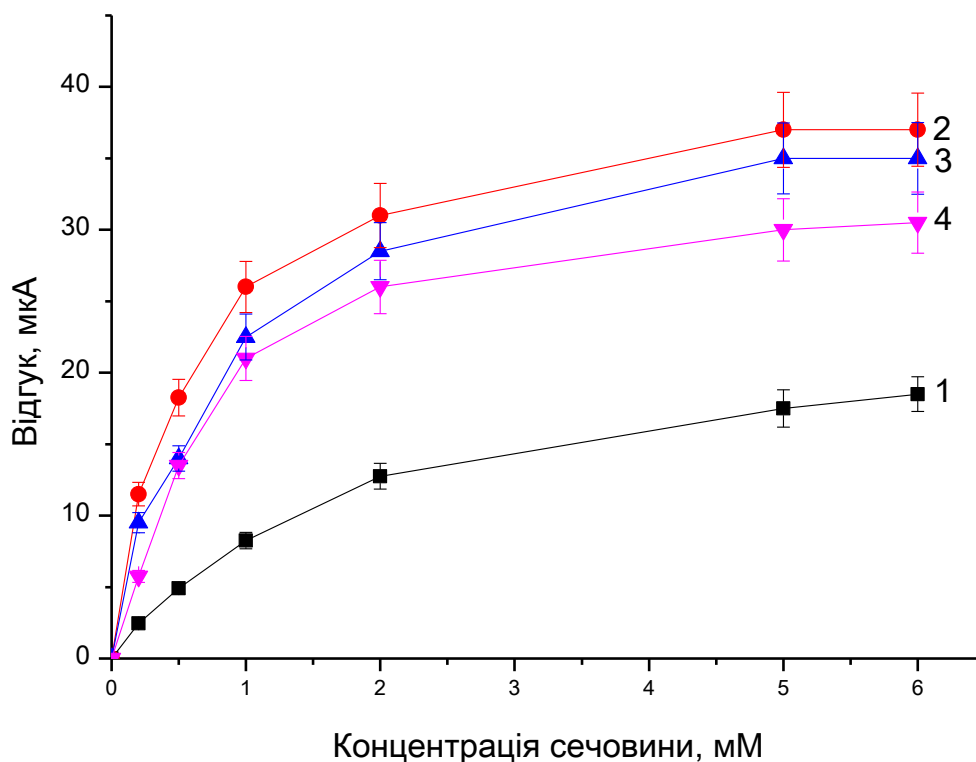


Рис. 3.5. Калібрувальні криві біосенсорів на основі іммобілізованої уреазы без цеоліту (1), та з цеолітом Бета з різною термічною обробкою : Бета-1 (2), Бета-2 (3) Бета-3(4). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

3.3.5. Вплив гідрофобності цеолітів на роботу біосенсора

Відомо, що гідрофобні властивості цеолітів зростають при збільшенні вмісту кремнію (замість алюмінію) в кристалічній ґратці. Ця властивість може бути корисною при іммобілізації ферментів за рахунок більш міцних гідрофобних взаємодій з ферментом. Тому було синтезовано цеоліти зі співвідношенням Si/Al від 30 до 60 і використано їх при іммобілізації урези (рис. 3.6).

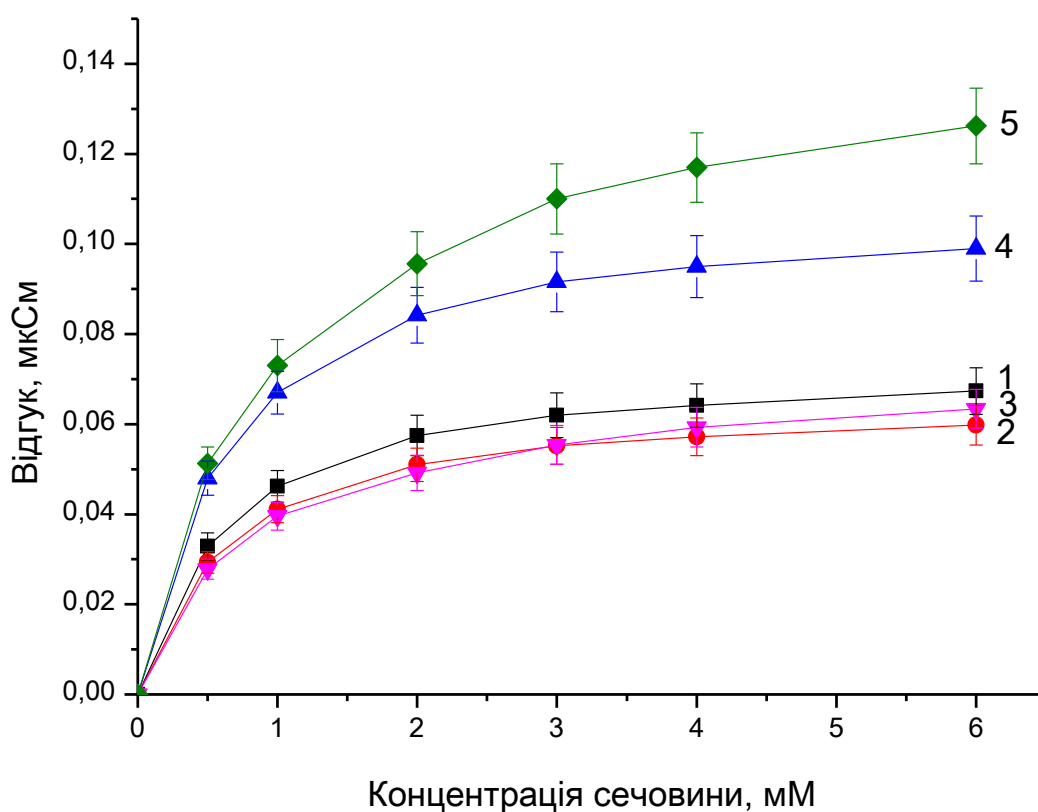


Рис. 3.6. Калібрувальні криві біосенсорів на основі урези без цеолітів (1) та з цеолітами: Na⁺-Бета 30 (2), Na⁺-Бета 40 (3), Na⁺-Бета 50 (4), Na⁺-Бета 60 (5). Концентрація цеолітів в мембрані – 5 %. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2.

Для кондуктометричного біосенсора було встановлено, що використання цеолітів Бета зі збільшеним співвідношенням Si/Al (а отже

гідрофобністю) призводять до збільшення на 50 % відгуків біосенсорів у порівнянні з відгуками біосенсорів на основі цеолітів Бета з меншим співвідношенням Si/Al. Втім, інші характеристики біосенсорів залишилися незмінними.

3.4. Адсорбція на цеолітах як альтернативний метод іммобілізації ферментів

Перспективним напрямком розробки біосенсорів є використання при іммобілізації методу адсорбції ферментів на цеолітах. В даному випадку, спочатку проводять закріплення цеолітів на поверхні перетворювачів, після чого наносять розчин ферменту і відбувається процес фізичної адсорбції молекул ферменту.

Глутаровий альдегід або інший зв'язуючий агент при застосуванні описаного методу не використовується що призводить до меншої інактивації ферменту під час іммобілізації, проте іммобілізація при цьому менш стабільна [138].

3.4.1. Розробка кондуктометричних біосенсорів на основі адсорбції ферментів на цеолітах

В процесі роботи було модифіковано поверхню кондуктометричних золотих перетворювачів різними мікро- та наночастинками цеолітів, і проведено адсорбцію уреазу на цих перетворювачах. В якості адсорбентів було використано низку цеолітів, таких як наноцеоліт Бета, силікаліт, мезопористі кремнієві сфери, цеоліт L, цеоліт LTA-4, цеоліт A, цеоліт Бета-50 (Рис. 3.7).

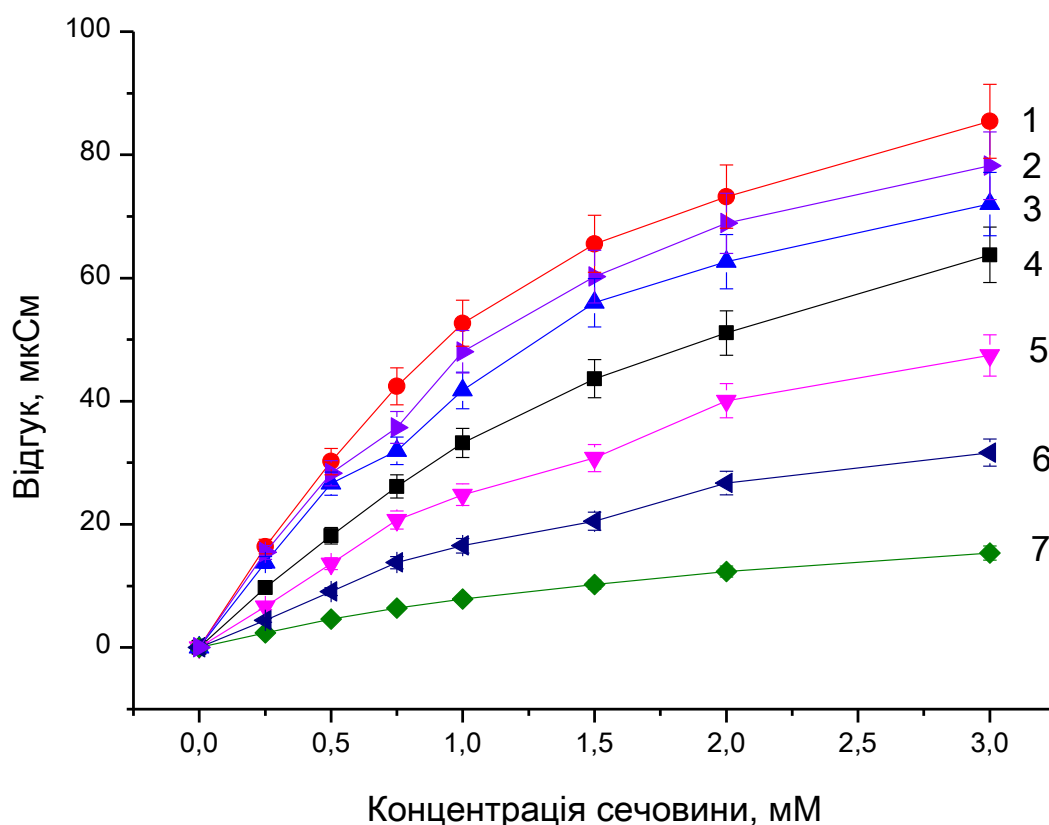


Рис. 3.7. Калібрувальні криві уреази біосенсорів на основі різних типів цеолітів: силікаліт (1), наноцеоліт Бета (2), мезопористі кремнієві сфери (3), цеоліт LTA-4 (4), цеоліт А (5), цеоліт Бета-50 (6) та цеоліт L (7). Концентрація цеолітів в мембрані – 5 %. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2.

Найкращі результати було отримано для біосенсора на основі уреазы, адсорбованої на силікаліті, лінійний діапазон визначення сечовини становив від 5 до 850 мкМ, час відгуку – 3-4 хв, відтворюваність відгуків одного біосенсора – 4 %.

Всі інші варіанти біосенсорів були цілком працездатними, проте більшість їх аналітичних характеристик були дуже близькими до характеристик біосенсорів на основі уреазы, іммобілізованої в БСА мембрану за допомогою глутарового альдегіду (без використання цеолітів). Єдиним винятком були біосенсори на основі цеоліту L, чутливість яких до

концентрацій сечовини в аналізованому розчині була щонайменше в 6 разів меншою за чутливість інших біосенсорів на основі інших цеолітів в мембрані.

Відтворюваність приготування біосенсорів, яка оцінювалась як розбіжність між відгуками різних варіантів електрохімічних біосенсорів на одну й ту ж концентрацію субстрату, була значно кращою при адсорбції уреазі на цеолітах ніж при іммобілізації в БСА мембрану за допомогою глутарового альдегіду. Це можна пояснити через складність, що виникає при нанесенні вручну, та не однакової товщини плівки ферменту в останньому випадку.

При адсорбції, навпаки, товщина шару цеоліту на перетворювачі є приблизно однаковою, і кожен раз на цеоліті адсорбується однакова кількість ферменту, що призводить до високої відтворюваності характеристик біосенсорів. Так, при іммобілізації уреазі в БСА мембрані за допомогою глутарового альдегіду, відносне стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів складало 23 %, а при адсорбції на силікаліті – 13 % (Рис. 3.8).

Недоліком адсорбції, як методу іммобілізації ферментів, вважається її нестійкість, через що фермент може поступово вимиватись у робочий розчин. Це, зазвичай, спричиняється слабкими зв'язками між адсорбентом та ферментом. Тому було перевірено стабільність уреазних біосенсорів протягом 10 днів. Біосенсори зберігали у холодильнику при температурі +4°C у сухому стані. За цей період зберігання відгуки біосенсорів зменшились на 10 %, що є гарним показником для ферментних біосенсорів, і не гіршим за результати, отримані при іммобілізації уреазі іншими методами.

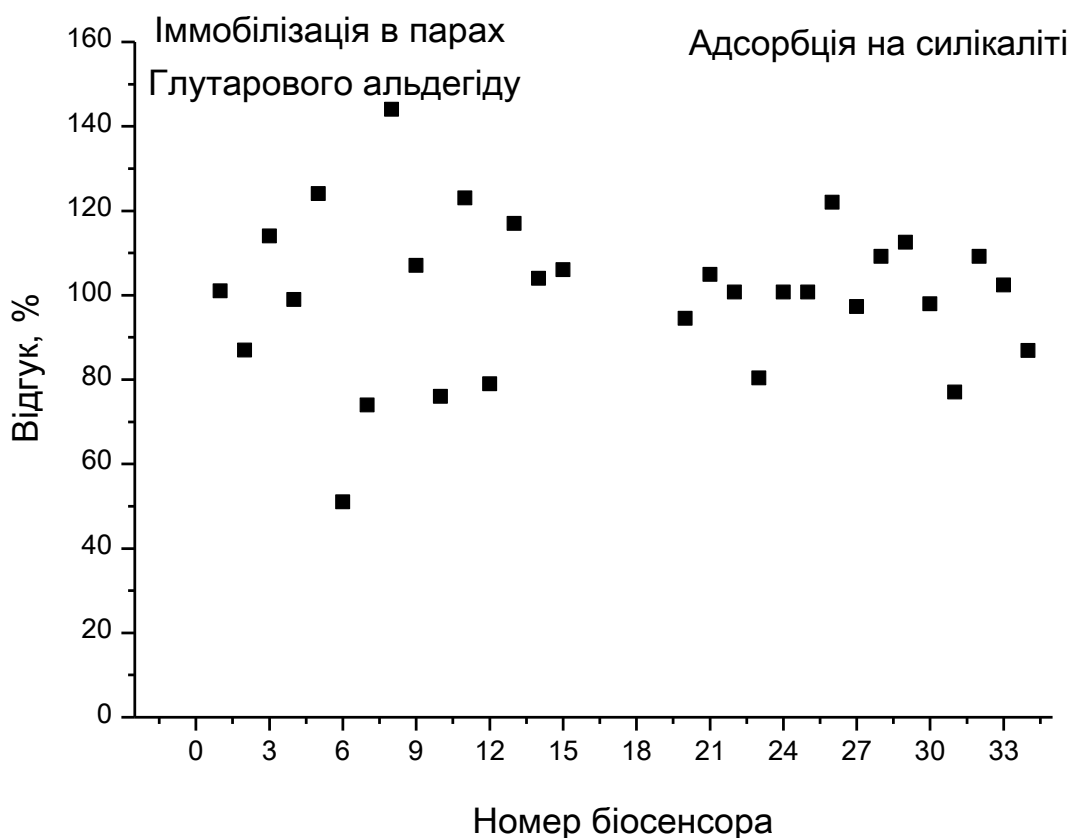


Рис. 3.8. Відгуки різних кондуктометричних біосенсорів, отримані при іммобілізації уреазі за допомогою глутарового альдегіду та адсорбції на силікаліті. Відгуки нормалізовані відносно середнього значення відгуків для кожного типу іммобілізації.

Оскільки, в попередньому розділі було отримано позитивні результати за рахунок використання при створенні біосенсорів адсорбції уреазі на силікаліті, було вирішено перевірити цю методику для біосенсорів на основі інших ферментів.

На наступному етапі роботи було проведено адсорбцію ряду ферментів на кондуктометричних перетворювачах, модифікованих силікалітом. В результаті було отримано робочі біосенсори для визначення глюкози (на основі ГОД), ацетилхоліну (на основі АцХЕ), сечовини (на основі рекомбінантної уреазі) та бутирилхоліну (на основі БуХЕ). Отримані калібрувальні криві, що представлені на рис.3.9, підтверджують широкі

можливості для виготовлення різних біосенсорів на основі ферментів, адсорбованих на цеолітах.

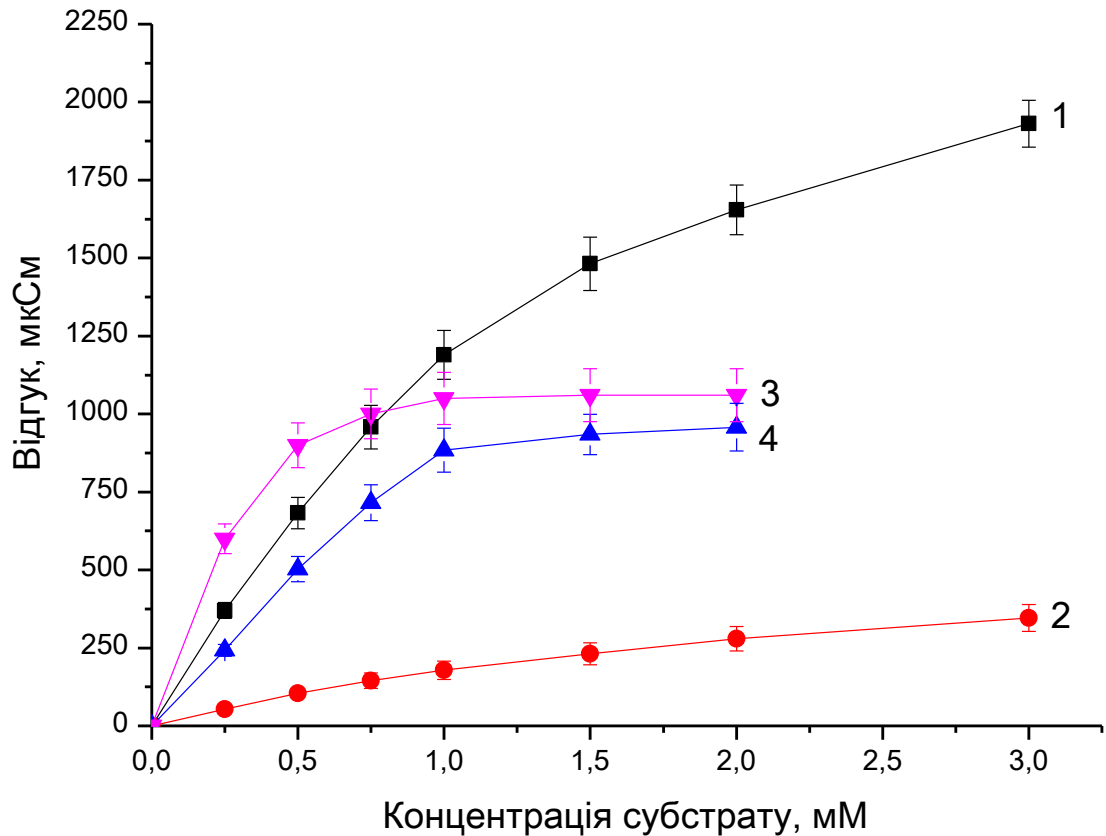


Рис. 3.9. Калібрувальні криві кондуктометричних біосенсорів на основі звичайної уреазы (1) та рекомбінантної уреазы (2), ацетилхолінестеразы (3) та глюкозооксидазы (4), адсорбованих на силікаліті.

Єдиним біосенсором, характеристики якого були гіршими ніж для біосенсора на основі іммобілізації в ГА, був біосенсор для визначення бутирилхоліну на основі БуХЕ, адсорбованої на силікаліті, ймовірно через погану здатність цього ферменту до адсорбції на даному носії. Таким чином, один тип цеолітів не може підходити за своїми фізико-хімічними властивостями (заряду поверхні, гідрофільності чи гідрофобності, розміру пор, тощо) для всіх ферментів одночасно. Отже, під час розробки кожного нового біосенсора, необхідно завжди перевіряти вплив різних цеолітів для

того, щоб обрати саме той тип цеоліту, який забезпечить роботу біосенсора найкращим чином.

3.4.2. Розробка амперометричних біосенсорів на основі ферментів, адсорбованих на цеолітах

Оскільки в попередній частині роботи, використання цеолітів при виготовленні кондуктометричних біосенсорів дало можливість отримати хороші результати, ці мікрочастинки було також використано для виготовлення амперометричних ферментних біосенсорів.

Для розробки біосенсора для визначення глутамату на основі глутаматоксидази, адсорбованої на цеоліті, необхідно було оптимізувати методику адсорбції ферменту. Кількість ферменту, що здатна адсорбуватися на перетворювачі, залежить, в першу чергу, від кількості сорбенту (цеоліту). На товщину шару цеоліту може впливати як концентрація самого цеоліту, так і час формування цього шару.

Для дослідження такого впливу, процедуру нанесення 5 % цеоліту на перетворювач проводили за різного часу нагрівання в печі до 150 °С (від 10 до 960 с). Застосування різного часу нагріву перетворювача, вкритого шаром цеоліту, давало змогу контрольовано збільшувати кількість цеоліту на перетворювачі та дослідити, як саме цей параметр впливає на кінцеву чутливість біосенсора до глутамату (1 мМ).

Залежність відгуків біосенсора від часу нагрівання цеоліту на поверхні електроду представлена на рис. 3.10. Як видно з рис. 3.10, час формування шару цеоліту на поверхні платиногового електроду має бути щонайменше 60-90 секунд.

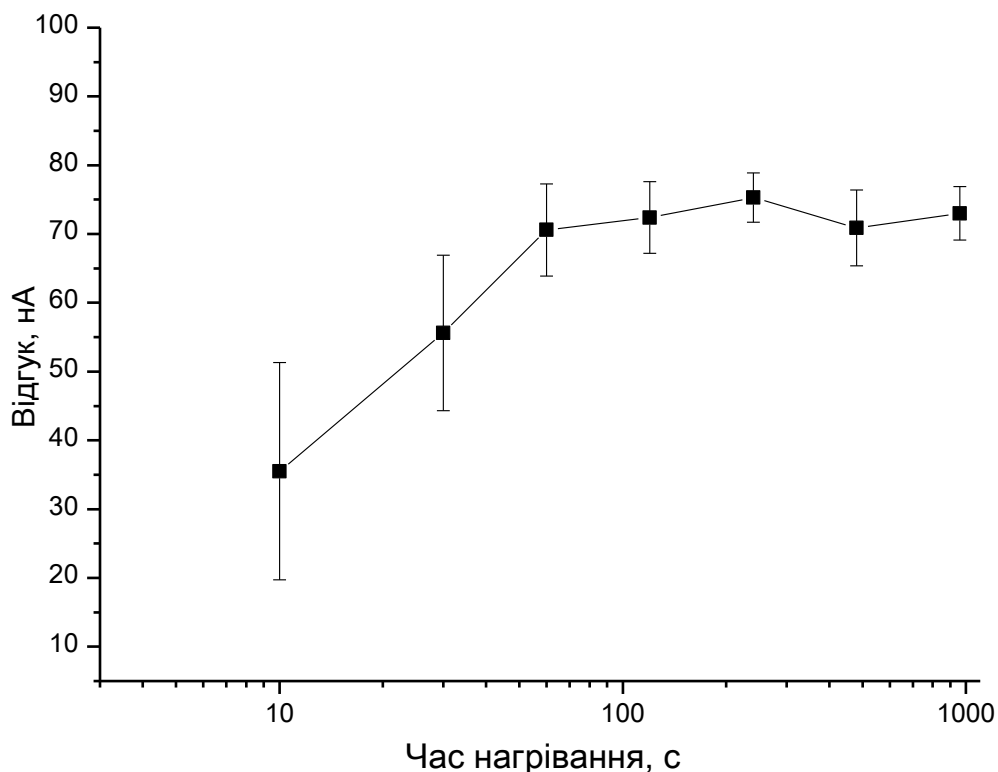


Рис. 3.10. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГЛОД, адсорбованої на силікаліті, від часу нанесення силікаліту на амперометричний перетворювач на основі платинового диску. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ

Далі необхідно було визначити, яка концентрація цеоліту, при формуванні шару на поверхні амперометричного перетворювача на основі дискового платинового електрода, буде оптимальною для адсорбції саме ГЛОД (рис. 3.11).

Нанесення 2,5 % цеоліту значно збільшувало активність біоселективного елементу в порівнянні з нанесенням 0,25 % цеоліту, однак подальше збільшення концентрації вже не давало значного ефекту. Тому, в наступних дослідженнях ГЛОД адсорбовували на дискові платинові електроди, вкриті шаром 2,5 % цеоліту.

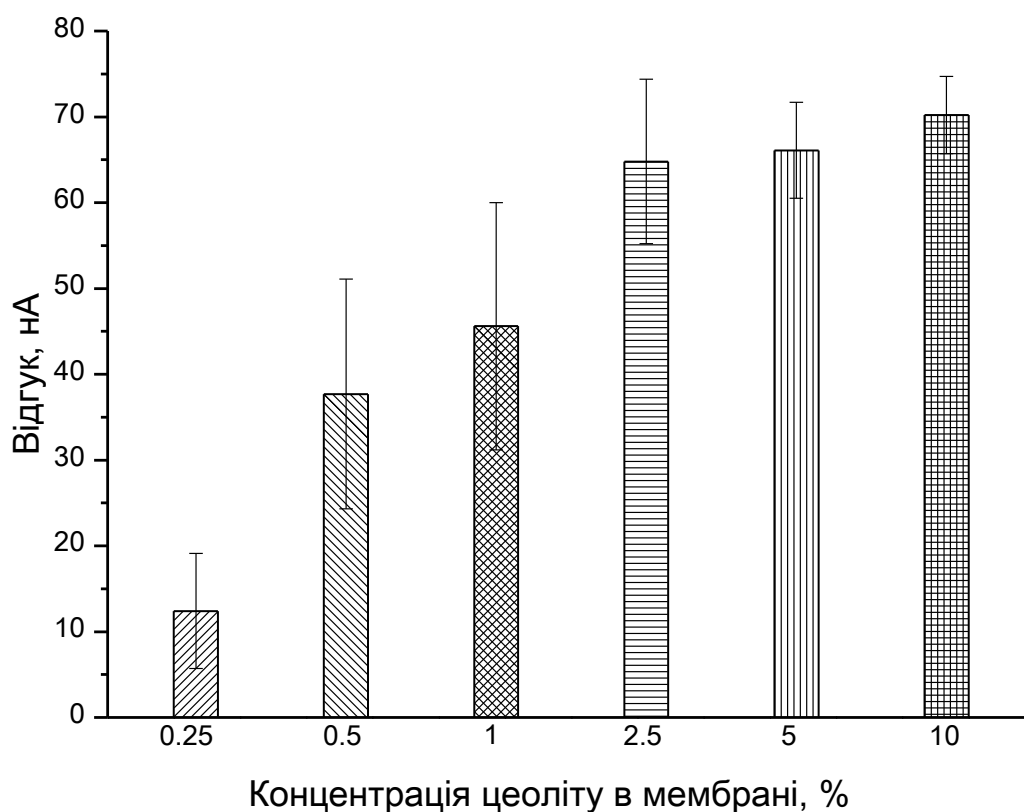


Рис. 3.11. залежність відгуку біосенсора на основі ГЛОД від концентрації цеоліту що нанесено на поверхню перетворювача. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4; при постійному потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ

Метою наступного етапу роботи було підібрати оптимальні умови адсорбції ГЛОД на силікаліті, оскільки очікувалась значна залежність ефективності адсорбції від її часу та концентрації ферменту. Ефективність адсорбції ГЛОД оцінювалась за величиною відгуків біосенсора. Показано що, в діапазоні часу адсорбції 2-30 хв, величина відгуків біосенсора була приблизно однаковою. Тому за оптимальний час адсорбції було прийнято 5 хв, оскільки цього часу було достатньо для повного висихання краплі з ферментом, що наносилась на перетворювач.

Більш значні ефекти були отримані при зміні концентрації ферменту в процесі формування мембрани. На рис. 3.12 приведено результати експериментів по вивченню впливу концентрації ГЛОД при формуванні біоселективних мембран на величину відгуків біосенсора.

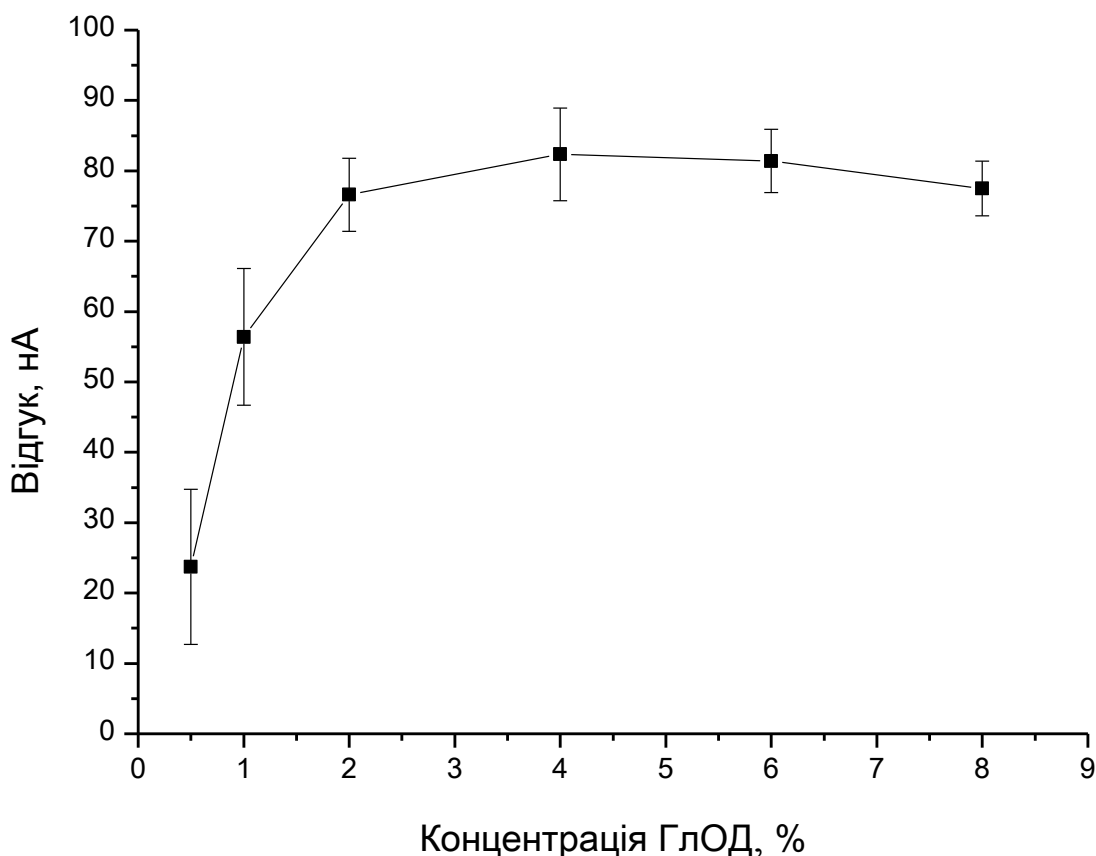


Рис. 3.12. Залежність відгуків біосенсора на основі ГЛОД, адсорбованої на цеоліті, від концентрації ферменту у вихідному розчині в процесі нанесення мембран. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ

При збільшенні концентрації ферменту в біоселективній мембрані до 2 %, збільшувався і відгук біосенсора на глутамат. При використанні концентрації ферменту 4%, відгук був найбільшим. Але, різниця відгуків між 2% і 4% становила менше 7%, що в даному випадку не є вирішальною

різницею, а кількість використаного фермента була вдвічі більшою. Беручи до уваги високу вартість ГлОД, було вирішено використовувати концентрацію ферменту 2 % на поверхні амперометричного перетворювача, вкритого шаром силікаліту.

Після оптимізації методики покриття амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електроду шаром цеоліту та адсорбції ГлОД, було перевірено основні аналітичні характеристики отриманого біосенсора для визначення глутамату.

Для того, щоб продемонструвати роботу біосенсора в оптимальних умовах, на рис. 3.13, представлена типова реакція біосенсора на внесення 20 мкМ глутамату у вимірювальну комірку.

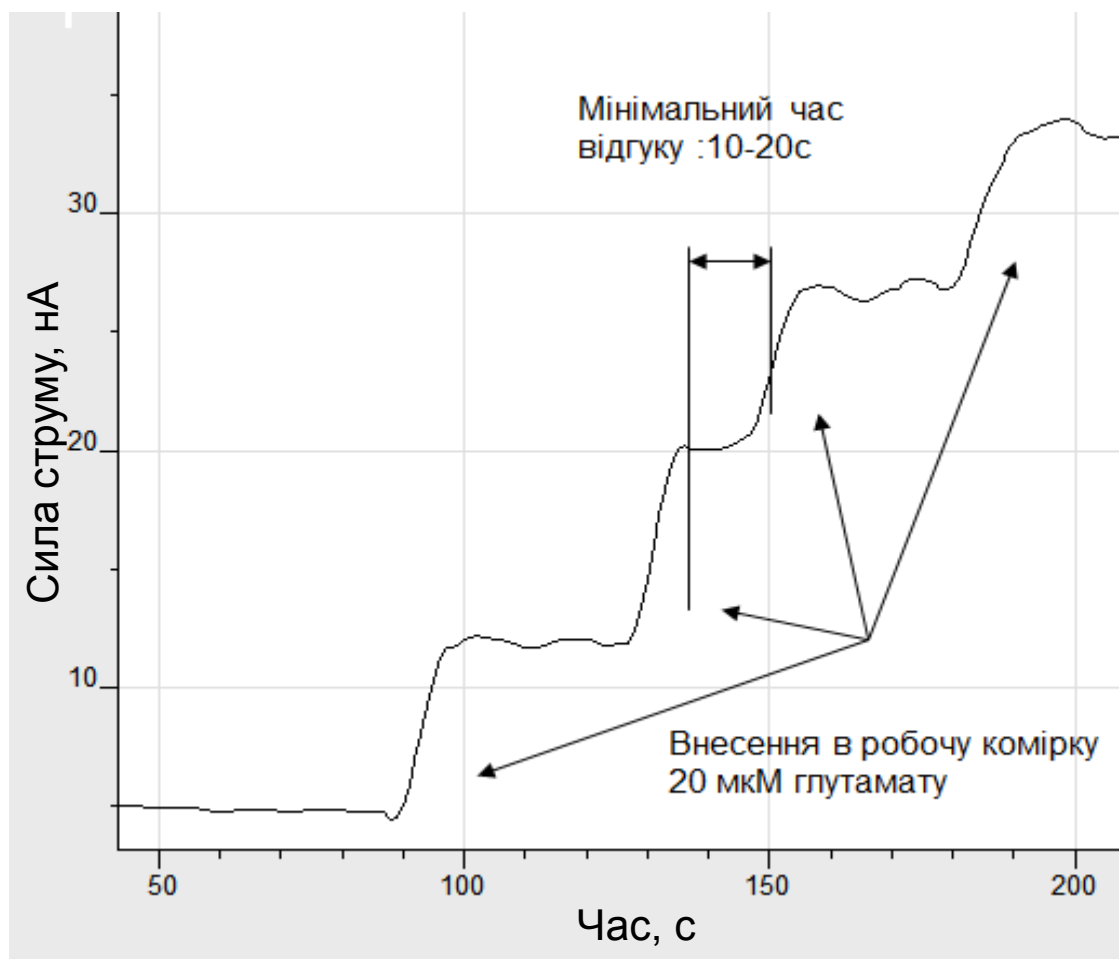


Рис. 3.13. Типові відгуки амперометричного біосенсора на основі ГлОД адсорбованої на силікаліті, на 20 мкМ глутамату. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4; при сталому потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Як видно з рис. 3.13, отримані відгуки були достатньо виразні з невеличким шумом базової лінії. Час відгуку складав 20-30 с. Мінімальна границя визначення глутамату становила 0,5 мкМ.

Типова калібрувальна крива біосенсора на основі ГЛОД, адсорбованої на силікаліті, показана на рис. 3.14.

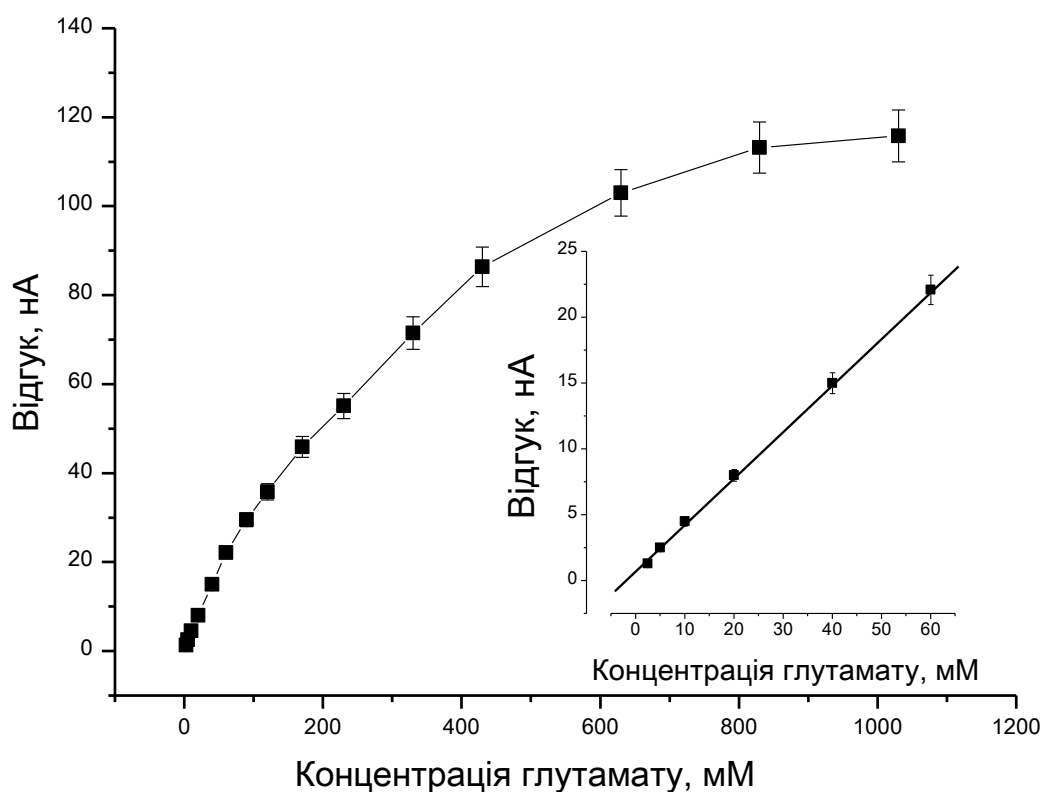


Рис. 3.14. Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі ГЛОД, адсорбованої на силікаліті, для визначення глутамату. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, при сталому потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як видно з рисунку, діапазон лінійних концентрацій становив 2,5–400 мкМ. Чутливість до глутамату становила 0,5 нА/мкМ. Типовий біосенсор мав границю визначення глутамату 0,5 мкМ (концентрація глутамату, що

відповідає сигналу біосенсора у три рази більшому за рівень шуму базової лінії).

Для роботи біосенсора дуже важливими є такі характеристики як відтворюваність та операційна стабільність сигналу. Для визначення відтворюваності відгуків біосенсора на основі ГЛОД, адсорбованої на силікаліті, впродовж робочого дня отримували відгуки на дві концентрації глутамату (0,5 та 1 мМ) з інтервалом у 20 хв, при цьому увесь час між вимірюваннями сенсор залишався у буфері при постійному перемішуванні (рис. 3.15).

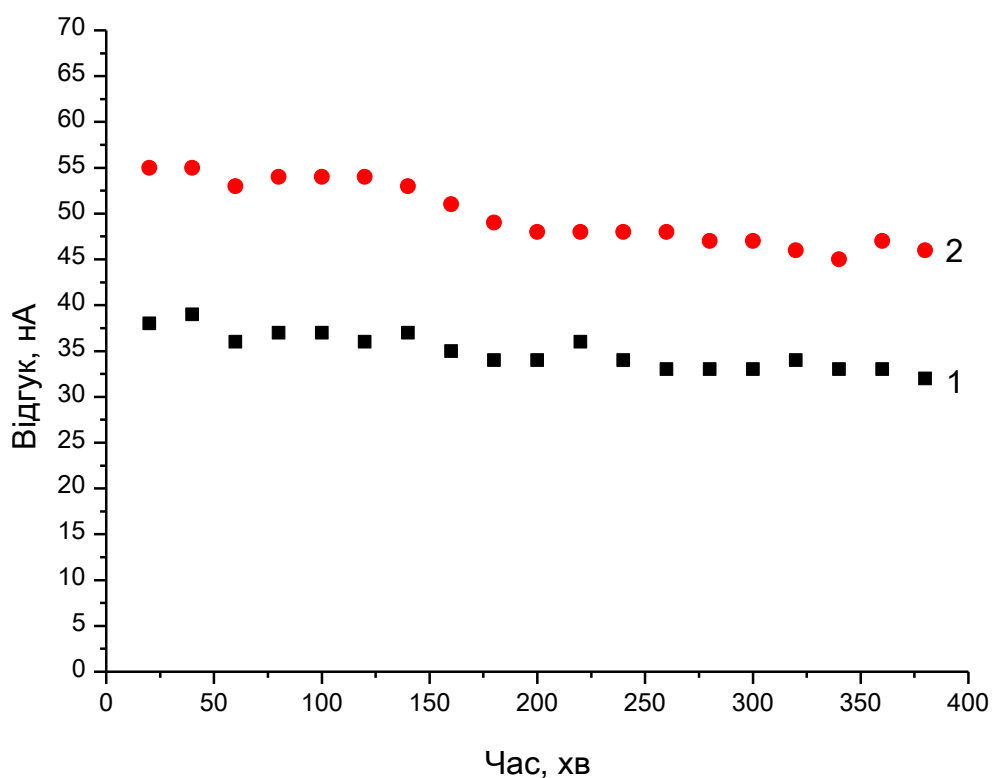


Рис. 3.15. Відтворюваність відгуків біосенсора при внесенні 0,5 мМ (1) та 1 мМ (2) глутамату протягом одного робочого дня. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4; при сталому потенціалі +0,6 відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Похибка при вимірюваннях глутамату становила 5,7 % та 6,9 %, відповідно.

З метою дослідження операційної стабільності біосенсора, щоденно впродовж 4-х днів отримували по 9 послідовних відгуків на 1 мМ глутамату. При цьому розроблений біосенсор на основі ГЛОД, адсорбованої на силікаліті, весь час між вимірюваннями залишався у буфері за постійного перемішування, а після серії з 9-и вимірів, біосенсор у сухому стані поміщали в холодильник (+4 °С). Як можна побачити з рис. 3.16, біосенсор протягом 4-х днів характеризувався високою операційною стабільністю.

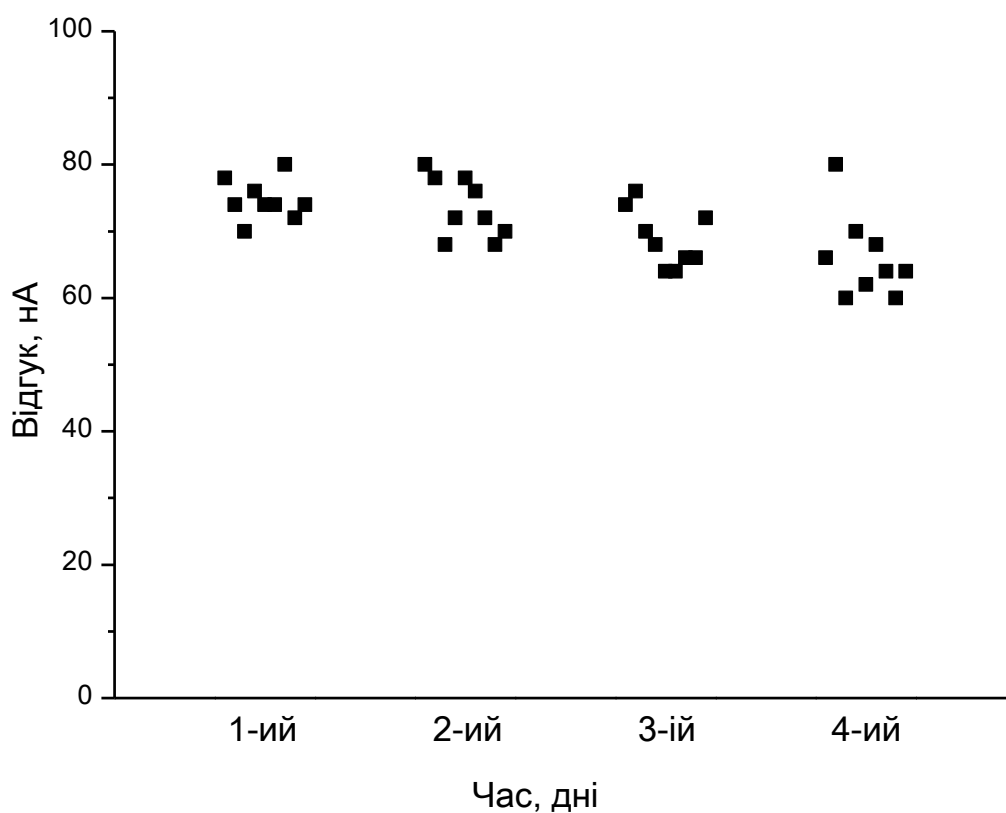


Рис. 3.16. Операційна стабільність відгуків біосенсора при внесенні 1 мМ глутамату протягом чотирьох робочих днів. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4; при сталому потенціалі + 0,6 відносно Ag/AgCl електрода порівняння

В роботі було перевірено можливість використання адсорбції ферментів при роботі з амперометричними планарними перетворювачами на основі нікелевих електродів, нанесених на підкладку. Через особливості

будови перетворювачів, пряме нанесення цеоліту на чутливу поверхню не проводили, а мікрочастинки були нанесені на проміжний шар з поліетиленіміну (дивись розділ 2.4.2). На модифіковані таким чином перетворювачі адсорбували глюкозооксидазу. Крім того, з використанням такого ж методу, перетворювачі було покрито наноцеолітом Бета в якості адсорбента ГОД. Нанорозмірні цеоліти - це група цеолітів, до якої відносять частинки з розміром кристалів менше 100 нм. Їх будова нагадує структуру більших мікророзмірних цеолітів, але наноцеоліти характеризуються кращим співвідношенням корисна поверхня/ розмір [139, 140]. Для порівняння використовували біосенсор на основі ГОД, іммобілізованої в БСА мембрані у парах ГА. Калібрувальні криві усіх трьох типів біосенсорів приведено на рис. 3.17.

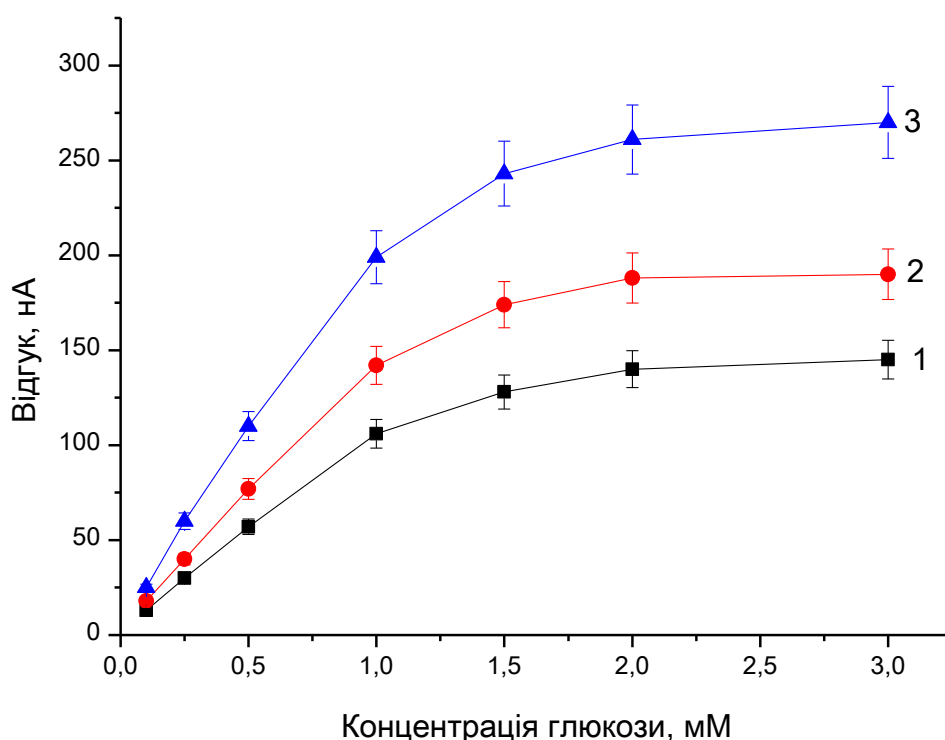


Рис. 3.17. Калібрувальні криві амперометричного біосенсора для визначення глюкози на основі глюкозооксидази, іммобілізованої в БСА мембрані за допомогою глутарового альдегіду (1), або адсорбованої на силікаліті (2) чи наноцеоліті Бета (3).

Як виявилось, отримані біосенсиори на основі цеолітів мали чутливість більшу, ніж біосенсиори на основі ГОД, іммобілізовані в парах ГА, що співпадає з результатами, отриманими для амперометричних біосенсорів на основі ГлОД.

3.4.3. Розробка потенціометричних біосенсорів на основі ферментів, адсорбованих на цеолітах

На наступному етапі роботи було перевірено перспективність використання методу іммобілізації біоселективного елементу на основі адсорбції ферментів на цеолітах для створення потенціометричних біосенсорів.

Спершу, поверхню потенціометричних перетворювачів було покрито шаром силікаліту шляхом його нанесення при високій температурі, аналогічно до модифікації кондуктометричних та амперометричних перетворювачів. Однак, необхідно відмітити, що через більш складну будову потенціометричних перетворювачів, їх нагрівання до температур вище +100 °С є небажаним і, призводить до погіршення їхніх аналітичних характеристик. Окрім того, прикріплення цеолітів, за методикою, що використовувалась для модифікації кондуктометричних та амперометричних перетворювачів, було досить нестійким і погано відтворюваним. Тому, було застосовано альтернативну методику нанесення цеолітів на поверхню перетворювача, яка була використана для нікелевих амперометричних перетворювачів (розділ 2.4.2).

На модифіковані в такий спосіб перетворювачі наносили розчин уреаз, після чого, відбувалась адсорбція ферменту. Було розроблено низку уреазних біосенсорів на основі цеолітів. Результати порівнювались з даними, отриманими за допомогою біосенсорів, виготовлених за традиційною методикою, а саме - іммобілізацією ферменту в парах ГА. Порівняльні дані

(мінімальна границя визначення, лінійний діапазон, похибка відтворюваності сигналу, похибка відтворюваності приготування біосенсорів, та час відгуку) для біосенсорів на основі різних типів іммобілізації представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів, розроблених з використанням різних типів іммобілізації уреаз

Параметр	Тип іммобілізації		
	В парах ГА	Адсорбція на поверхні силікаліту	Адсорбція на поверхні наноцеоліту Бета
Границя визначення, мкМ	5	1,5	1,5
Похибка відтворюваності сигналу, %	9,6	4,7	3,4
Похибка відтворюваності приготування біосенсорів, %	25,5	17,4	17,8
Лінійний діапазон роботи, мМ	0 - 1,5	0 - 1,5	0 - 1,0
Час відгуку, с	120	30	55

Отримані дані показують, що адсорбція на цеолітах може сприяти покращенню чутливості, зменшенню похибки відтворюваності сигналу та часу відгуку біосенсора. Найкращою відтворюваністю сигналів характеризувались біосенсори на основі наноцеоліту Бета. Найменшим часом відгуку – біосенсори на основі силікаліті.

Таким чином, методика адсорбції ферментів на моношарах цеолітів дозволяє, з одного боку, уникати використання токсичних речовин (глутаровий альдегід та ін.) при іммобілізації, а з іншого - отримувати потенціометричні біосенсори з покращеними аналітичними характеристиками.

Отримані потенціометричні біосенсори на основі уреазу були схожими за своїми робочими характеристиками до кондуктометричних біосенсорів на основі уреазу, адсорбованої на цеолітах. Як і раніше, відтворюваність приготування біосенсорів була значно кращою при адсорбції уреазу на цеолітах (розбіжність 17,7 % між відгуками різних біосенсорів), а ніж при іммобілізації уреазу за допомогою глутарового альдегіду (розбіжність 25,5 %).

3.5. Підсумки

В роботі було досліджено різні варіанти створення ферментних біосенсорів з використанням цеолітів та порівняно результати з біосенсорами на основі ферментів, іммобілізованих традиційним методом, а саме – зшиванням молекул ферменту та БСА за допомогою глутарового альдегіду. Встановлено, що ко-іммобілізація цеолітів та ферментів у складі біоселективного елемента біосенсора не має суттєвих переваг перед традиційною іммобілізацією за допомогою глутарового альдегіду, окрім певного незначного покращення чутливості біосенсорів на основі цеолітів до субстратів.

Набагато перспективнішим виявилось застосування методу адсорбції ферментів на цеолітах при створенні біосенсорів. Було показано можливість використання цеолітів як адсорбентів різних ферментів, при виготовленні біосенсорів на основі трьох типів перетворювачів (кондуктометричних, амперометричних та потенціометричних). Зокрема, силікаліт був успішно використаний як адсорбент для уреазу, глюкозооксидази, глутаматоксидази та ацетилхолінестерази, причому створені біосенсори мали кращі характеристики, ніж отримані при застосуванні традиційного методу іммобілізації. Слід підкреслити переваги методу адсорбції ферментів на цеолітах при виготовленні біосенсорів – простоту і швидкість виконання, високий рівень відтворюваності приготування біосенсорів, а також

відсутність необхідності у використанні токсичних сполук. Дані переваги є особливо важливими для процесу стандартизації біосенсорів та подальшому їх масовому виробництві. Відповідно отримані результати свідчать про перспективність розроблених біосенсорів для впровадження та практичного використання.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

- 1) **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Kasap BO, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. Novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(260):1-8. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного біосенсора для визначення глутамату з використанням адсорбції глутаматоксидази на силікаліті)*
- 2) **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Dudchenko OY, Akata Kurç B, Dzyadevych SV. Development of electrochemical biosensors with various types of zeolites *Applied Nanoscience Int.*2018.doi: 10.1007/s13204-018-0725-9. *(Особистий внесок здобувача: використання цеолітів при виготовленні трьох типів електрохімічних ферментних біосенсорів)*
- 3) Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Akata B, Dzyadevych SV. Biosensor based on urease, adsorbed on silicalite. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 4-5.
- 4) **Soldatkina OV**, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B, Dzyadevych SV. Zeolite as a perspective material for amperometric biosensor creation. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-

Хмельницький. Переяслав-Хмельницький: Переяслав-Хмельницький
государственный педагогический университет имени Григория Сковороды;
2015, с. 3-4.

5) Soldatkin OO, Kasap BO, **Soldatkina OV**, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. A novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2016), 2016 Aug 24-27; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016, p. 503.

6) **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Кучеренко ІС, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі уреазі адсорбованої на силікаліті для визначення сечовини. 5-а Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2016 трав. 12-13; Київ. Київ: Компринт; 2016, с. 123-124.

7) Soldatkin OO, Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Dzyadevych SV. Analysis of using various modifications of zeolites in electrochemical biosensors. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2017), 2017 Aug 23-26; Chernivtsi. Kyiv: SME Burlaka, 2017, p. 659.

РОЗДІЛ 4

ПОКРАЩЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ПЕРЕТВОРЮВАЧА ЗА РАХУНОК ВИКОРИСТАННЯ НАНОРОЗМІРНИХ ФЕНІЛЕНДІАМІНОВИХ ПЛІВОК

4.1. Проблема селективності амперометричних перетворювачів та варіанти її вирішення

Важливою аналітичною характеристикою біосенсорів є селективність, а саме здатність визначати лише одну цільову сполуку, і не реагувати на інші речовини. Селективність біосенсора визначається двома складовими – селективністю біологічного матеріалу та селективністю перетворювача [141]. Зазвичай, в електрохімічних біосенсорах використовують селективний біоматеріал (ферменти чи антитіла), але перетворювачем є електрод, який за своєю природою є відносно неселективним. Селективність біосенсора є важливим фактором при роботі зі зразками біологічних рідин. Отже, дослідження та покращення селективності біосенсора до можливих інтерферуючих сполук є обов'язковим етапом роботи при розробці біосенсорів будь-якого типу.

В електрохімічних амперометричних біосенсорах проблемою є можливе окиснення або відновлення ряду різних електроактивних сполук на поверхні електроду, що призводить до похибок сигналу біосенсора. В біологічних зразках, таких як сироватка крові, сеча, спинномозкова рідина, тощо, присутні речовини, які можуть вступати в електрохімічні реакції на поверхні перетворювача, спричиняючи утворення помилкового сигналу біосенсора, що, в свою чергу, призводить до помилкових (завищених) результатів біосенсорних вимірювань [142].

Такі речовини називаються інтерферуючими речовинами або інтерферентами. У випадку амперометричних біосенсорів, головними інтерферентами виступають електроактивні речовини, які здатні

окиснюватись на робочому електроді і генерувати струм. Основними інтерферентами в біологічних зразках є наступні речовини: аскорбінова кислота, цистеїн, гомоцистеїн, сечова кислота, дофамін, глутатіон, та інші. Їх концентрації в сироватці крові наведені в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Концентрація деяких електроактивних речовин в сироватці крові
людини**

Речовина	Концентрація в сироватці крові	Посилання
Аскорбінова кислота	10,2 - 101 мкМ	[143]
Цистеїн	255,9 - 317,3 мкМ	[144]
Загальний гомоцистеїн	6,8 - 17,0 мкМ	[144]
Сечова кислота	120 - 450 мкМ	[145], [146]
	202,3 - 416,5 мкМ (чоловіки) 142,8 - 339,2 мкМ (жінки)	[147]
Дофамін	0,01 - 1 мкМ	[148]
	1 нМ (здорові люди) 0,9-6 мкМ (хворі з хворобою Паркінсона, яких лікували L-dopa)	[149]
Загальний глутатіон	5,8 ± 0,9 мкМ	[144]
Відновлений глутатіон	1,6 ± 0,3 мкМ	[144]
Фолієва кислота	0,016 – 0,023 мкМ	[144]

Існує два основних напрямки щодо запобігання окисненню інтерферуєчих речовин на електродній поверхні: зменшення робочого потенціалу за рахунок модифікації електроду та введення до складу біоселективної мембрани додаткових речовин, або нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до поверхні електрода цільову речовину [150].

Досить часто в біосенсорах використовуються ферменти класу оксидаз, які в процесі роботи утворюють перекису водню. Ця сполука окислюється, чи відновлюється на електроді, за рахунок чого, генерується сигнал біосенсора [151]. Тому, актуальним питанням є розробка напівпроникних плівок, які б були здатні пропускати до поверхні електроду пероксид водню і запобігати проникненню інших речовин. Серед таких мембран, значну увагу привертають полімерні плівки на основі *m*-фенілендіаміну. Ця мембрана утворює пори, розмір яких є достатнім для проходження низькомолекулярних сполук, зокрема перекису водню, до поверхні електрода, та недостатнім - для проходження туди більших за розміром речовин.

Було запропоновано різні методики формування поліфенілендіамінових мембран з різними термінами приготування та потенціалами окиснення *m*-фенілендіаміну [152, 153, 154, 155]. Але відомі методики є досить складними, а іноді, навіть, суперечать одна іншій.

Тому, метою даного фрагменту роботи було порівняти різні відомі з літературних джерел методики нанесення *m*-фенілендіаміну, підібрати оптимальні умови, і розробити нову методику нанесення *m*-фенілендіаміну саме на дисковій платиновій перетворювачі.

4.2. Дослідження чутливості перетворювача до електроактивних речовин без додаткової мембрани

Для того, щоб зрозуміти доцільність нанесення додаткової мембрани для покращення селективності амперометричного перетворювача, необхідно було перевірити його чутливість та селективність до перекису водню відносно можливих інтерферентів.

Для перевірки було використано електроактивні речовини в концентраціях, що зустрічаються в сироватці крові, оскільки, використання біосенсорів при роботі з даним типом реальних зразків є дуже поширеним.

На першому етапі роботи було отримано відгуки перетворювача без додаткових мембран на додавання електроактивних речовин (рис 4.1).

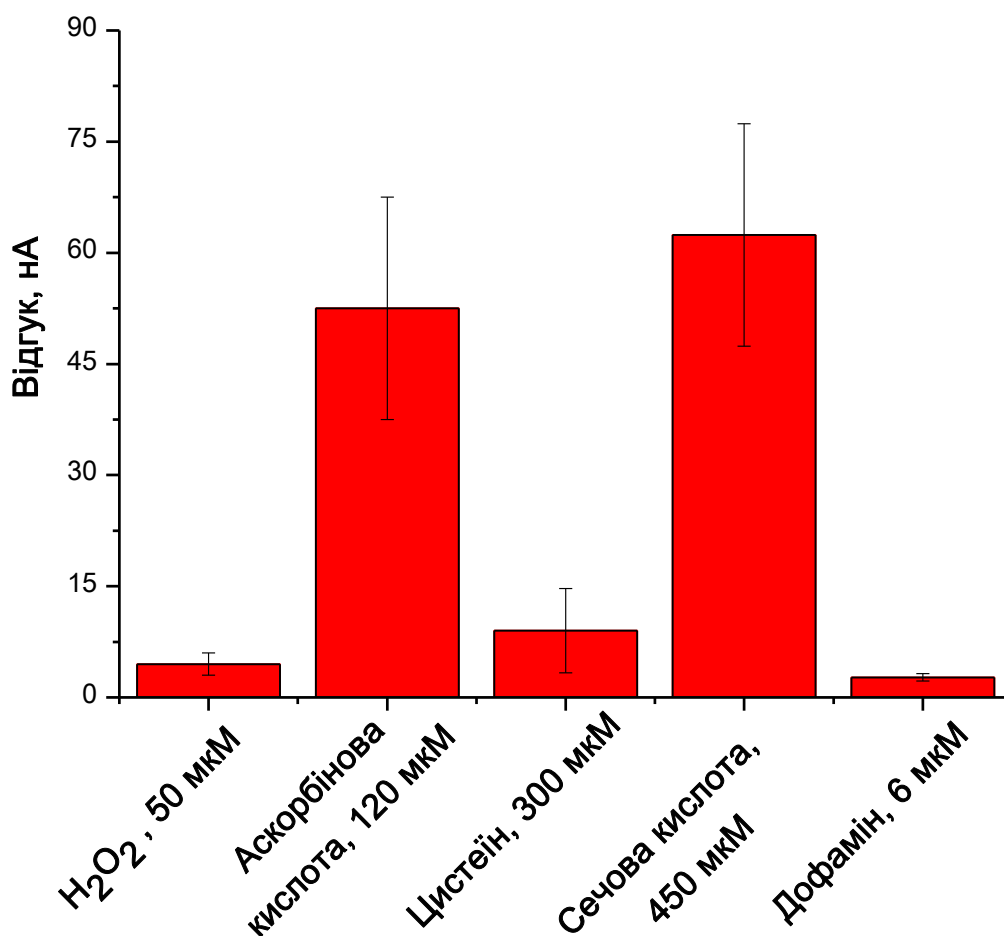


Рис. 4.1. Величини відгуків платинових дискових перетворювачів на додавання електроактивних речовин без ПФД мембрани. Відгуки отримані в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Також була врахована чутливість (нА/мМ) перетворювача до інтерферентів без нанесення додаткової ПФД мембрани (рис 4.2).

Як видно з рисунків, перетворювач проявляв найбільшу чутливість до аскорбінової кислоти та дофаміну. Чутливість до цистеїну була найменшою. Втім, зважаючи на велику різницю у концентраціях електроактивних речовин в біологічних зразках, зокрема крові, головними інтерферентами можна вважати аскорбінову та сечову кислоти – їх концентрації у

біологічних зразках є досить великими, і величина відгуку перетворювача на ці речовини є на порядок вищою за відгук на цільову речовину – пероксид водню. Таким чином, проводити вимірювання біологічних зразків неможливо без зменшення впливу інтерферентів на роботу перетворювача

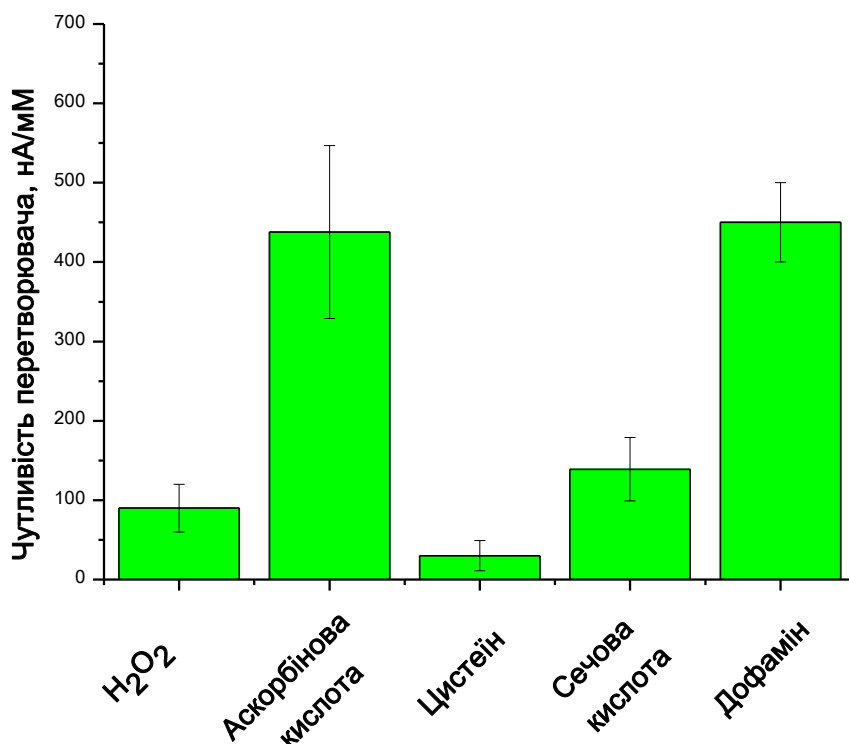


Рис. 4.2. Чутливість платинового дискового перетворювача без мембран до електроактивних речовин в 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4.3. Вплив розведення біологічного зразка при роботі з амперометричними біосенсорами

Біосенсори можуть бути використані як для проведення вимірювань в нерозведених зразках, так і при їх розведенні. Необхідність розведення зразка залежить від концентрації досліджуваної речовини, чутливості та лінійного діапазону роботи біосенсора. Якщо характеристики біосенсора дозволяють визначити концентрацію речовини в декілька десятків разів меншу за наявну в зразку, то, зазвичай, проводять розведення зразку, щоб

зменшити вміст інтерферуючих речовин, і таким чином, підвищити точність аналізу. Також, розведення зразку дозволяє зменшити в десятки разів необхідний об'єм зразку. З іншого боку, інколи концентрація досліджуваної речовини у пробі занадто мала для розведення, або ж розведення є небажаним з технічних причин.

Тому, для того, щоб краще зрозуміти, як електроактивні речовини, що можуть бути присутні в біологічному зразку, впливають на роботу амперометричного перетворювача, було використано три різні концентрації електроактивних речовин: концентрації, що зустрічаються у сироватці крові (1), концентрації, в 20 разів менші за наявні в сироватці крові (2), тобто концентрації після 20-кратного розведення зразків; та за 100-кратного розведення (3). Відповідно, на першому етапі роботи було отримано відгуки перетворювача на додавання трьох концентрацій електроактивних речовин, та вирахована чутливість перетворювача до вибраних електроактивних речовин перед нанесенням додаткової ПФД мембрани (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Величина відгуків та чутливість платинового дискового перетворювача до деяких електроактивних речовин за різного розведення зразку

Речовина	Нерозведений зразок	20-кратне розведення зразку		100-кратне розведення зразку		Чутливість, нА/мМ
		Конц. речовини, мМ	Відгук, нА	Конц. речовини, мМ	Відгук, нА	
1	2	3	4	5	6	7
Аскорбінова кислота	52,5 ± 25,1	6	2,7 ± 1,1	1,2	0,4 ± 0,2	438 ± 209
Цистеїн	9,0 ± 5,7	15	0,5 ± 0,3	3	0,1 ± 0,1	30 ± 19

1	2	3	4	5	6	7
Сечова кислота	$62,4 \pm 31,2$	22,5	$3,0 \pm 1,4$	4,5	$0,6 \pm 0,2$	139 ± 70
Дофамін	$2,7 \pm 0,5$	0,3	$0,1 \pm 0,1$	0,06	0	450 ± 83

З даних, наведених в таблиці, видно, що перетворювач був найбільш чутливим до таких речовин, як аскорбінова кислота та дофамін, в той час як чутливість до цистеїну була найменшою. З іншого боку, після проведення 100-кратного розведення, відгуки на цистеїн і дофамін стали незначними, а загальна величина відгуків на всі інтерференти становила приблизно 20% відгуків на пероксид водню, що говорить про те, що в деяких випадках сенсор може використовуватися навіть без додаткової модифікації.

4.4. Вибір оптимального методу нанесення ПФД мембрани на перетворювач

На даний момент існує розрізнена інформація стосовно методів формування ПФД мембран на поверхні перетворювача. Електрополімеризація *m*-фенілендіаміну під час циклічних вольтамперограм та при постійному потенціалі відбувається різними шляхами полімеризації, а механізм полімеризації є досить складним [156]. При циклічній вольтамперометрії використовується високий потенціал, що призводить до утворення менш кон'югованих олігомерів фенілендіаміну. Через це передбачалось, що полімеризація *m*-фенілендіаміну за допомогою циклічних вольтамперограм призведе до утворення пор більшого розміру і підвищеної проникності ПФД шару порівняно з полімеризацією при постійному потенціалі [157, 158]. Проте, різні автори прийшли до суперечливих висновків щодо кращого методу нанесення *m*-фенілендіаміну, і в багатьох випадках застосування циклічних вольтамперограм давало досить непогані результати.

Тому, важливо було встановити, яка саме методика є найбільш перспективною для формування додаткових мембран на основі ПФД при створенні біосенсорів на основі платинових дискових електродів. Відповідно, формування ПФД мембрани проводили шляхом електрополімеризації молекул мономера (*m*-фенілендіаміну) на поверхні платинового дискового електроду двома найбільш розповсюдженими та перспективними методами: при змінному потенціалі (циклічна вольтамперометрія) та при постійному потенціалі.

Для проведення циклічної вольтамперометрії робочі перетворювачі разом з електродом порівняння та допоміжним електродом розміщували в робочій комірці з розчином *m*-фенілендіаміну, після чого отримували певну кількість циклічних вольтамперограм [159] Приклад отриманих вольтамперограм наведений на рис. 4.3.

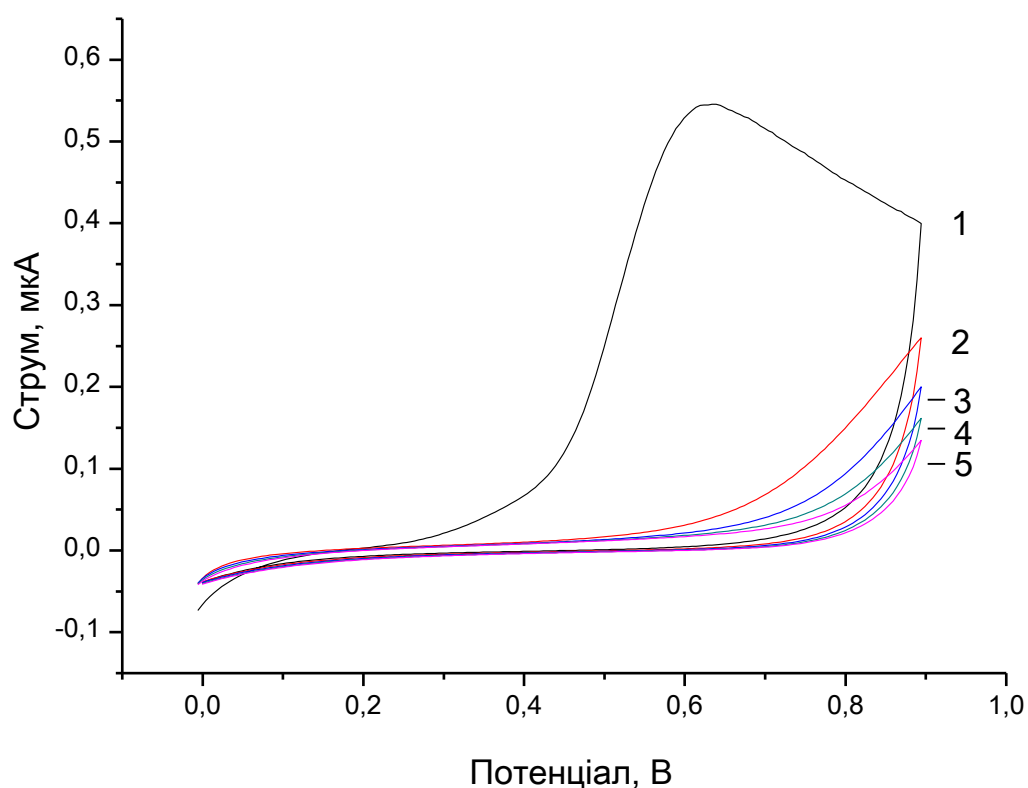


Рис. 4.3. Циклічні вольтамперограми, отримані шляхом електрополімеризації *m*-фенілендіаміну на поверхні перетворювача

Під час першої вольтамперограми мало місце значне збільшення струму в діапазоні потенціалів від +0,5 В до +0,9 В, викликане окисненням *m*-фенілендіаміну. Під час другої та наступних вольтамперограм, сила струму значно зменшується, що свідчить про зменшення швидкості електрополімеризації. Втім, ПФД мембрана продовжує формуватися протягом всіх циклічних вольтамперограм.

Другий метод нанесення ПФД мембрани, полягає в окисненні фенілендіаміну на поверхні платинових електродів при постійному потенціалі протягом певного часу [160]. Порівняння відгуків перетворювачів з мембранами, нанесеними обома методами, на пероксид водню та інтерферуючі речовини наведено на рис. 4.4. Оскільки відгуки на інтерференти були практично відсутні, це свідчить, що мембрана, нанесена обома методами, непогано затримувала інтерференти – залишалась лише невелика чутливість до цистеїну.

З іншого боку, чутливість перетворювача до пероксиду водню після проведення вольтамперометрії зростала в 2,6 рази. Це пояснюється електроактивацією платини, яка виступає чутливою областю перетворювача під час вольтамперометрії, а не ефектом від нанесення ПФД мембрани. При нанесенні мембрани при постійному потенціалі, електроактивації платини не відбувалось, і відгуки на пероксид водню залишались незмінними. Таким чином, використання циклічної вольтамперометрії виявилось більш ефективним, як мінімум, з трьох причин – менша кількість часу необхідна для покриття одного електроду (15 хвилин проти 40 хв), більш ефективне затримання цистеїну та збільшення відгуків на пероксид водню (відповідно чутливість до H_2O_2).

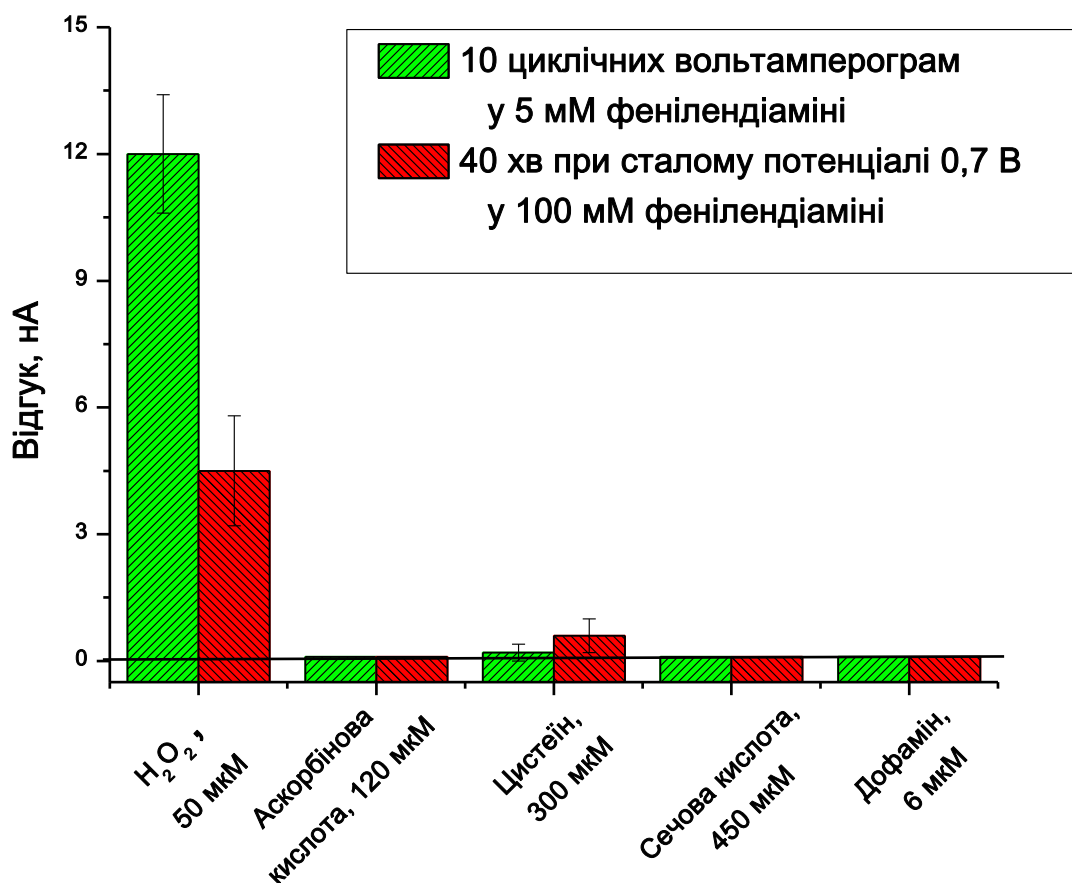


Рис. 4.4. Порівняння ефективності роботи ПФД мембран, нанесених при постійному та змінному потенціалі. Відгуки на електроактивні речовини отримані в 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4

Необхідно зазначити, що методика нанесення ПФД-мембрани з використанням циклічної вольтамперометрії, все ж таки має один недолік, а саме – неможливість одночасного отримання вольтамперограм на кількох амперометричних перетворювачах, в той час як при нанесенні мембрани при постійному потенціалі, можна водночас підключати до 8-16 робочих електродів (в залежності від типу мультиплектора).

Тому, подальша робота була зосереджена саме на оптимізації методики нанесення ПФД мембран з використанням циклічної вольтамперометрії, з метою скорочення часу нанесення напівпроникних мембран на перетворювачі.

4.5. Підтверження та оцінка процесу електрополімеризації *m*-фенілендіаміну на поверхні перетворювача

ПФД мембрана була чітко помітна на поверхні електродів як однорідна прозора плівка золото-коричневого кольору. Для підтвердження присутності ПФД, полімеризація *m*-фенілендіаміну була додатково підтверджена методом спектроскопії (рис. 4.5).

Дифузний спектр відбиття ультрафіолетової зони плівки демонструє інтенсивні смуги поглинання при 222 та 315 нм, подібні до смуг мономеру і пов'язані з електронними переходами в ароматичних кільцях [161], тоді як слабкі поглинання при 400-800 нм, постійно зменшуючись з довжиною хвилі, відносяться до електронних переходів $p-p^*$ у сильно кон'югованій ароматичній системі провідного ПФД-полімеру.

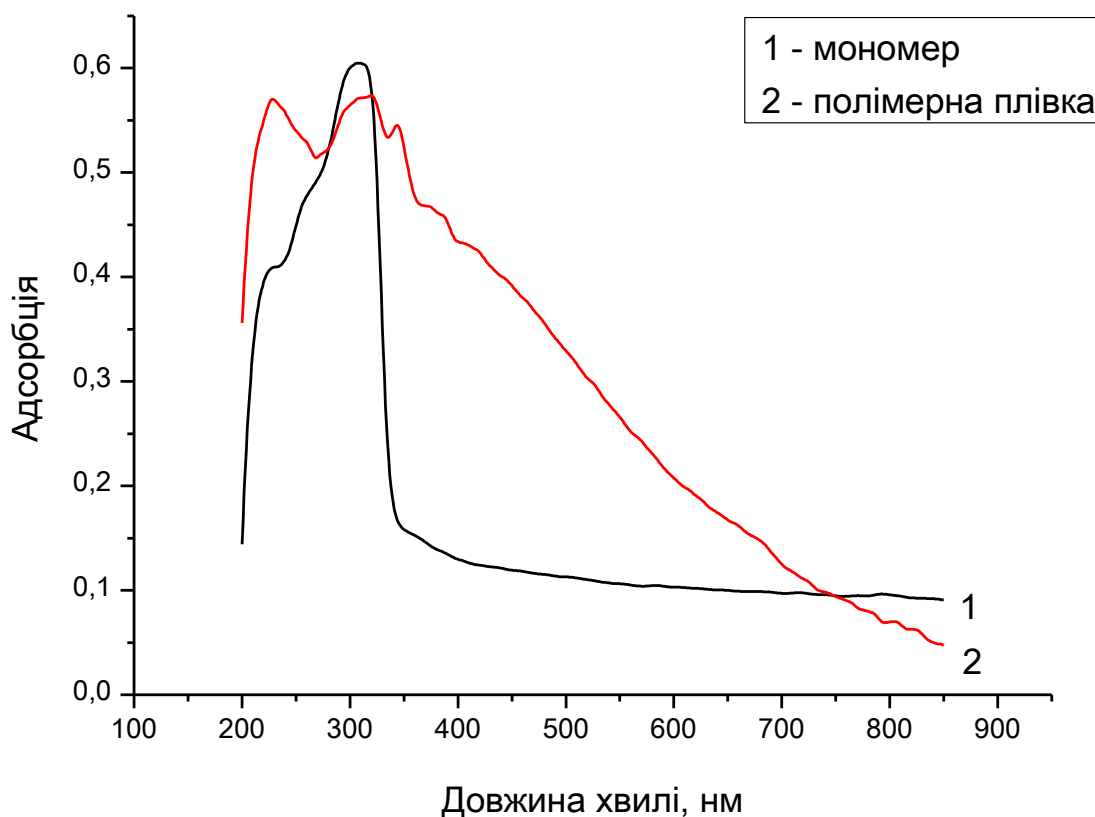


Рис. 4.5. Спектри дифузного відбиття ультрафіолетових променів *m*-фенілендіаміну та ПФД мембрани, отримані на платиновому електроді.

Для кращої інтерпретації отриманих результатів було б корисно оцінити розмір пор в ПФД мембранах, отриманих в результаті різних методів полімеризації *m*-фенілендіаміну. Однак, безпосереднє визначення розмірів пор у мембрані ПФД майже неможливе, оскільки мембрана складається з декількох шарів фенілендіаміну, а пори в нижніх шарах можуть мати різний розмір. У роботі [159] визначили товщину ефективної мембрани з *m*-фенілендіаміну - 15 нм, тоді як площа поперечного перерізу одного олігомерного полімерного ряду оцінювалась як 1 нм [162].

Таким чином, можна стверджувати, що ПФД-мембрана містить приблизно 15 шарів полімеру. Оскільки ПФД-мембрані притаманні гідрофобні та ситові властивості, вона має нанопори, які дозволяють проникати молекулам перексиду водню до поверхні перетворювача.

Пори, безумовно, є неоднорідними, а їхній мінімальний діаметр повинен бути меншим 1 нм для того, щоб вилучати електроактивні молекули інтерферуючих речовин. Через це досить складно аналізувати пори, навіть використовуючи електронний або атомно-силовий мікроскоп.

Через такі технічні особливості, набагато простішим є визначення ефективності ПФД-мембрани через оцінку проникності мембрани для різних молекул. Даний непрямий підхід є широко розповсюдженим і дозволяє порівняти практичні характеристики мембран, що є дуже важливими при розробці сенсорів.

4.6. Підбір оптимальних умов нанесення ПФД мембрани методом циклічної вольтамперометрії

Підбір оптимальних умов нанесення ПФД мембрани на амперометричний перетворювач було розпочато з вибору кількості циклічних вольтамперограм під час електрополімеризації (рис. 4.6).

Було перевірено ефективність ПФД мембран, які наносили при різних кількостях циклічних вольтамперограм. Нанесення ПФД мембрани лише

одним циклом вольтамперограми було, очевидно, недостатнім для повного усунення впливу інтерферентів. Проте, ефект від електроактивації платини при цьому був найбільшим. При подальшому збільшенні кількості вольтамперограм, відгуки сенсора на інтерференти зменшувались, проте, одночасно з цим, знижувалась і чутливість перетворювача до перексиду водню. Це відбувалося, ймовірно, через надто товстий шар ПФД, який створював обмеження для дифузії, як інтерферуєючих речовин, так і самого перексиду водню. Вже трьох циклічних вольтамперограм було достатньо для повного зникнення відгуків сенсора на сечову кислоту та дофамін, і дуже суттєвого зменшення відгуків на аскорбінову кислоту та цистеїн.

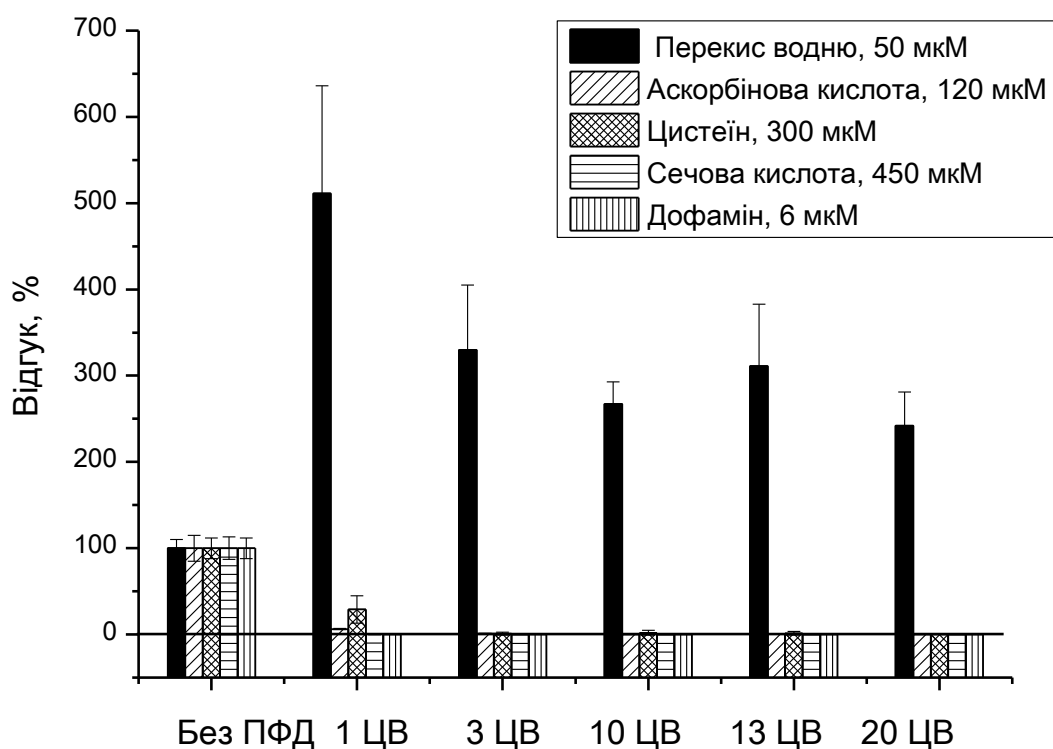


Рис. 4.6. Ефективність ПФД мембран, нанесених з використанням різної кількості циклічних вольтамперограм (ЦВ). Відгуки на електроактивні речовини отримані в 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4

Тому, було вирішено прийняти дану кількість вольтамперограм за оптимальну і збільшити концентрацію *m*-фенілендіаміну для повного

усунення впливу інтерферентів (рис. 4.7). Слід також відзначити, що використання 5 мМ фенілендіаміну під час нанесення ПФД мембран було достатнім для усунення відгуків сенсора на невеликі концентрації інтерферуючих речовин, які залишаються після розведення зразків, проте недостатнім для роботи з нерозведеними зразками.

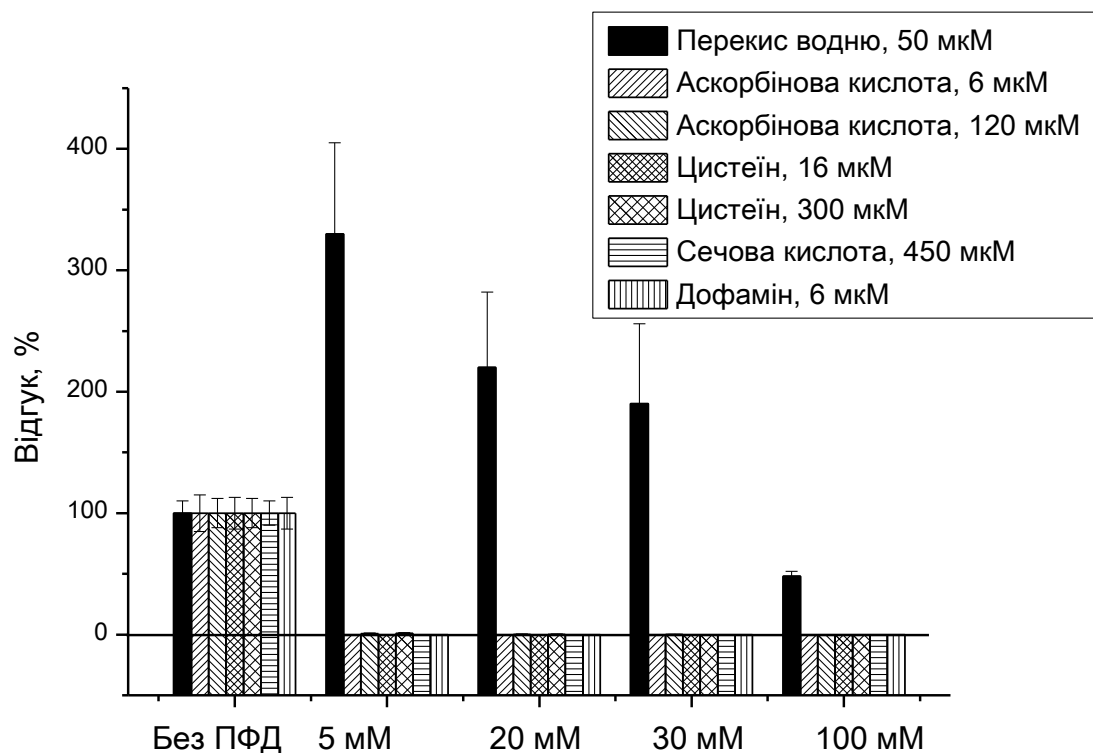


Рис. 4.7. Ефективність ПФД мембран, нанесених при використанні різних концентрацій *m*-фенілендіаміну. Відгуки отримані в 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4.

Як виявилось, збільшення концентрації фенілендіаміну до 20 мМ і проведення трьох ЦВА під час нанесення мембрани, було достатнім для отримання перетворювачів, які були не чутливі до цистеїну, та мінімально чутливі до аскорбінової кислоти (0,1 % від відгуку на аскорбінову кислоту без ПФД мембрани). У випадку модифікації перетворювачів з використанням концентрації *m*-фенілендіаміну 100 мМ, отримані перетворювачі мали вдвічі меншу чутливість до перекису водню, очевидно,

через занадто товстий шар ПФД. Таким чином, оптимальним варіантом нанесення ПФД мембрани є проведення трьох циклічних вольтамперограм у 20 мМ розчині *m*-фенілендіаміну. Оскільки, тривалість однієї вольтамперограми складає близько 1,5 хв, то для нанесення мембрани на один сенсор достатньо 4,5 хв.

4.7. Дослідження операційної стабільності ПФД мембран

Після оптимізації умов нанесення ПФД мембран на платинові дискові електроди, було досліджено стабільність додаткових мембран протягом двох годин (рис. 4.8).

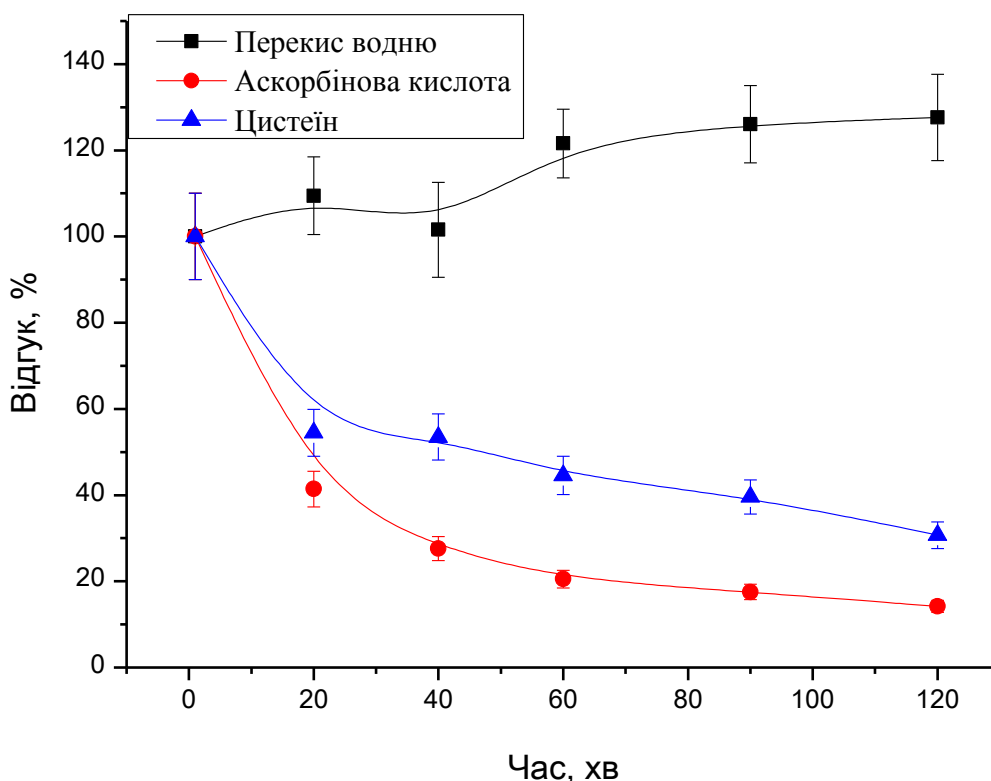


Рис. 4.8. Операційна стабільність ПФД мембрани впродовж двох годин. Відгуки на три речовини були нормалізовані до початкової відповіді на відповідну речовину після нанесення ПФД. Відгуки отримані в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4.

Перетворювачі з нанесеною мембраною залишали в робочому буфері і періодично отримували відгуки на електроактивні речовини. Було з'ясовано, що відгуки перетворювачів на пероксид водню зростають протягом роботи, в той час як відгуки на інтерференти залишаються дуже маленькими і, навіть зменшуються.

Можливо, цей ефект пояснюється поступовою адсорбцією інтерферуєчих речовин на порах мембрани, що ускладнює доступ до електроду наступним молекулам інтерферентів. З іншого боку, ПФД мембрана поступово розбухає у робочому буфері і краще пропускає до поверхні маленькі речовини, такі як пероксид водню.

В ході проведення досліджень було встановлено, що перетворювачі з нанесеною мембраною можуть використовуватись для безперервної роботи щонайменше 2 години без втрати захисних властивостей мембрани.

4.8. Перевірка можливості тривалого зберігання ПФД мембран

Було досліджено стабільність зберігання ПФД-мембрани. Сенсори з нанесеними на них ПФД-мембранами зберігали у сухому стані протягом 8 днів при температурі $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, періодично їх розморожували та отримували відгуки на перекис водню, аскорбінову кислоту та цистеїн. Протягом 8 днів чутливість сенсорів до перекису водню збільшилася в 2,5 рази, тоді як чутливість до аскорбінової кислоти та цистеїну залишалася незмінною. (рис. 4.9).

Цей ефект можна пояснити деяким повільним набуханням ПФД-мембрани, що призводить до поліпшення дифузії перексиду водню через шар ПФД. Необхідно відмітити, що при цьому дифузія інтерферуєчих речовин не покращується.

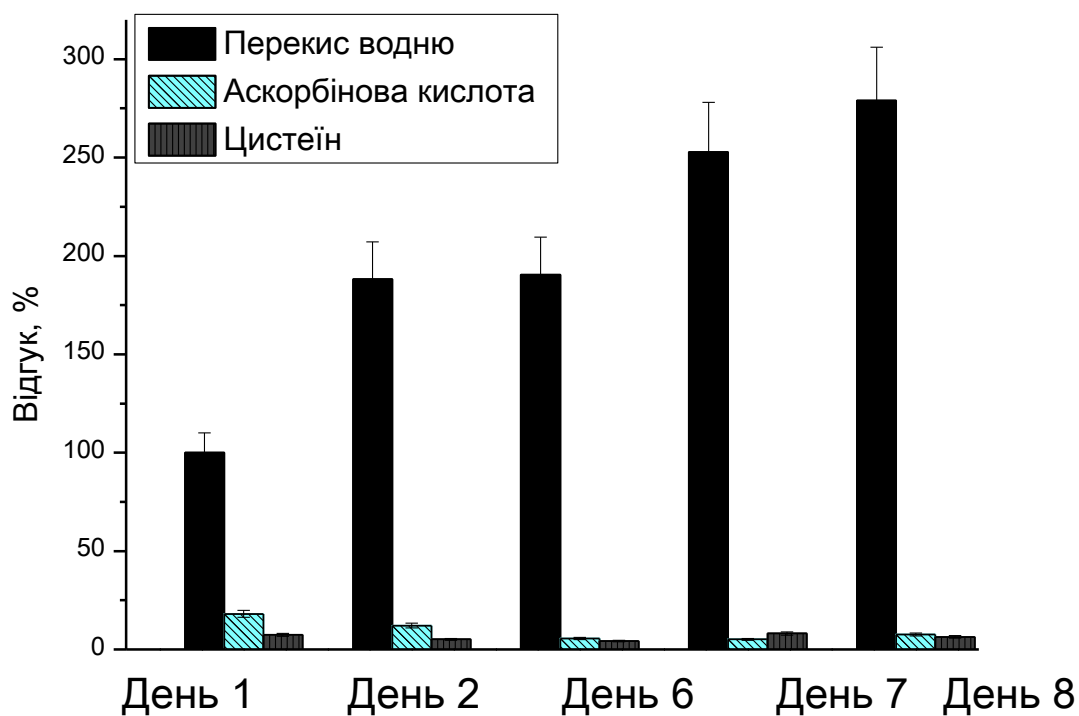


Рис. 4.9. Стабільність зберігання ПФД-мембрани. Відгуки отримані у 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4. Відгуки були нормалізовані до відгуків на H_2O_2 у перший день вимірювань.

4.9. Порівняння отриманих результатів з літературними джерелами

В роботі перевірено ефективність ПФД мембрани шляхом аналізу реальних біологічних зразків. Перетворювачі без нанесеної мембрани давали певні відгуки на внесення зразків сироватки крові до робочої комірки через наявність електроактивних сполук. Проте, після нанесення ПФД мембрани, жодних відгуків не спостерігалось. Подібні результати були отримані з клітинним лізатом. Ці експерименти показують, що розроблений метод нанесення ПФД на платинові дискові електроди є ефективним, а модифіковані перетворювачі можна використовувати при створенні біосенсорів для роботи зі складними біологічними зразками. Було порівняно

розроблений в роботі метод нанесення ПФД з низкою методів, описаних раніше (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Порівняння селективності електродів, модифікованих ПФД
мембранами, розробленим в даній роботі методом та методами,
описаними раніше**

Метод полімеризації ФД	ЦВ (від -0,3 В до +0,9 В відносно Ag/AgCl)	ПП (+0,7 В відносно Ag/AgCl)	ПП (+0,7 В відносно НКЕ)	ЦВ (від -0,25 В до +0,9 В відносно НКЕ)	ПП (+0,7 В відносно Ag/AgCl)	ЦВ (від 0 В до +0,9В відносно Ag/AgCl)
Тип електрода	Pd диск	рутеніз. карб. волокно	Pt-Ir циліндричний	СКЕ	Pt циліндричний МЕ	Pt диск
Ізомер ФД	<i>m</i> -ФД	<i>m</i> -ФД	<i>o</i> -ФД	<i>o</i> -ФД	<i>o</i> -ФД	<i>m</i> -ФД
Час приготування, хв	48	45	15	15	15	6
Ефективність блокувальних властивостей	Повне блокування АК, Цис. Незначний вплив СК	Повне блокування СК, Цис, ДА. Незначний вплив АК	Повне блокування АК	Повне блокування АК, СК, ДА	Повне блокування АК	Повне блокування АК, Цис, СК, ДА
Стабільність при зберіганні	Н/Д	>2 дні	>7 днів	>15 днів	Н/Д	>8 днів

Застосування біосенсора	Н/Д	Визначення глюкози, лактату і глутамату, <i>in vivo</i> в мозку щурів	Н/Д	Визначення H ₂ O ₂ у зразках сироватки крові людини	Н/Д	Зразки сироватки крові людини, клітинний лізат
Джерело	[156]	[141]	[159]	[157]	[158]	Наші дані

Примітки: АК – аскорбінова кислота; БС – біосенсор; ДА – дофамін; НКЕ – насичений каломельний електрод; ПП – постійний потенціал СК – сечова кислота; СКЕ – скляний карбоновий електрод; Цис – цистеїн

З даної таблиці видно, що, запропонований метод є найшвидшим, а отримана мембрана має чудові блокувальні властивості, які є кращими або, принаймні, не гіршими, ніж властивості інших ПФД-мембран.

4.10. Підсумки

В роботі досліджено умови нанесення напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну, використання якої забезпечує зменшення впливу інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

Внаслідок існуючої суперечливої інформації стосовно методик нанесення ПФД на поверхню перетворювачів, було порівняно дві відомі з літературних джерел найкращі методики нанесення ПФД на дискові платинові електроди. Показано, що електрополімеризація *m*-фенілендіаміну за допомогою циклічної вольтамперометрії відбувається простіше, і забезпечує значно кращі властивості мембрани у порівнянні з електрополімеризацією при постійному потенціалі.

Проведено оптимізацію обраної методики та перевірено залежність ефективності ПФД мембран від кількості проведених циклічних вольтамперограм і концентрації *m*-фенілендіаміну. Показано, що вплив інтерферуючих речовин на роботу сенсора може бути повністю усунено шляхом використання трьох циклічних вольтамперограм у 20 мМ розчині *m*-фенілендіаміну. При цьому тривалість процедури модифікації перетворювача становила 4,5 хвилини. З іншого боку, при роботі з розведеними зразками, тобто зі зразками, що містять менші концентрації електроактивних речовин, є доцільним зменшувати концентрацію *m*-фенілендіаміну до 5 мМ. Таке зменшення концентрації, в свою чергу, забезпечить підвищення чутливості перетворювача до пероксиду водню внаслідок формування більш тонкого ПФД-шару. Показано, що така мембрана з поліфенілендіаміну може використовуватись, щонайменше, протягом 2 годин безперервної роботи і зберігатися не менше 8 діб, при цьому майже не втрачаючи чутливості до пероксиду водню. Також показано переваги як швидкості так і ефективності запропонованої методики нанесення ПФД у порівнянні з відомими з літературних джерел методиками.

Отриманий перетворювач з нанесеною на його поверхню ПФД мембраною не проявляє чутливості до електроактивних речовин, що містяться у біологічних зразках (аскорбінової кислоти, цистеїну, сечової кислоти та дофаміну), і може з успіхом використовуватись при розробці амперометричних біосенсорів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1) Кучеренко ІС, Солдаткіна ОВ, Кучеренко ДЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ. Адаптація процедури нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові перетворювачі. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017;14(1):48-57. (Особистий внесок здобувача:

оптимізація процедури нанесення та складу додаткової поліфенілендіамінової мембрани на амперометричні перетворювачі)

2) **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Pyeshkova VM, Alekseev SA, Soldatkin OO, Dzyadevych SV. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):594.

(Особистий внесок здобувача: дослідження умов нанесення напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну для зменшення впливу інтерферуючих речовин на роботу сенсорів)

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ХЕМОСЕНСОРА НА ОСНОВІ КАЛІКСАРЕНУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ

5.1. Каліксарен як селективний елемент хемосенсорів

Каліксарени – це синтетично доступні макроциклічні наноконпоненти, отримані точною цикло-конденсацією р-заміщених фенолів і формальдегіду, що мають внутрішньомолекулярні ліпофільні порожнини, утворені ароматичними кільцями макроциклічного скелету [163]. Каліксарени легко піддаються верхній або нижній ободовій функціоналізації макроциклічного скелету. Через їх здатність до різних взаємодій, мульти-сайтінтового водневого зв'язку, специфічної збірки і узагальнених електростатичних взаємодій, похідні каліксаренів можуть бути використані як селективні елементи при розробці сенсорних систем. Вони показують унікальну здатність розпізнавати і зв'язувати супрамолекулярні комплекси катіонів типу «гість-господар», аніонів та нейтральних молекул відповідного розміру та архітектури [164]. Ці властивості відкривають широкі перспективи практичного застосування каліксаренів у різних галузях хімії, фізики, біології, медицини та в сенсорних технологіях [165].

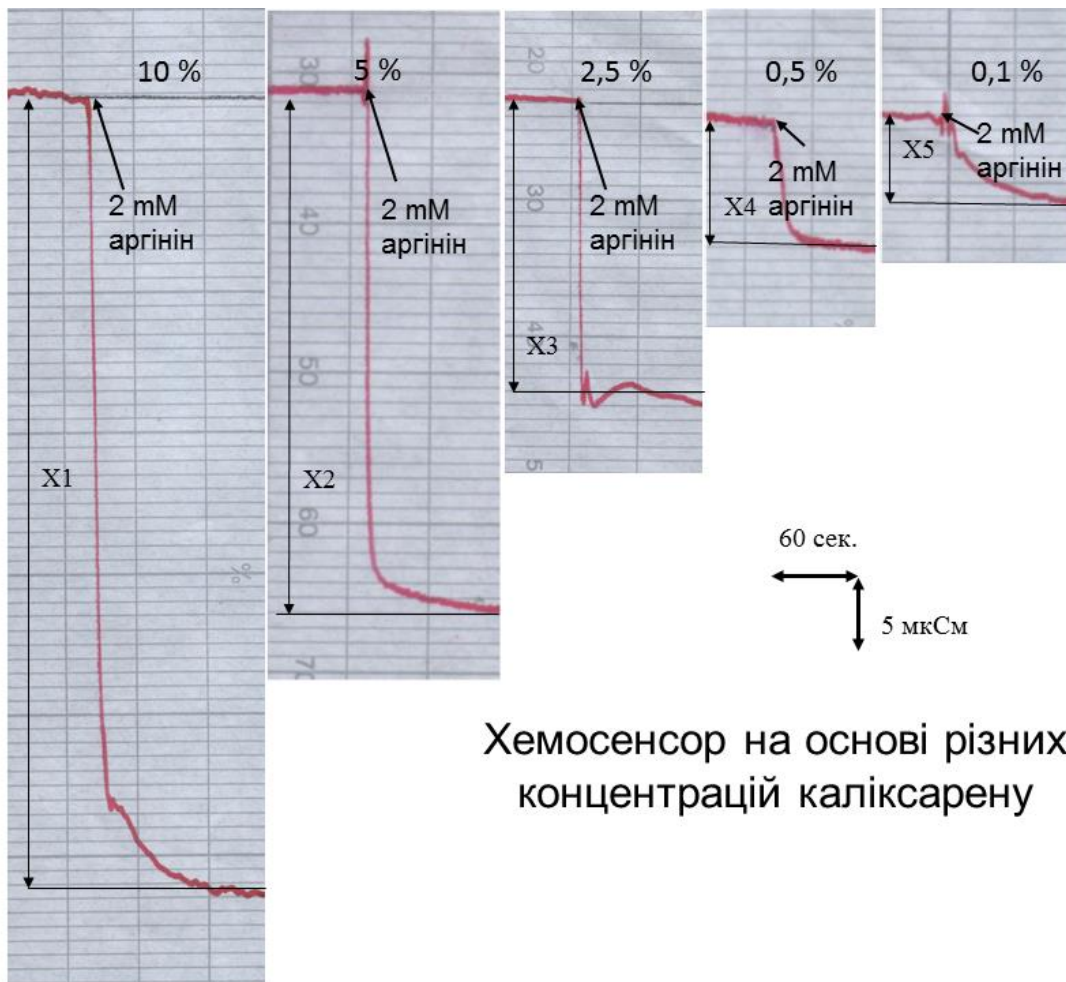
Тому було вирішено розробити новий хемосенсор на основі каліксарену для кількісного визначення аргініну. Аргінін, в якості аналіту, було вибрано через його ключову роль в підтримці гомеостазу судин і функцій ендотелію. Крім того, дефіцит аргініну в організмі є причетним до патогенезу багатьох серцево-судинних захворювань, включаючи гіпертензію, ішемічну хворобу серця, дисфункцію периферичних і коронарних судин, а також, утворення атером [166, 167]. Визначення рівню L-аргініну в біологічних рідинах необхідно проводити при діагностиці та контролі перебігу захворювань ендокринної системи [168], гепатоцелюлярної карциноми [169, 170], меланоми [171] та колоректального

раку [172]. У лабораторній діагностиці рівень L-аргініну в сечі оцінюється для діагностики гомозиготної біохімічної цистинурії [173]. Відповідно, розробка сенсора на основі каліксаренової мембрани для кількісного визначення аргініну є вельми актуальним завданням.

5.2. Підбір оптимального складу мембрани на основі каліксарену

На першому етапі роботи необхідно було визначити оптимальну кількість каліксарену для нанесення на поверхню кондуктометричного перетворювача. З цією метою було зроблено серію повторів процедури покриття датчика каліксареном з використанням його різних концентрацій (0,1 %, 0,5 %, 2,5 %, 5 % та 10 %). Необхідно зазначити, що подальше збільшення концентрації каліксарену було неможливим, оскільки при збільшенні концентрації нанесена крапля не розтікалась по поверхні перетворювача і не давала змоги чітко та з точною відтворюваністю наносити його на чутливу поверхню.

Перш за все, для перевірки роботи запропонованих хемосенсорів, створених з використанням різних концентрацій каліксарену, необхідно було порівняти типові відгуки цих хемосенсорів. Тому було виміряно величини відгуків хемосенсорів на одну й ту ж саму концентрацію аргініну (2 мМ) для мембран на основі різних концентрацій каліксарену (рис. 5.1). Як видно з рисунку, хемосенсори із селективними мембранами, створеними з використанням розчинів 2,5 та 5 % каліксарену, продемонстрували час відгуку на аргінін приблизно 1 хв, що в 2,5 рази менше порівняно з хемосенсором, створеним з використанням 10 % каліксарену. Відповідно, якщо є необхідність у зменшенні часу аналізу, необхідно використовувати розчин 5 % каліксарену для створення мембрани сенсора, а якщо є потреба у збільшенні чутливості, то потрібно обирати сенсор на основі 10 % каліксарену.



Хемосенсор на основі різних концентрацій каліксарену

Рис. 5.1. Типові відгуки хемосенсорів з селективними мембранами, створеними з використанням різних концентрацій каліксарену, на внесення 2 мМ аргініну до робочої комірки. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

При роботі з реальними зразками дуже важливими робочими характеристиками сенсорів є їхня чутливість та лінійний діапазон визначення. Тому було порівняно калібрувальні криві сенсорів на основі каліксаренів за різної їх концентрації у селективній мембрані. Залежність була отримана за різних концентрацій аргініну (від 5 мкМ до 5 мМ) у вимірювальній комірці (рис. 5.2 А, Б).

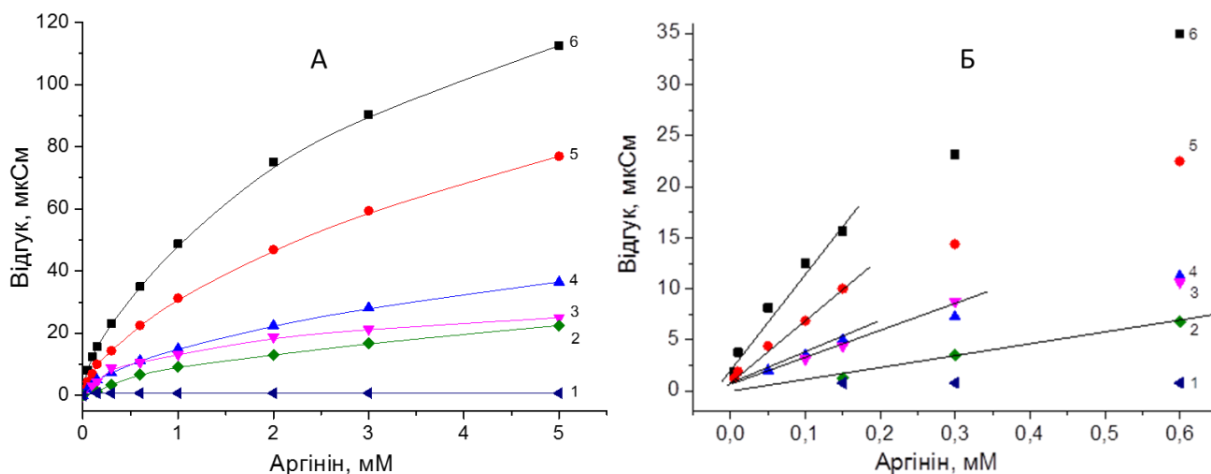


Рис. 5.2. Калібрувальні криві, хемосенсорів для визначення аргініну, створених на основі різної концентрації каліксарену – 0 % (1), 0,1 % (2), 0,5 % (3), 2,5 % (4), 5 % (5) і 10 % (6). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

Отримані калібрувальні криві свідчать про те, що хемосенсори, створені з використанням 10 % каліксарену, характеризувалися найвищою чутливістю до аргініну (рис. 5.2, Б), і були обрані для подальших експериментів.

Відтворюваність сигналу та операційна стабільність є важливими робочими характеристиками будь-якого типу сенсора. Тому, на наступному етапі було вирішено дослідити відтворюваність сигналів створених хемосенсорів для визначення аргініну протягом одного робочого дня, оскільки саме ця робоча характеристика і визначає їх операційну стабільність. Для перевірки відтворюваності сигналів хемосенсора, отримували відгуки на внесення 2 мМ аргініну з інтервалами у 10-15 хв (рис 5.3). Під час інтервалів хемосенсор зберігали у робочому буферному розчині при кімнатній температурі, в режимі безперервного перемішування.

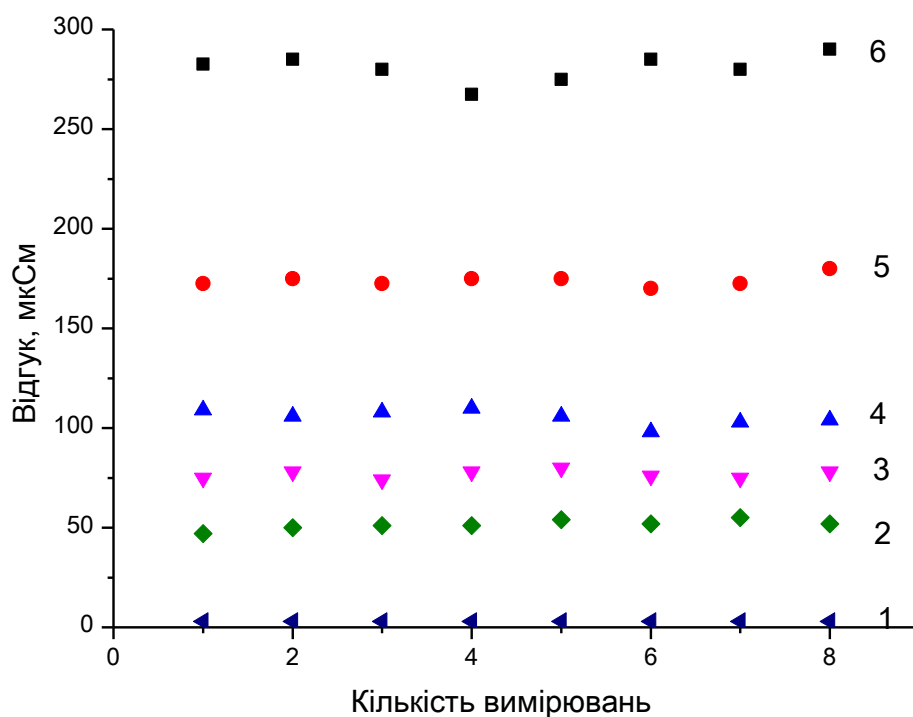


Рис. 5.3. Відтворюваність відгуків сенсорів, створених з використанням каліксарену різних концентрацій – 0 % (1), 0,1 % (2), 0,5 % (3), 2,5 % (4), 5 % (5) та 10 % (6). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, концентрація аргініну – 2 мМ.

Як видно з рисунку, всі сенсори на основі різних концентрацій каліксарену характеризувалися високою відтворюваністю сигналів. Похибки вимірювань не перевищували 5 % для всіх типів сенсорів.

5.3. Дослідження аналітичних характеристик розроблених хемосенсорів

В табл. 5.1 представлено порівняльні дані (базовий рівень шуму та дрейфу, мінімальна границя визначення, чутливість, лінійний діапазон, відтворюваність сигналу) для хемосенсорів, створених з використанням різних концентрацій каліксарену. Отримані дані показують, що зміна концентрації каліксарену в мембрані призводить до зменшення таких

показників, як похибка відтворюваності відгуку, дрейф базової лінії. Відповідно до цього, змінюючи концентрацію каліксарену у мембрані можна контролювано змінювати аналітичні характеристики сенсора для визначення аргініну. В подальших експериментах використовували сенсор, виготовлений з використанням 10% каліксарену, оскільки такий варіант сенсора забезпечує найкращу чутливість до малих концентрацій аргініну.

Таблиця 5.1

Порівняння аналітичних характеристик сенсорів на основі різних концентрацій каліксарену в мембрані

Аналітичні характеристики біосенсора	Концентрація каліксарену в мембрані				
	10 %	5 %	2,5 %	0,5 %	0,1 %
Чутливість, мкСм/мМ	37,5	23,45	11,25	9,37	6,5
Мінімальна межа визначення, мМ	0,005	0,005	0,03	0,04	0,1
Лінійний діапазон вимірювання, мМ	5-150	5-150	50-150	100-300	150-600
Час відгуку, с	150	50	60	80	150
Шум базової лінії, мкСм	0,375	0,25	0,25	0,5	0,5
Дрейф базової лінії, мкСм/хв	0,062	0,125	0,075	0,25	0,75
Похибка відтворюваності, %	2,5	1,7	3,9	2,7	4,8

5.4. Дослідження комплексоутворення каліксарену з аргініном та іншими амінокислотами

З метою дослідження селективності використаного при розробці хемосенсора каліксарену, в роботі було проведено хроматографічне дослідження його комплексоутворення з аргініном та іншими амінокислотами. В результаті даного дослідження було отримано результати щодо комплексоутворення каліксарену з 17 амінокислотами різного типу: неполярні (Глі, Ала, Лей, Іле, Про), полярні (Сер, Цис, Мет, Глн), полярні негативно заряджені (Асп, Глу), полярні позитивно заряджені (Гіс, Ліз, Арг)

та ароматичні (Фен, Тир, Три). Для визначення констант стійкості каліксарену з амінокислотами використовували раніше розроблену методику із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії [174].

Константи стійкості каліксарен-амінокислотних комплексів K_A , селективність до аргініну S (розрахована як співвідношення K_A (Арг) / K_A (амінокислота) представлені в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Комплексоутворення каліксарену з амінокислотами: константи стійкості комплексів K_A (M^{-1}) та селективність до аргініну S

№	Клас амінокислот	Аміно-кислоти	K_A (відносне стандартне відхилення RSD, %)	S
1	Неполярні	Глі	11407±1860 (16)	3,64
2		Ала	18916±2430 (8)	2,20
3		Іле	37912±4620 (12)	1,09
4		Лей	21460±3732 (17)	1,93
5		Про	10221±1550 (15)	4,06
6	Полярні незаряджені	Сер	13477±2430 (18)	3,07
7		Мет	15836±2855 (18)	2,63
8		Цис	13849±1811 (13)	3,01
9		Глн	20214±4140 (20)	2,05
10	Полярні негативно заряджені	Асп	26295±4150 (16)	1,58
11		Глу	22940±3110 (14)	1,81
12	Полярні позитивно заряджені	Гіс	24489±3410 (14)	1,69
13		Ліз	28199±6540 (23)	1,74
14		Арг	41504±6580 (16)	-
15	Ароматичні	Тир	20730±3870 (19)	2,00
16		Фен	21785±4570 (21)	1,90
17		Три	34353±6300 (18)	1,21

Значення констант стійкості K_A комплексів включення знаходяться в діапазоні від 10221 M^{-1} до 41504 M^{-1} . Найвища константа спостерігається для комплексу каліксарен - Арг. Найкраща селективність спостерігається по відношенню до неполярної амінокислоти проліну.

5.5. Перевірка селективності розробленого хемосенсора на основі каліксарену

Було перевірено селективність хемосенсора на основі каліксарену до низки амінокислот за допомогою розробленого сенсора. Для перевірки сенсора були обрані амінокислоти, які утворюють найбільш стійкі комплекси з каліксареном (дивись попередню табл. 5.2). Коефіцієнт селективності до аргініну розраховувався як співвідношення реакції хемосенсора на аргінін (v_1) та іншої амінокислоти (v_2) ($S = v_1/v_2$). Результати досліджень приведені в табл.5.3.

Таблиця 5.3

Чутливість хемосенсора на основі каліксарена до амінокислот

Тип амінокислоти	Аміно-кислоти	Відгук хемосенсора, мкСм	*Відгук хемосенсора, %	S
Неполярні	Іле	4,25	4,8	20,6
	Лей	5	5,7	17,5
Полярні негативно заряджені	Асп	5,1	5,8	17,2
	Глу	1,4	1,6	62,5
Полярні позитивно заряджені	Гіс	78,1	89,3	1,1
	Ліз	44,4	50,7	2,0
	Арг	87,5	100	-
Ароматичні	Три	13,1	15	6,7

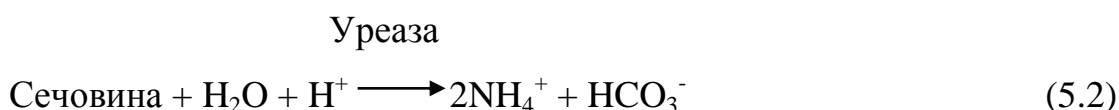
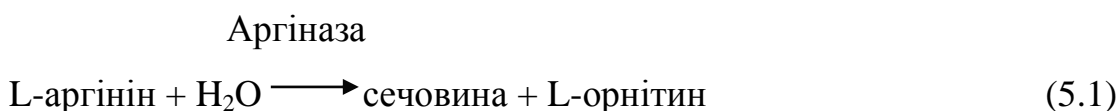
*Примітки: Відгук сенсора на 2 мМ аргінін приймали, як 100%.

Як видно з таблиці, хемосенсор характеризувався високою селективністю до неполярних, полярних негативно заряджених і ароматичних амінокислот. Але, на жаль, хемосенсор проявляв високу чутливість до полярних позитивно заряджених амінокислот, що може стати на заваді при його використанні для аналізу реальних біологічних зразків.

5.6. Порівняння характеристик розробленого хемосенсора з біосенсором на основі двох ферментів

5.6.1. Принцип роботи двоферментного біосенсора для визначення аргініну.

В основі роботи біосенсора лежать ферментативні реакції, що проходять в біоселективній мембрані на основі уреази та аргінази, нанесених на чутливу поверхню кондуктометричного перетворювача:



В ході ферментативних реакцій збільшується концентрація іонів у робочій мембрані. Крім того, в ході ферментативної реакції, за участю уреази, зменшується концентрація протонів. Все це призводить до зміни провідності розчину, яка реєструється за допомогою кондуктометричного перетворювача. В залежності від концентрації аргініну в розчині, змінюється і концентрація продуктів другої ферментативної реакції (заряджених іонів), і, відповідно, змінюється і провідність цього розчину. Величина зміни провідності є пропорційною до концентрації аргініну.

5.6.2. Оптимізація основних параметрів коїмобілізації уреазы та аргінази

Перш за все, необхідно було провести оптимізацію основних параметрів методу іммобілізації, тобто, потрібно підібрати оптимальні концентрації обох ферментів та ГА, час інкубації та визначити послідовність процедури іммобілізації. Було визначено оптимальну концентрацію уреазы у складі біоселективної мембрани (рис. 5.4).

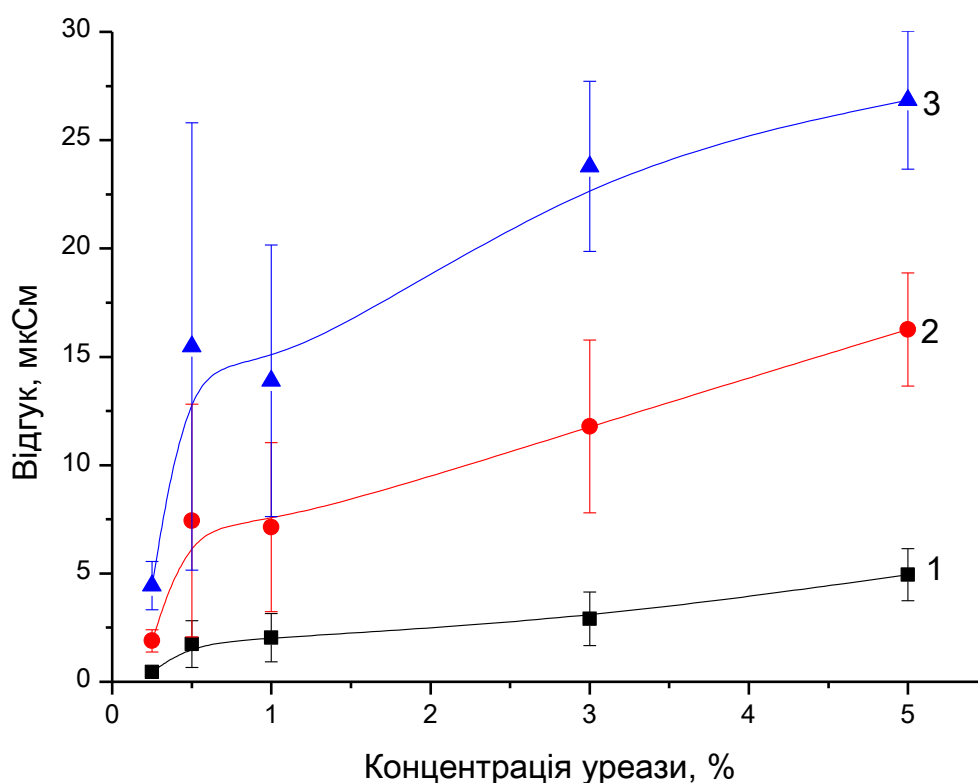


Рис. 5.4. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації уреазы у складі біомембрани за різних концентрацій сечовини: 0,2 мМ (1), 1 мМ (2), 4 мМ (3). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Для визначення оптимальної концентрації уреазы у складі біоселективного елементу, будували калібрувальні криві біосенсорів для

визначення сечовини для на основі різних концентрацій уреазу у складі біоселективної мембрани (0,25 %, 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %).

Для визначення оптимальної концентрації аргінази в біоселективному елементі, отримували відгуки біосенсора на різні концентрації аргініну, змінюючи концентрацію аргінази в мембрані біосенсора від 1,5 до 7,5 %. Як видно з рис. 5.5, найбільші відгуки двоферментного біосенсора на аргінін спостерігалися при концентрації аргінази в біоселективному елементі 5 %. Тому, саме це значення було використано як оптимальне для подальших експериментів.

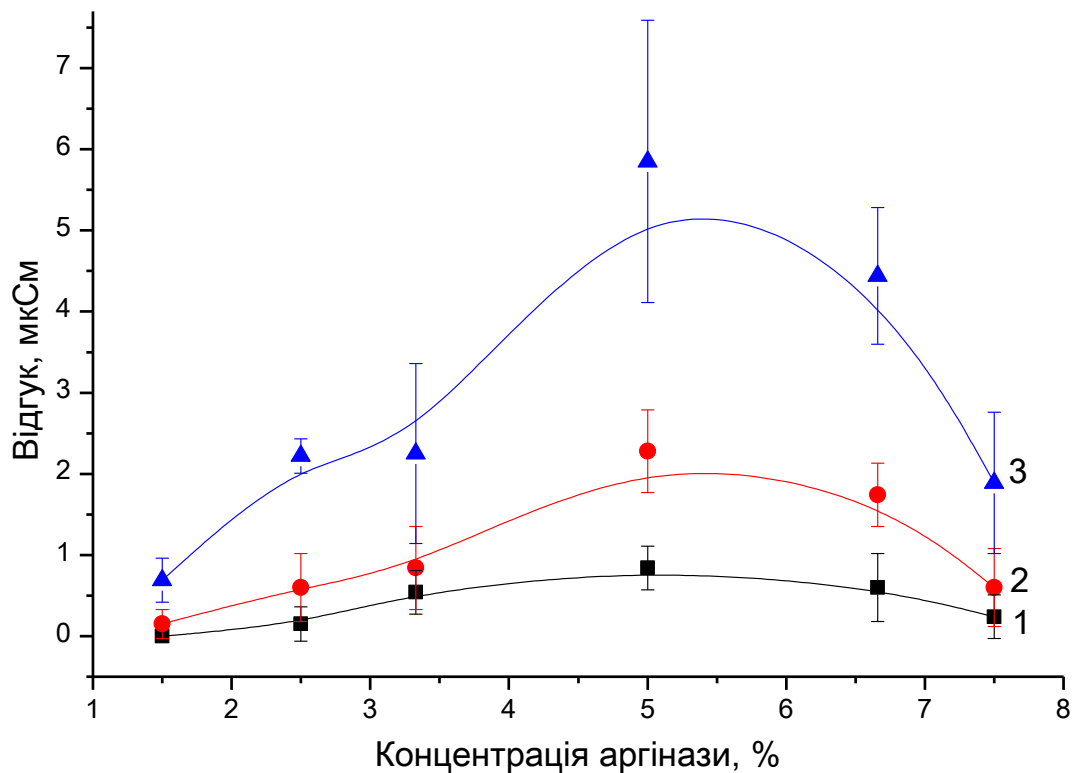


Рис. 5.5. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації аргінази в біомембранах за різних концентрацій аргініну: 0,025 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація уреазу в мембрані – 5 %. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

На наступному етапі вивчали вплив концентрації глутарового альдегіду, а також вплив часу іммобілізації на роботу біосенсора. Для цього вимірювали відгуки біосенсора на різні концентрації аргініну, в залежності від концентрації глутарового альдегіду, що використовувався під час іммобілізації (рис. 5.6).

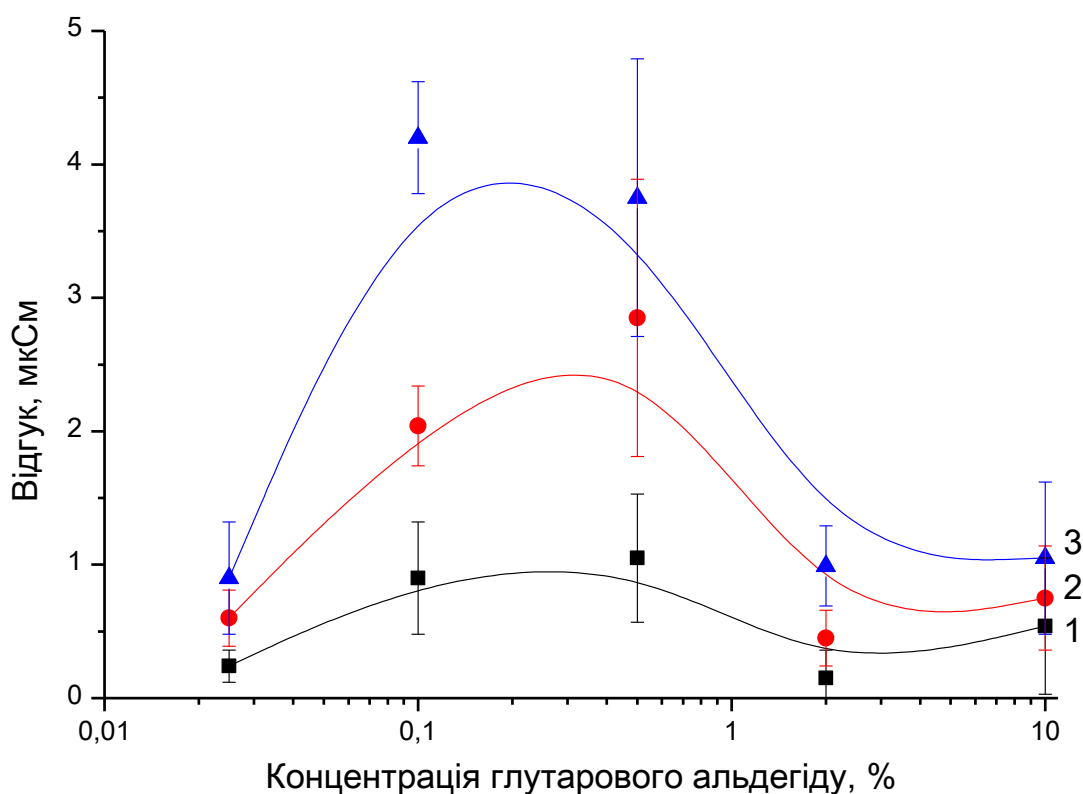


Рис. 5.6. Графік залежності величини відгуків біосенсора від використаної під час іммобілізації концентрації глутарового альдегіду. Концентрації аргініну: 0,1 мМ (1), 0,4 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація ферментів у мембрані – 5 %. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

Спираючись на результати, представлені на рис. 5.6, можна зробити висновок, що, найбільш ефективними, є концентрації глутарового альдегіду: 0,1 - 0,5 %.

Отже, саме такі значення концентрацій ГА використовувалися в подальшій роботі для створення двоферментних біосенсорів для визначення аргініну

Окрім того, було проведено оцінку чутливості біосенсора до аргініну (1 мМ), залежно від тривалості іммобілізації. Виявилось, що 30 хв є оптимальним часом іммобілізації з використанням глутарового альдегіду для утворення ферментних мембран на поверхні кондуктометричного перетворювача (рис. 5.7). Слід зазначити, що за таких параметрів іммобілізації, біосенсори проявляли найвищу чутливість до аргініну.

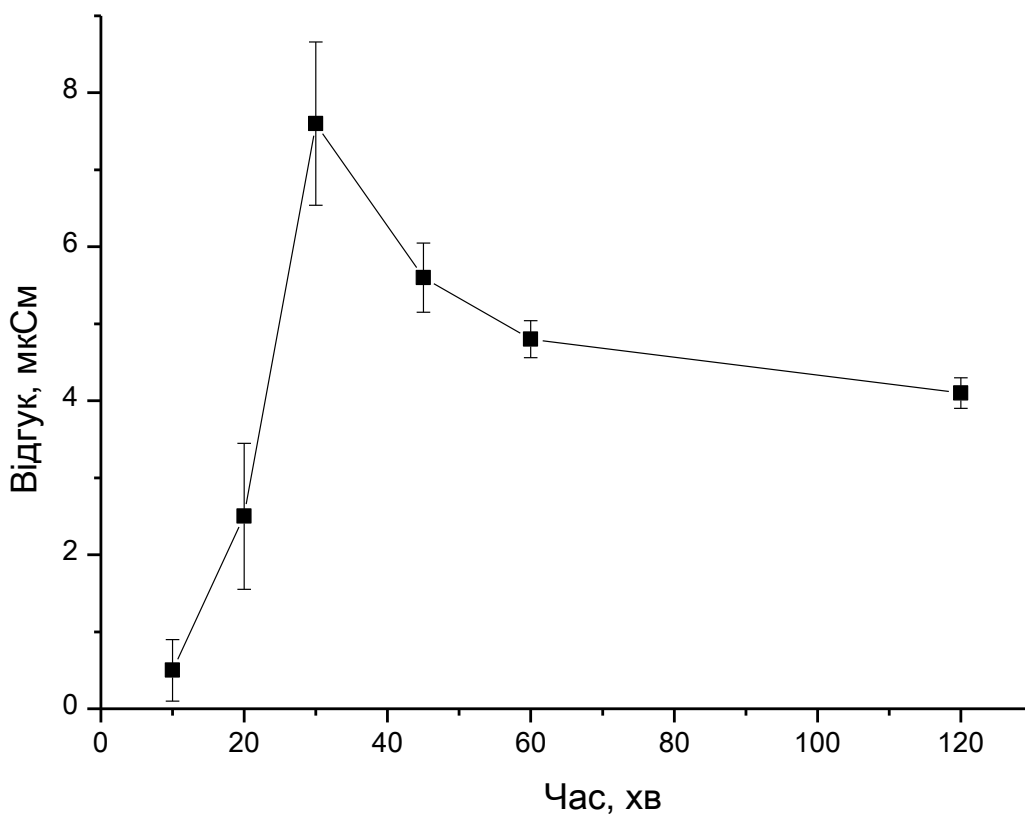


Рис. 5.7. Залежність величини відгуків біосенсора на 1 мМ аргініну від часу іммобілізації при приготуванні біосенсорів. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

5.6.3. Визначення відтворюваності сигналу та операційної стабільності ферментного біосенсора

Відомо, що відтворюваність сигналу та операційна стабільність є основними робочими характеристиками будь-якого біосенсора. З метою перевірки відтворюваності сигналу запропонованого біосенсора для визначення аргініну, протягом 2,5 годин отримували відгуки на 1 мМ аргініну з інтервалом у 10-15 хв. Під час інтервалів біосенсор залишався у буфері при безперервному перемішуванні. З рис. 5.8. видно, що біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів. Похибка вимірювання при цьому не перевищувала 2,5%.

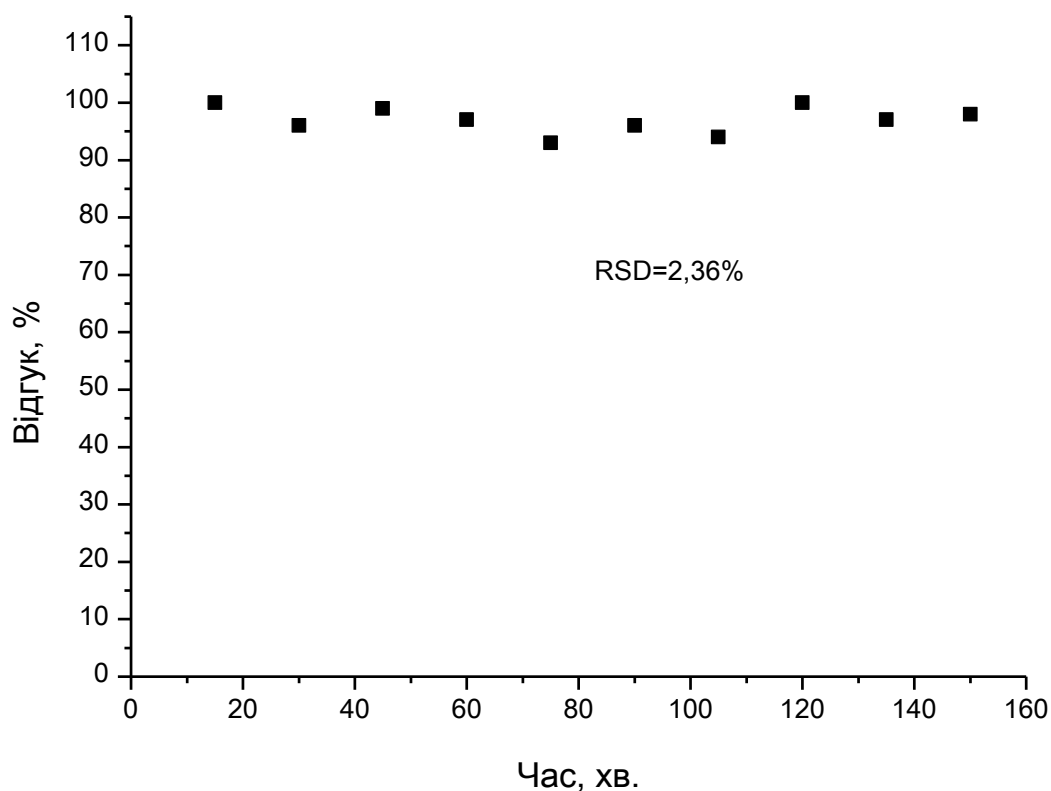


Рис. 5.8. Відтворюваність сигналів двоферментного біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ ТРИС буфері, рН 8,1, концентрація аргініну – 1 мМ.

Для перевірки операційної стабільності біосенсора, експеримент проводився наступним чином. Отримували чотири відгуки біосенсора на 1 мМ аргініну з інтервалом 10-15 хв протягом 4-денного періоду. Між серіями сигналів, біосенсор зберігався при температурі +4 ° С в сухому стані. В ході експерименту спостерігалось лише невелике зниження середньої величини відгуку на аргінін.

Тому, в цілому, розроблений біосенсор для визначення аргініну характеризувався високою операційною стабільністю протягом щонайменше чотирьох днів.

5.6.4. Вивчення селективності біосенсора

Для дослідження селективності розробленого ферментного біосенсора було вивчено вплив інтерферентів (інших амінокислот) на його роботу. З цією метою, в робочу комірку додавали різні амінокислоти з концентрацією 0,5 мМ у вимірювальній комірці (рис. 5.9).

Селективність виражалась як співвідношення вихідного сигналу на інтерферуєчу речовину до сигналу на аргінін такої самої концентрації (0,5 мМ).

Максимальне співвідношення між відгуками розробленого кондуктометричного біосенсора на деякі амінокислоти / аргінін становило 0,18. Якщо отримані результати порівнювати з результатами дослідження селективності хемосенсора на основі каліксарену, то можна вважати, що запропонований біосенсор характеризується більш високою селективністю.

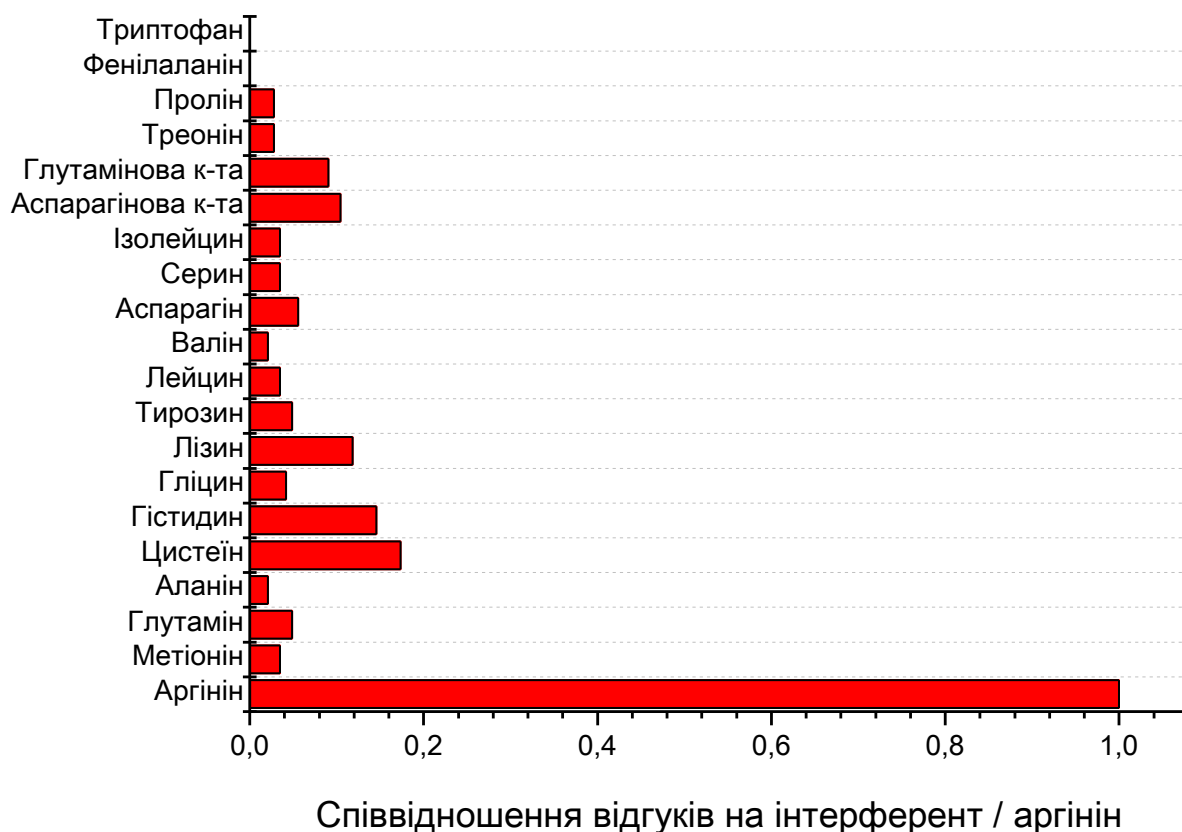


Рис. 5.9. Селективність ферментного біосенсора. Вимірювання проводили у 5мМ ТРИС буфері, рН 8,1, концентрація внесених у робочу комірку субстратів складала 0,5 мМ.

5.6.5. Порівняння основних аналітичних характеристик розробленого біосенсора для визначення аргініну

В оптимальних умовах роботи, при використанні 5 мМ ТРИС буфера, (рН 8,1) з 0,1 мМ Mn^{2+} , межа визначення аргініну розробленим біосенсором становила 2,5 мкМ (вона визначалась як концентрація аргініну, величина відгуку на яку втричі перевищувала шум базової лінії). Лінійний діапазон роботи становив від 2,5 мкМ до 500 мкМ, чутливість до аргініну становила $13,4 \pm 2,4$ мкСм/мМ. Лінійна частина калібрувальної кривої описується рівнянням $\Delta G = 13 \cdot C$ (для визначення аргініну; $R^2 = 0,98$), де ΔG – зміна провідності розчину після виходу відгуку на плато (мкСм), C – концентрація

аргініну (мМ). Слід зазначити, що визначення аргініну за допомогою біосенсора, в значній мірі, залежало від складу біоселективного елементу біосенсора та параметрів робочого буферного розчину. Змінюючи ці параметри, можна досягати необхідних аналітичних характеристик біосенсора в залежності від поставлених задач.

Як найголовніший кінцевий результат даної частини роботи, було порівняно аналітичні характеристики розробленого ферментного біосенсора з характеристиками каліксаренового хемосенсора. Результати порівняння отриманих даних наведено у табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Порівняння аналітичних характеристик ферментного біосенсора та каліксаренового хемосенсора для визначення аргініну

Селективний матеріал	Аргіназа + Уреаза	Каліксарен
Чутливість, $\mu\text{См} \times \text{мМ}^{-1}$	13,4 \pm 2,4	37,5
Час відгуку, с	20	50
Лінійний діапазон, мМ	0,0025 -0,5	0,03-2
Похибка аналізу, %	5	2,5
Специфічність до субстрату, %*	Арг- 100, Мет-3, Глн-4, Ала-2, Цис-17, Гіс-14, Глі-4, Ліз-12, Тир-5, Лей-3, Вал-2, Асн-6, Сер-3, Іле-3, Асп-10, Глу-9, Тре-3, Про-3, Фен-0, Три-0.	Іле – 4,8; Лей – 5,7; Асп – 5,8; Глу – 1,6; Гіс – 89,3; Ліз – 50,7; Арг – 100; Три – 15.

Примітки: Відгуки хемосенсора і біосенсора на аргінін приймали за 100%, відповідно.

Виявилось, що запропонований ферментний біосенсор характеризувався кращою селективністю до аргініну, та швидшим відгуком на аргінін порівняно з хемосенсором. В свою чергу, каліксареновий сенсор

мав більшу чутливість та меншу похибку вимірювання. Лінійний діапазон роботи був різний в обох сенсорів.

Було встановлено, що кожен з цих сенсорів для визначення аргініну має свої переваги та недоліки. Відповідно, в залежності від сфер подальшого застосування, можна використовувати або хемосенсор на основі каліксарену, або ферментний біосенсор.

5.7. Підсумки

Розроблено та досліджено аналітичні характеристики кондуктометричного хемосенсора для визначення аргініну на основі каліксарену (ди-(3-метилсульфідпропокси) калікс[4]арен-метилен-бісфосфонова кислота).

В результаті досліджень визначено оптимальну концентрацію каліксарену в складі селективної мембрани – 10 %. Показано, що відтворюваність сигналів сенсора була високою з похибкою вимірювання 2,5 %. Окрім того, був проведений аналіз основних робочих параметрів розробленого хемосенсора (шум базової лінії - 0,375 мкСм; дрейф базової лінії - 0,062 мкСм/хв.; мінімальна границя визначення – 5 мкМ; чутливість - 37,5 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи - 5-150 мкМ).

Вивчено утворення каліксарен-аргінінового комплексу та проведено його порівняння з комплексоутворенням каліксарен-інша амінокислота. Перевірено селективність сенсора на основі каліксарена відносно інших амінокислот.

Аналітичні характеристики розробленого хемосенсора на основі каліксарену порівняно з характеристиками двоферментного біосенсора. Показано, що в залежності від потреб дослідника та сфер подальшого застосування сенсора, можна використовувати або хемосенсор на основі каліксарену, або ферментний біосенсор. Кожен з цих сенсорів може

використовуватись для напівселективного визначення аргініну, а також в якості елемента мультисенсора для визначення амінокислот.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Cherenok SO, Kalchenko OI, Prynova OS, Sylenko OM, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Conductometric sensor with calixarene-based chemosensitive element for arginine detection. Chemical Papers 2018; 72(11):2687–97. *(Особистий внесок здобувача: створення та оптимізація роботи сенсора на основі каліксарена для визначення аргініну)*

2. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Velychko TP, Prilipko VO, Kuibia MA, Dzyadevych SV. Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals. Bioelectrochemistry. 2018;124:40-46. *(Особистий внесок здобувача: розробка біосенсора на основі коїмобілізованих уреаз та аргінази)*

3. **Солдаткіна ОВ**, Марченко СВ, Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Черенок СО, Пріньова ОС, винахідники; Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, патентовласник. Кондуктометричний сенсор на основі каліксарену для кількісного аналізу аргініну в водних розчинах. Патент України № 129983. 2018 Лис 26. *(Особистий внесок здобувача: розробка хемосенсора на основі каліксаренової мембрани)*

4. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Kalchenko VI, Kalchenko OI, Cherenok SO, Prynova OS, Dzyadevych SV. Calixarene-based sensor for the arginine determination. 8-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8), 2018 трав. 28-черв. 01; Одеса. Одеса: Астропринт, 2018, с. 119.

5. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Prilipko VO, Kuibida MA, Cherenok SO, Prynova OS, Sylenko O.M, Kalchenko OI,

Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Comparison of the possibility of using a calixarene based sensor and a two enzymes based biosensor for the arginine analysis. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 2018 Aug 27-30; Kyiv: SME Burlaka, 2018, p. 66.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розробка та використання електрохімічних біо- та хемосенсорів з інтегрованими в них наноматеріалами набула надзвичайної популярності протягом останніх років. Унікальні фізичні та хімічні властивості, що притаманні нанорозмірним матеріалам, дозволяють використовувати їх для покращення основних аналітичних характеристик біосенсора таких як, чутливість, відтворюваність, операційна стабільність та ін. При розробці біосенсорів використовують наночастинки різної природи, а саме благородні метали, оксиди металів, напівпровідники або композитні наночастинки, та багато інших.

Тому, основними завданнями роботи була розробка нових підходів контрольованого покращення аналітичних характеристик біосенсорів за рахунок використання нових мікро- та нанорозмірних матеріалів.

Перша частина роботи присвячена використанню мікро- та нанорозмірних частинок цеолітів для модифікації біоселективних елементів біосенсорів з метою покращення їхніх основних параметрів. В ході роботи було запропоновано нову методику використання цеолітів у складі ферментних біосенсорів (рис. 6.1). Перш за все, проводився вибір ферменту як чутливого елементу біосенсора для розпізнавання відповідного субстрату. Після цього, в залежності від варіанту ферментативної реакції, обирався тип електрохімічного перетворювача, що буде використовуватись в роботі. Якщо, в ході реакції відбувалась зміна рН, використовували потенціометричний метод дослідження. У випадку, коли біохімічна реакція характеризувалась утворенням електроактивних речовин - обирали амперометричний метод, а, в разі зміни електропровідності розчинів в ході реакції - обирали кондуктометрію як метод дослідження.

Методика виготовлення ферментних біосенсорів із використанням цеоліту

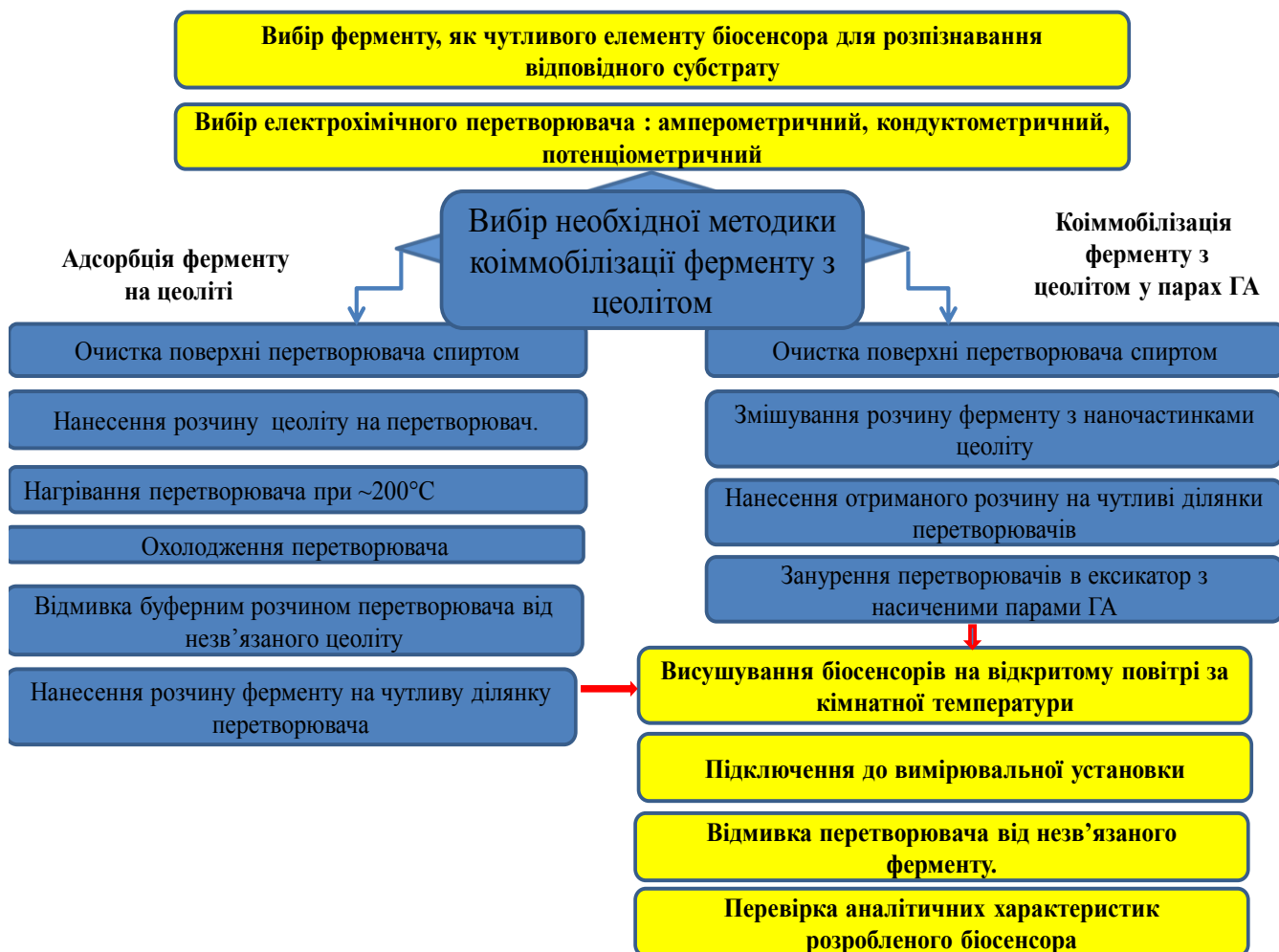


Рис. 6.1. Схема приготування ферментних біосенсорів на основі цеолітів

Після вибору ферменту і відповідного типу електрохімічного перетворювача, обирали необхідну методику коїмобілізації ферменту з наночастинками. В даній роботі запропоновано два варіанти коїмобілізації ферменту з цеолітом: адсорбція ферменту на цеоліті та коїмобілізація ферменту з частинками цеоліту у парах ГА.

В разі застосування методики адсорбції ферменту на цеоліті, передусім поверхню перетворювача очищували за допомогою ватного тампону, змоченого в етиловому спирті. Після процедури очищення, на чутливі ділянки перетворювача наносили нанокмпозит цеоліту та проводили його нагрівання при 80-200 °С. Таке нагрівання є необхідним для закріплення

частинок цеоліту на поверхні перетворювача. На наступному етапі проводили охолодження даного перетворювача до кімнатної температури та відмивку його буферним розчином від незв'язаного цеоліту. Вслід за цим проводили нанесення розчину ферменту на чутливу ділянку перетворювача.

У випадку застосування методики коїммобілізації ферменту з частинками цеоліту у парах ГА, поверхню перетворювача, також очищували за допомогою змоченого спиртом ватного тампону. Після цієї процедури, попередньо приготовлений розчин, що являв собою суміш ферменту з БСА та наночастинками цеоліту, наносили на чутливі ділянки перетворювача, який поміщали в ексікатор з насиченими парами ГА. Далі, незалежно від типу обраної методики коїммобілізації ферменту з цеолітом, забезпечували висихання приготовленого біосенсора на відкритому повітрі за кімнатної температури. Після цього біосенсор підключали до вимірювальної установки та проводили його відмивку від незв'язаного ферменту. На наступному етапі проводили перевірку аналітичних характеристик розробленого біосенсора. В результаті роботи було показано можливість використання цеолітів в якості адсорбентів для різних ферментів, при виготовленні кондуктометричних, потенціометричних та амперометричних біосенсорів.

Однією з найважливіших аналітичних характеристик біосенсора є його селективність, тобто здатність визначати лише одну цільову сполуку, не реагуючи, при цьому, на інші речовини. Саме ця характеристика є дуже важливим фактором, коли мова йде про дослідження зразків реальних біологічних рідин. В разі використання в роботі амперометричних біосенсорів, необхідно враховувати, що головними інтерферентами, в цьому випадку, виступають електроактивні речовини, які здатні окиснюватись на робочому електроді, і генерувати струм (наприклад: аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота, дофамін, та ін.). Тому покращення селективності біосенсора до можливих інтерферентів є обов'язковою стадією роботи при розробці біосенсорів будь-якого типу. Враховуючи вищесказане, одним із завдань даної роботи, була розробка методики покращення селективності

амперометричного перетворювача за рахунок нанесення на його чутливу поверхню нанорозмірної фенілендіамінової мембрани (рис. 6.2).

Методика покращення селективності амперометричного перетворювача за рахунок нанесення додаткової фенілендіамінової мембрани

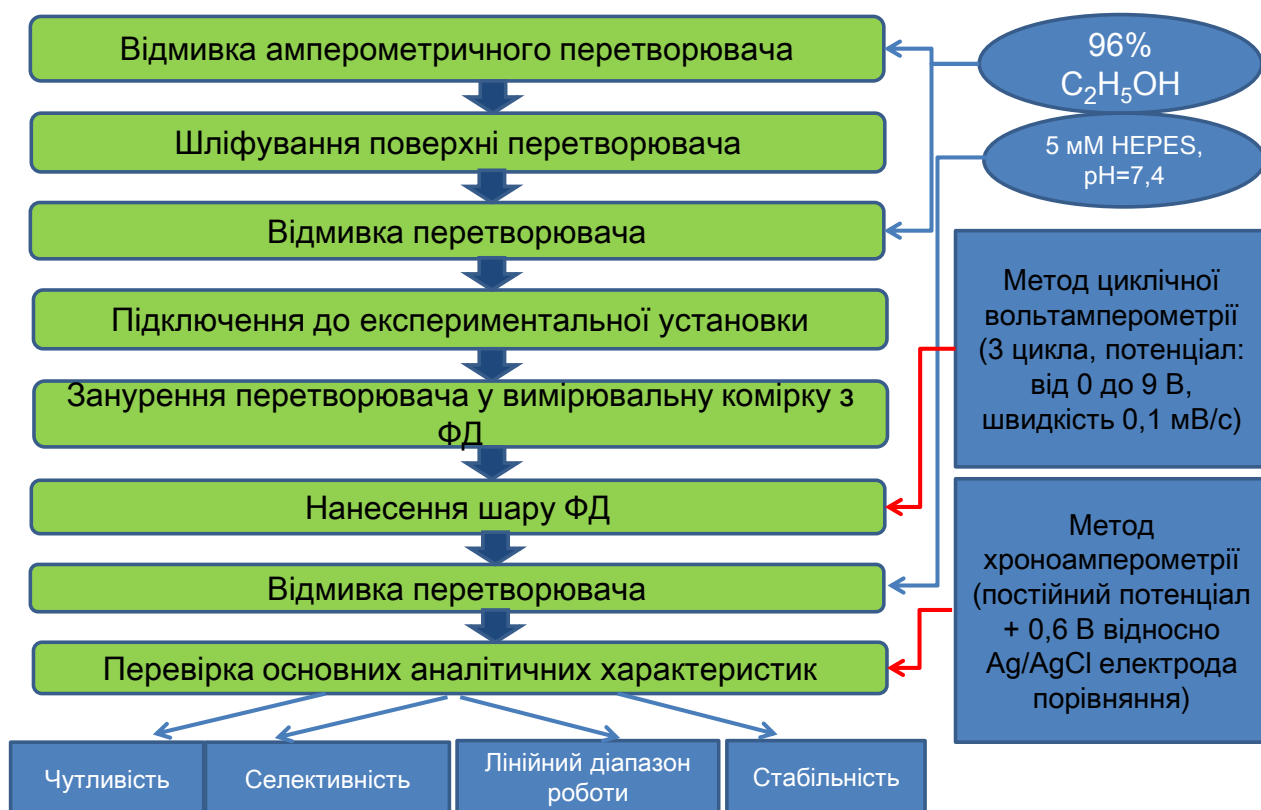


Рис. 6.2. Схема методики покращення селективності амперометричного перетворювача.

Поверхню очищеного 96 % етиловим спиртом амперометричного перетворювача шліфували за допомогою абразивного паперу, і повторно протирали його за допомогою змоченого спиртом ватного тампону. Очищений перетворювач підключали до експериментальної установки та занурювали у вимірювальну комірку, що містила розчин *m*-фенілендіаміну. З використанням методу циклічної вольтамперометрії проводили нанесення шару поліфенілендіаміну на поверхню амперометричного перетворювача, після чого перетворювач відмивали у робочому буфері і, використовуючи метод хроноамперометрії, перевіряли його основні аналітичні

характеристики: чутливість, селективність, лінійний діапазон роботи та стабільність при зберіганні. Було показано, що ПФД-мембрана, нанесена на поверхню перетворювача залишаючись тривалий час проникною до пероксиду водню, водночас є непроникною до електроактивних речовин, і може успішно використовуватись при розробці біосенсорів.

Одним із нових класів органічних сполук, які можуть використовуватись в якості селективних елементів, є каліксарени. Вони являють собою синтетично доступні хімічні сполуки специфічної будови, яким притаманні деякі унікальні властивості, а саме: можливість їх функціоналізації необхідними хімічними групами, здатність їх до самоорганізації, молекулярного розпізнавання, а також до супрамолекулярних взаємодій. Саме завдяки таким особливостям структури, каліксарени являють собою перспективний об'єкт дослідження фармацевтичної, медичної, а також наукової галузі, в якій, в свою чергу, використовуються для розробки нових сенсорних технологій.

В роботі розроблено кондуктометричний сенсор на основі каліксаренової мембрани та запропоновано схему створення такого хемосенсора для визначення аргініну (рис. 6.3). Враховуючи природу аналіту, який визначався в процесі роботи, синтезували каліксарен певного типу. В залежності від того, як змінювалися параметри розчину в результаті взаємодії даного каліксарену з субстратом, проводили вибір типу перетворювача. Необхідний розчинник обирався відповідно до типу самого каліксарену та матеріалу перетворювача, на який його наносили в подальшій роботі. Оптимальний метод іммобілізації визначався шляхом досягнення найкращого закріплення каліксарену на чутливій поверхні перетворювача. З метою більш стабільного та ефективного закріплення каліксарену на поверхні перетворювача проводили дослідження оптимальних умов іммобілізації.

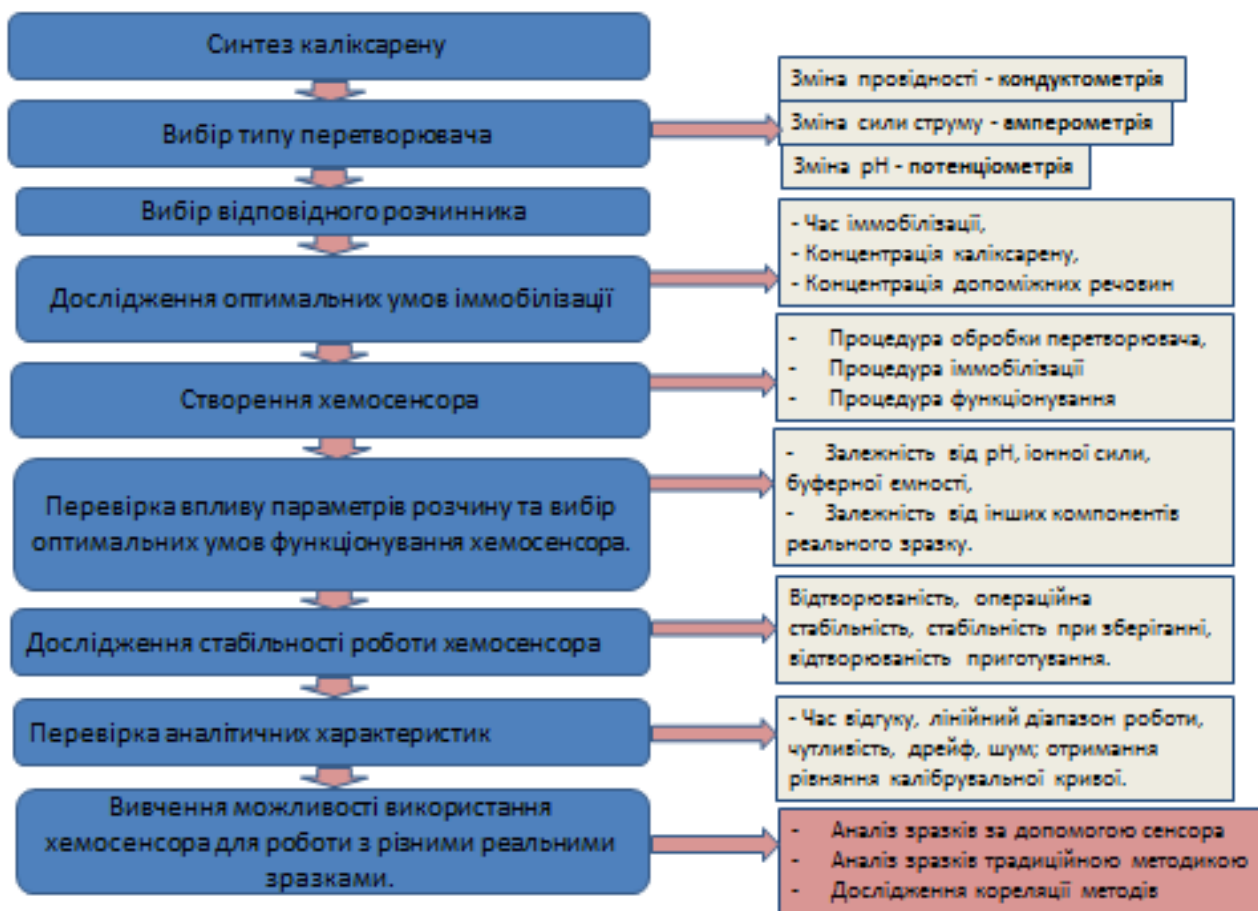


Рис. 6.3. Схема розробки хемосенсора на основі каліксаренової мембрани.

Для розробленого хемосенсора проводили перевірку впливу параметрів розчину на його роботу та обирали оптимальні умови для його ефективного функціонування. Було досліджено стабільність роботи даного сенсора та перевірено його аналітичні характеристики. Показано, що розроблений хемосенсор проявляв високу чутливість до аргініну, що говорить про можливість його подальшого застосування для аналізу реальних зразків.

Успішний аналіз концентрації речовин у реальних зразках є безумовним підтвердженням працездатності сенсорів та можливості їх практичного використання. Тому, на останньому етапі роботи, створені

згідно запропонованих в роботі методик лабораторні прототипи сенсорів було протестовано шляхом аналізу реальних зразків.

Кондуктометричний біосенсор на основі уреазі, адсорбованої на силікаліті, був успішно використаний для визначення концентрацій сечовини у зразках сироватки крові здорових та хворих на ниркову недостатність людей. У крові здорових людей було визначено $4,5 \pm 1,1$ мМ та $5,7 \pm 0,8$ мМ сечовини, в той час як, у зразках, отриманих від хворих людей, діапазон концентрацій сечовини становив від 27,2 мМ до 47,4 мМ. Розбіжність між результатами різних біосенсорних вимірювань становила 20 % для зразків здорових людей, та 10 % для зразків хворих. Фактично, вимірювання високих концентрацій сечовини є більш точним через використання більшого розведення зразку у робочій комірці біосенсора, що призводить до меншої концентрації інтерферуючих речовин. Біосенсорні результати були підтверджені шляхом визначення сечовини у тих самих зразках із використанням традиційного спектрофотометричного методу – діацетилмоноксимної реакції (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Результати аналізу концентрацій сечовини у зразках сироватки крові людей з використанням традиційного та біосенсорного методів

№ зразку сироватки крові	Метод аналізу сечовини	
	Біосенсор, мМ	Традиційний метод, мМ
1	$28,9 \pm 3,7$	$27,2 \pm 2,5$
2	$39,8 \pm 3,3$	$42,0 \pm 3,8$
3	$42,7 \pm 2,6$	$36,7 \pm 3,1$
4	$57,2 \pm 6,1$	$47,4 \pm 4,1$
5	$37,9 \pm 5,6$	$33,1 \pm 3,5$
6	$5,9 \pm 1$	$5,6 \pm 0,6$
7	$4,5 \pm 1,1$	$4,4 \pm 0,6$

Кореляція результатів біосенсора та традиційного метода була високою ($R=0,995$). Слід відмітити, що результатів біосенсорного аналізу було достатньо для достовірного розрізнення зразків сироватки крові хворих та здорових людей, а також, для контролю ефективності лікування хворих.

Для сенсорної перевірки концентрації аргініну було відібрано 6 препаратів: «Вейрон» (Франція), «Тівомакс» (Україна), «Глутаргін» (Україна), «Бетаргін» (Україна), «Тівортін» (Україна), «Аміноплазмаль» (Німеччина). Визначення концентрацій аргініну проводили за допомогою метода стандартних додавань. В нашому варіанті метод стандартних додавань полягав у тому, що спочатку додавали досліджуваній розчин з невідомою концентрацією аргініну (аліквота фармацевтичного препарату). Після цього додавали три порції стандартного розчину з відомою концентрацією аргініну (рис. 6.4).

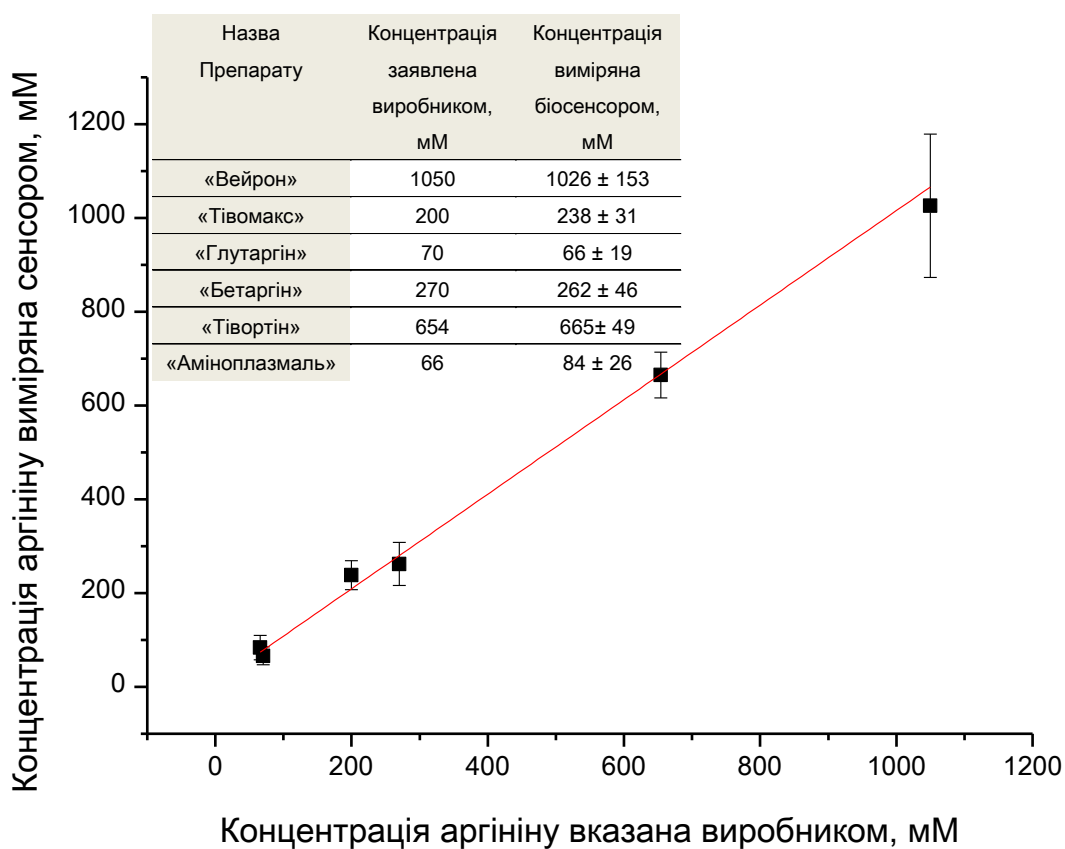


Рис. 6.4. Порівняння результатів біосенсорного аналізу аргініну в фармпрепаратах з даними, вказаними виробниками. Коефіцієнт кореляції склав 0,9888

По отриманим відгукам сенсора будували пряму, за рівнянням якої визначали концентрацію аргініну у вимірювальній комірці. Далі розраховували концентрацію аргініну в аліквоті, тобто в досліджуваному препараті з урахуванням розведення. Також було проведено оцінку кореляції даних щодо концентрацій аргініну в лікарських засобах, виміряних біосенсором та заявлених виробниками.

Результати, що були отримані при аналізі реальних зразків з використанням розроблених в роботі лабораторних прототипів сенсорів, свідчать про перспективність їх практичного застосування.

ВИСНОВКИ

Розроблено нові підходи використання мікро- та наноматеріалів (цеоліти різної природи, каліксарени, полі-*m*-фенілендіамінові плівки) для покращення основних аналітичних характеристик електрохімічних біо- та хемосенсорів, таких як лінійний діапазон роботи, чутливість, мінімальна границя визначення, похибка вимірювань, відтворюваність виготовлення, стабільність тощо.

1. Розроблено нові методи створення біоселективних елементів з використанням коїмобілізації ферментів з різними цеолітами в парах глутарового альдегіду. Показано, що використання методу формування біоселективної мембрани біосенсора з використанням коїмобілізації уреазі з цеолітами різних модифікацій призводить до покращення чутливості електрохімічних біосенсорів щонайменше в 2,5 рази.

2. Доведено, що застосування нового методу адсорбції на цеолітах призводить до покращення майже всіх аналітичних характеристик біосенсорів на основі різних ферментів.

- Ацетилхолінестераза: мінімальна границя визначення ацетилхоліну – 0,5 мкМ; чутливість - 1800 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,002-0,4 мМ.

- Уреаза: мінімальна границя визначення сечовини – 1,5 мкМ; чутливість - 1480 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,01-1 мМ.

- Глюкозооксидаза: мінімальна границя визначення глюкози – 1,5 мкМ; чутливість – 884 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,005-1 мМ.

- Рекомбінантна уреаза: мінімальна границя визначення сечовини – 25 мкМ; чутливість – 178 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,1- 7,5 мМ.

- Глутаматоксидаза: мінімальна границя визначення глутамату – 0,5 мкМ; чутливість – 0,5 мкА/мМ; лінійний діапазон роботи – 2,5-400 мкМ.

3. Оптимізовано методику формування додаткової напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну (3 циклічні вольтамперограми протягом 4,5 хвилин у 20 мМ розчині *m*-фенілендіаміну) для покращення

селективності амперометричного перетворювача. Така мембрана може використовуватись, щонайменше, протягом 2 годин безперервної роботи і зберігатися не менше 8 діб. З використанням запропонованої ПФД мембрани чутливість перетворювача до електроактивних речовин зменшувалась майже на 100 %.

4. Розроблено новий кондуктометричний хемосенсор на основі каліксарену (ди-(3-метилсульфідпропокси) калікс[4]арен метиленбісфосфо-нова кислота) для визначення аргініну, досліджено його аналітичні характеристики (шум базової лінії - 0,375 мкСм; дрейф базової лінії – 0,062 мкСм/хв.; мінімальна границя визначення – 5 мкМ; чутливість - 37,5 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 5-150 мкМ), які порівняно з параметрами двоферментного біосенсора на основі уреазі та аргінази.

5. Створено лабораторні прототипи електрохімічних сенсорів на основі запропонованих методів формування біо(хемо)селективних елементів з використанням мікро- і нанорозмірних матеріалів, досліджено їхні аналітичні характеристики, та продемонстровано можливість їхньої роботи з реальними зразками.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(1–2):121–31.
2. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине. *Вісник фармакології і фармації.* 2007;12:5–13.
3. Jin W, Maduraiveeran G. Nanomaterial-based environmental sensing platforms using state-of-the-art electroanalytical strategies. *J Anal Sci Technol.* 2018;9(1):18.
4. Kurbanoglu S, Ozkan SA, Merkoçi A. Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. *Biosens Bioelectron.* 2017;89:886–98.
5. Li H, Xu D. Silver nanoparticles as labels for applications in bioassays. *TrAC Trends Anal Chem.* 2014;61:67–73.
6. Zhang X, Liu D, Li L, You T. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Novel Free-Standing Nitrogen-Doped Carbon Nanospheres@Carbon Nanofibers Composite Film. *Sci Rep.* 2015;5(1):9885.
7. Xia F, Zuo X, Yang R, White RJ, Xiao Y, Kang D, et al. Label-Free, Dual-Analyte Electrochemical Biosensors: A New Class of Molecular-Electronic Logic Gates. *J Am Chem Soc.* 2010;132(25):8557–9.
8. Hu J, Wang T, Kim J, Shannon C, Easley CJ. Quantitation of Femtomolar Protein Levels via Direct Readout with the Electrochemical Proximity Assay. *J Am Chem Soc.* 2012;134(16):7066–72.
9. Wang T, Wang D, Padelford JW, Jiang J, Wang G. Near-Infrared Electrogenenerated Chemiluminescence from Aqueous Soluble Lipoic Acid Au Nanoclusters. *J Am Chem Soc.* 2016;138(20):6380–3.
10. Kumar S. Enzyme Nanoparticles (ENPs) based biosensors. *International Conference on Biomedical Engineering and Assistive Technologies*

- (BEATS-2010); 2010, Dec 17- 19; Jalandhar. Jalandhar National Institute of Technology Jalandhar; 2010.
11. Wang J. Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles. *Microchim Acta*. 2012;177(3–4):245–70.
 12. Zhang Y, Wei Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. *J Electroanal Chem*. 2016;781:401–9.
 13. Teles FRR, Fonseca LP. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2008 Dec;28(8):1530–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493108000829>
 14. Патон Б., Москаленко В. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти. *Вісник НАН України*. 2009;6:18–26.
 15. Niemeyer CM. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angew Chemie Int Ed*. 2001;40(22):4128–58.
 16. Kittelson DB. Engines and nanoparticles. *J Aerosol Sci*. 1998;29(5–6):575–88.
 17. Merkoçi A, Pumera M, Llopis X, Pérez B, del Valle M, Alegret S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. *TrAC Trends Anal Chem*. 2005;24(9):826–38.
 18. Tamayo J, Kosaka PM, Ruz JJ, San Paulo Á, Calleja M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem Soc Rev*. 2013;42(3):1287–311.
 19. Antonio B, Antonella G, Angela C, Gianfranco B, Isabella D, Gaia R, et al. An Integrated Caco-2TC7cells/biosensors Device for the Real Time Monitoring of Intestinal Glucose and Polyphenols Absorption and Hypoglycemic Effect of Phytochemicals. *Procedia Technol*. 2017;27:169–71.
 20. Luo W. The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev*. 2006;20(8):954–65.
 21. Kerman K, Saito M, Tamiya E, Yamamura S, Takamura Y. Nanomaterial-

- based electrochemical biosensors for medical applications. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2008;27(7):585–92.
22. Maduraiveeran G, Jin W. Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. *Trends Environ Anal Chem.* 2017;13:10–23.
 23. Zeng Y, Zhu Z, Du D, Lin Y. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety. *J Electroanal Chem.* 2016;781:147–54.
 24. Wang Y, Qu K, Tang L, Li Z, Moore E, Zeng X, et al. Nanomaterials in carbohydrate biosensors. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2014;58:54–70.
 25. Badea M, Curulli A, Palleschi G. Oxidase enzyme immobilisation through electropolymerised films to assemble biosensors for batch and flow injection analysis. *Biosens Bioelectron [Internet].* 2003;18(5–6):689–98.
 26. Gan N, Yang X, Xie D, Wu Y, Wen W. A Disposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Magnetic Composite Nano-Particles Modified Screen Printed Carbon Electrode. *Sensors.* 2010;10(1):625–38.
 27. Li N, Zhao P, Astruc D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angew Chemie Int Ed.* 2014;53(7):1756–89.
 28. Weiner RG, Skrabalak SE. Metal Dendrimers: Synthesis of Hierarchically Stellated Nanocrystals by Sequential Seed-Directed Overgrowth. *Angew Chemie Int Ed.* 2015;54(4):1181–4.
 29. Gilroy KD, Ruditskiy A, Peng H-C, Qin D, Xia Y. Bimetallic Nanocrystals: Syntheses, Properties, and Applications. *Chem Rev.* 2016;116(18):10414–72.
 30. Ribeiro FWP, Barroso MF, Morais S, Viswanathan S, de Lima-Neto P, Correia AN, et al. Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. *Bioelectrochemistry.* 2014;95:7–14.
 31. Liu T, Xu M, Yin H, Ai S, Qu X, Zong S. A glassy carbon electrode modified with graphene and tyrosinase immobilized on platinum nanoparticles for sensing organophosphorus pesticides. *Microchim Acta.*

- 2011;175(1–2):129–35.
32. Choi HN, Han JH, Park JA, Lee JM, Lee W-Y. Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Encapsulated in Carbon Nanotube–Titania–Nafion Composite Film on Platinized Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*. 2007;19(17):1757–63.
 33. Lim SH, Wei J, Lin J, Li Q, KuaYou J. A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose oxidase onto Nafion-solubilized carbon nanotube electrode. *Biosens Bioelectron*. 2005;20(11):2341–6.
 34. Batra B, Pundir CSS. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. *Biosens Bioelectron*. 2013;47:496–501.
 35. Sinha R, Ganesana M, Andreescu S, Stanciu L. AChE biosensor based on zinc oxide sol–gel for the detection of pesticides. *Anal Chim Acta*. 2010;661(2):195–9.
 36. Chauhan N, Pundir CS. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe₃O₄ nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides. *Electrochim Acta*. 2012;67:79–86.
 37. Wu F, Xu J, Tian Y, Hu Z, Wang L, Xian Y. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on TiO₂ nanotube arrays via seeded-growth synthesis. *Biosens Bioelectron*. 2008;24(2):198–203.
 38. Li J, Li X, Zhao Q, Jiang Z, Tadé M, Wang S. Polydopamine-assisted decoration of TiO₂ nanotube arrays with enzyme to construct a novel photoelectrochemical sensing platform. *Sensors Actuators B Chem*. 2018;255:133–9.
 39. Abrar MA, Dong Y, Lee PK, Kim WS. Bendable Electro-chemical Lactate Sensor Printed with Silver Nano-particles. *Sci Rep*. 2016;6(1):30565.
 40. Han E, Yang Y, He Z, Cai J, Zhang X, Dong X. Development of tyrosinase biosensor based on quantum dots/chitosan nanocomposite for detection of

- phenolic compounds. *Anal Biochem.* 2015;486:102–6.
41. Dhyani H, Ali MA, Pal SP, Srivastava S, Solanki PR, Malhotra BD. Mediator-free biosensor using chitosan capped CdS quantum dots for detection of total cholesterol. 2015;5:45928-45934.
 42. Valencia GA, de Oliveira Vercik LC, Vercik A. A new conductometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on chitosan and chitosan/gold nanoparticle films. *J Polym Eng.* 2014;34(7).
 43. Vaghela C, Kulkarni M, Haram S, Aiyer R, Karve M. A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *Int J Biol Macromol.* 2018;108:32–40.
 44. Zhou Y, Wang M, Yin H, Ai S. Amperometric determination of the activity of protein kinase a using a glassy carbon electrode modified with IgG functionalized gold nanoparticles conjugated to horseradish peroxidase. *Microchim Acta.* 2017;184(9):3301–8.
 45. Pavlov V, Xiao Y, Willner I. Inhibition of the acetylcholine esterase-stimulated growth of Au nanoparticles: Nanotechnology-based sensing of nerve gases. *Nano Lett.* 2005;5(4):649–53.
 46. Lebègue E, Anderson CM, Dick JE, Webb LJ, Bard AJ. Electrochemical detection of single phospholipid vesicle collisions at a Pt ultramicroelectrode. *Langmuir.* 2015;31(42):11734–9.
 47. Li Y, Sella C, Lemaître F, Guille Collignon M, Thouin L, Amatore C. Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel. *Electroanalysis.* 2013;25(4):895–902.
 48. Rismetov B, Ivandini TA, Saepudin E, Einaga Y. Electrochemical detection of hydrogen peroxide at platinum-modified diamond electrodes for an application in melamine strip tests. *Diam Relat Mater.* 2014;48:88–95.
 49. Olivia H, Sarada BV, Honda K, Fujishima A. Continuous glucose monitoring using enzyme-immobilized platinized diamond microfiber

- electrodes. *Electrochim Acta*. 2004;49(13):2069–76.
50. Wang L, Li J, Pan Y, Min L, Zhang Y, Hu X. Platinum nanoparticle-assembled nanoflake-like tin disulfide for enzyme-based amperometric sensing of glucose. *Microchim Acta*. 2017;184(7):2357–63.
 51. Adeloju SB, Hussain S. Potentiometric sulfite biosensor based on entrapment of sulfite oxidase in a polypyrrole film on a platinum electrode modified with platinum nanoparticles. *Microchim Acta*. 2016;183(4):1341–50.
 52. Crespilho FN, Iost RM, Travain SA, Oliveira ON, Zucolotto V. Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(10):3073–7.
 53. Kavetsky T, Smutok O, Gonchar M, Demkiv O, Klepach H, Kukhazh Y. Laccase-containing ureasil-polymer composite as the sensing layer of an amperometric biosensor. *J Appl Polym Sci*. 2017;134(36):45278.
 54. Wang J, Chen X, Liao K, Wang G, Han M. Pd nanoparticle-modified electrodes for nonenzymatic hydrogen peroxide detection. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10(1):311.
 55. Bozkurt S, Tosun B, Sen B, Akocak S, Savk A, Ebeoğlu MF. A hydrogen peroxide sensor based on TNM functionalized reduced graphene oxide grafted with highly monodisperse Pd nanoparticles. *Anal Chim Acta*. 2017;989:88–94.
 56. Barquero-Quirós M, Arcos-Martínez M. Effect of nanoparticles on modified screen printed inhibition superoxide dismutase electrodes for aluminum. *Sensors*. 2016;16(10):1588.
 57. Guzsvány V, Anojčić J, Radulović E, Vajdle O, Stanković I, Madarász D, et al. Screen-printed enzymatic glucose biosensor based on a composite made from multiwalled carbon nanotubes and palladium containing particles. *Microchim Acta*. 2017;184(7):1987–96.
 58. Zeng Q, Cheng J-S, Liu X-F, Bai H-T, Jiang J-H. Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a

- glucose biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2011;26(8):3456–63.
59. Zhu J, Liu X, Wang X, Huo X, Yan R. Preparation of polyaniline–TiO₂ nanotube composite for the development of electrochemical biosensors. *Sensors Actuators B Chem.* 2015;221:450–7.
 60. Chen W-H, Huang S-J, Ko H-H, Lo A-Y, Lee H-K, Wu L-L. Acidity and sorption properties of nano-sized mesoporous aluminosilicate materials. *Studies in Surface Science and Catalysis.* 2005; 156:657-662.
 61. Mintova S, Gilson J-P, Valtchev V. Advances in nanosized zeolites. *Nanoscale.* 2013;5(15):6693.
 62. Valdés MG, Pérez-Cordoves AI, Díaz-García ME. Zeolites and zeolite-based materials in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2006;25(1):24–30.
 63. Ispas C, Sokolov I, Andreescu S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(2):543–54.
 64. Nenkova R, Wu J, Zhang Y, Godjevargova T. Influence of different nanozeolite particles on the sensitivity of a glucose biosensor. *Anal Biochem.* 2013;439(1):65–72.
 65. Soldatkin OO, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV, El'skaya AV. Elaboration of new method of enzyme adsorption on silicalite and nano beta zeolite for amperometric biosensor creation. *Biopolym Cell.* 2014;30(4):291–8.
 66. Pyeshkova VN, Dudchenko OY, Soldatkin OO, Kucherenko IS, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B. Application of silicalite for improvement of enzyme adsorption on the stainless steel electrodes. *Biopolym Cell.* 2014;30(6):462–8.
 67. Hamlaoui M, Reybier K, Marrakchi M, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Kherrat R. Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite. *Anal Chim Acta.* 2002;466(1):39–45.
 68. Shelyakina MK, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Kasap BO, Akata B, Dzyadevych SV. Study of zeolite influence on analytical characteristics of

- urea biosensor based on ion-selective field-effect transistors. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):124.
69. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Marchenko SV, Ozansoy Kasap B, Akata B, Soldatkin AP. Application of enzyme/zeolite sensor for urea analysis in serum. *Mater Sci Eng C.* 2014;42:155–60.
 70. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Kasap BO, Öztürk S, Akata B, Soldatkin AP. Elaboration of urease adsorption on silicalite for biosensor creation. *Electroanalysis.* 2012;24(6):1380–5.
 71. Kucherenko I, Soldatkin O, Kasap BO, Kirdeciler SK, Kurc BA, Jaffrezic-Renault N. Nanosized zeolites as a perspective material for conductometric biosensors creation. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):209.
 72. Soy E, Arkhypova V, Soldatkin O, Shelyakina M, Dzyadevych S, Warzywoda J. Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals. *Mater Sci Eng C.* 2012;32(7):1835–42.
 73. Ozansoy Kasap B, Marchenko SV, Soldatkin OO, Dzyadevych SV, Akata Kurc B. Biosensors based on nano-gold/zeolite-modified ion selective field-effect transistors for creatinine detection. *Nanoscale Res Lett.* 2017;12(1):162.
 74. Cui L, Li C, Tang B, Zhang C. Advances in the integration of quantum dots with various nanomaterials for biomedical and environmental applications. *Analyst.* 2018;143(11):2469–78.
 75. Ertek B, Dilgin Y. Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode. *Bioelectrochemistry.* 2016;112:138–44.
 76. Zhiguo G, Shuping Y, Zaijun L, Xiulan S, Guangli W, Yinjun F. An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe-CdS core-shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene-gold nanocomposite and gold nanoparticle. *Electrochim Acta.* 2011;56(25):9162–

- 7.
77. Zeng X, Tu W, Li J, Bao J, Dai Z. Photoelectrochemical biosensor using enzyme-catalyzed in situ propagation of CdS quantum dots on graphene oxide. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(18):16197–203.
78. Battigelli A, Ménard-Moyon C, Da Ros T, Prato M, Bianco A. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(15):1899–920.
79. Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A Review. *Electroanalysis*. 2010;22(10):1027–36.
80. Pilehvar S, De Wael K. Recent advances in electrochemical biosensors based on fullerene-C60 nano-structured platforms. *Biosensors*. 2015;5(4):712–35.
81. Gokoglan TC, Soylemez S, Kesik M, Unay H, Sayin S, Yildiz HB. A novel architecture based on a conducting polymer and calixarene derivative: its synthesis and biosensor construction. *RSC Adv*. 2015;5(45):35940–7.
82. Comba FN, Romero MR, Garay FS, Baruzzi AM. Mucin and carbon nanotube-based biosensor for detection of glucose in human plasma. *Anal Biochem*. 2018;550:34–40.
83. Kafi AK, Naqshabandi M, Yusoff MM, Crossley MJ. Improved peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase/Carbon Nanotube on a thiol-modified gold electrode. *Enzyme Microb Technol*. 2018;113:67–74.
84. Hassan RY, Kamel AM, Hashem MS, Hassan HN, Abd El-Ghaffar MA. A new disposable biosensor platform: carbon nanotube/poly(o-toluidine) nanocomposite for direct biosensing of urea. *J Solid State Electrochem*. 2018;22(6):1–7.
85. Kaçar C, Erden PE, Kılıç E. Amperometric l-lysine biosensor based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-SnO₂ nanoparticles-graphene composite. *Appl Surf Sci*. 2017;419:916–23.
86. Baluta S, Lesiak A, Cabaj J. Graphene quantum dots-based electrochemical

- biosensor for catecholamine neurotransmitters detection. *Electroanalysis*. 2018;30(8):1773–82.
87. Wang Y, Zhai F, Hasebe Y, Jia H, Zhang Z. A highly sensitive electrochemical biosensor for phenol derivatives using a graphene oxide-modified tyrosinase electrode. *Bioelectrochemistry*. 2018;122:174–82.
88. Díaz Nieto CH, Granero AM, Lopez JC, Pierini GD, Levin GJ, Fernández H. Development of a third generation biosensor to determine hydrogen peroxide based on a composite of soybean peroxidase/chemically reduced graphene oxide deposited on glassy carbon electrodes. *Sensors Actuators B Chem* . 2018 J;263:377–86.
89. Wang Y, Liu X, Xu X, Yang Y, Huang L, He Z. Preparation and characterization of reduced graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite by a facile in-situ deposition method for glucose biosensor applications. *Mater Res Bull*. 2018;101:340–6.
90. Saeedfar K, Heng L, Ling T, Rezayi M. Potentiometric urea biosensor based on an immobilised fullerene-urease bio-conjugate. *Sensors*. 2013;13(12):16851–66.
91. Biloivan OA, Rogaleva NS, Korpan YI. Optimization of bioselective membrane of amperometric enzyme sensor on basis of glucose oxidase using NH₂-modified multi-wall carbone nanotubes. *Biopolym Cell*. 2010;26(1):56–61.
92. Cogal S, Celik Cogal G, Oksuz AU. Plasma-modified multiwalled carbon nanotubes with polyaniline for glucose biosensor applications. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2018;67(7):454–61.
93. Arlyapov VA, Kamanin SS, Kamanina OA, Reshetilov AN. Biosensor based on screen-printed electrode and glucose-oxidase modified with the addition of single-walled carbon nanotubes and thermoexpanded graphite. *Nanotechnologies Russ*. 2017;12(11–12):658–66.
94. Romero-Arcos M, Garnica-Romo MG, Martínez-Flores HE. Characterization of amperometric laccase biosensor based on carbon

- nanotube. *Procedia Technol.* 2017;27:279–81.
95. Benjamin SR, Vilela RS, de Camargo HS, Guedes MI, Fernandes F, Colmati F. Enzymatic electrochemical biosensor based on multiwall carbon nanotubes and cerium dioxide nanoparticles for rutin detection. *Int J Electrochem Sci.* 2018;563–86.
 96. Wu ZL, Liu ZX, Yuan YH. Carbon dots: materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission. *J Mater Chem B.* 2017;5(21):3794–809.
 97. Sun X, Lei Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC Trends Anal Chem.* 2017;89:163–80.
 98. Choi Y, Choi Y, Kwon OH, Kim BS. Carbon dots: bottom-up syntheses, properties, and light-harvesting applications. *Chem - An Asian J.* 2018;13(6):586–98.
 99. Shi H, Wei J, Qiang L, Chen X, Meng X. Fluorescent carbon dots for biolmaging and biosensing applications. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(10):2677–99.
 100. Su Y, Zhou X, Long Y, Li W. Immobilization of horseradish peroxidase on amino-functionalized carbon dots for the sensitive detection of hydrogen peroxide. *Microchim Acta.* 2018;185(2):114.
 101. Canevari TC, Cincotto FH, Gomes D, Landers R, Toma HE. Magnetite nanoparticles bonded carbon quantum dots magnetically confined onto screen printed carbon electrodes and their performance as electrochemical sensor for NADH. *Electroanalysis.* 2017;29(8):1968–75.
 102. Tang L, Wang Y, Li Y, Feng H, Lu J, Li J. Preparation, structure, and electrochemical properties of reduced graphene sheet films. *Adv Funct Mater.* 2009;19(17):2782–9.
 103. Kumar S, Ahlawat W, Kumar R, Dilbaghi N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosens Bioelectron.* 2015;70:498–503.
 104. Palanisamy S, Ramaraj SK, Chen S-M, Yang TCK, Yi-Fan P, Chen T-W, et

- al. A novel laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol. *Sci Rep.* 2017;7:41214.
105. Neklyudov VV, Khafizov NR, Sedov IA, Dimiev AM. New insights into the solubility of graphene oxide in water and alcohols. *Phys Chem Chem Phys.* 2017;19(26):17000–8.
106. Chae MS, Yoo YK, Kim J, Kim TG, Hwang KS. Graphene-based enzyme-modified field-effect transistor biosensor for monitoring drug effects in Alzheimer's disease treatment. *Sensors Actuators B Chem.* 2018;272:448–58.
107. Perumal V, Hashim U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J Appl Biomed.* 2014;12(1):1–15.
108. Lanzellotto C, Favero G, Antonelli ML, Tortolini C, Cannistraro S, Coppari E, et al. Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical applications. *Biosens Bioelectron.* 2014;55:430–7.
109. Barberis A, Spissu Y, Fadda A, Azara E, Bazzu G, Marceddu S. Simultaneous amperometric detection of ascorbic acid and antioxidant capacity in orange, blueberry and kiwi juice, by a telemetric system coupled with a fullerene- or nanotubes-modified ascorbate subtractive biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2015 May;67:214–23.
110. Carano M, Cosnier S, Kordatos K, Marcaccio M, Margotti M, Paolucci F. A glutathione amperometric biosensor based on an amphiphilic fullerene redox mediator immobilised within an amphiphilic polypyrrole film. *J Mater Chem.* 2002;12(7):1996–2000.
111. Piotrowski P, Jakubow K, Kowalewska B, Kaim A. Dioxygen insensitive C 70 /AuNPs hybrid system for rapid and quantitative glucose biosensing. *RSC Adv.* 2017;7(72):45634–40.
112. Lin LH, Shih JS. Immobilized fullerene c60-enzyme-based electrochemical glucose sensor. *J Chinese Chem Soc.* 2011;58(2):228–35.

113. Zhilei W, Zaijun L, Xiulan S, Yinjun F, Junkang L. Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(6):1434–8.
114. Goyal RN, Gupta VK, Bachheti N. Fullerene-C60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone—An anabolic steroid used in doping. *Anal Chim Acta.* 2007;597(1):82–9.
115. Rather JA, De Wael K. Fullerene-C60 sensor for ultra-high sensitive detection of bisphenol-A and its treatment by green technology. *Sensors Actuators B Chem.* 2013;176:110–7.
116. Goyal RNN, Gupta VKK, Bachheti N, Sharma RAA. Electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of high concentration of ascorbic acid using a fullerene-C60 coated gold electrode. *Electroanalysis.* 2008;20(7):757–64.
117. Ikeda A, Shinkai S. Novel cavity design using calix[n]arene skeletons: toward molecular recognition and metal binding. *Chem Rev.* 1997;97(5):1713–34.
118. Morohashi N, Narumi F, Iki N, Hattori T, Miyano S. Thiocalixarenes. *Chem Rev.* 2006;106(12):5291–316.
119. Demirkol DO, Yildiz HB, Sayın S, Yilmaz M. Enzyme immobilization in biosensor constructions: self-assembled monolayers of calixarenes containing thiols. *RSC Adv.* 2014;4(38):19900–7.
120. Saiapina OY, Kharchenko SG, Vishnevskii SG, Pyeshkova VM, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Development of conductometric sensor based on 25,27-di-(5-thio-octyloxy)calix[4]arene-crown-6 for determination of ammonium. *Nanoscale Res Lett.* 2016;11(1):105.
121. Daniele MA, Pedrero M, Burrs S, Chaturvedi P, Wan Salim WWA, Kuralay F, et al. Hybrid metallic nanoparticles: enhanced bioanalysis and biosensing via carbon nanotubes, graphene, and organic conjugation. *Nanobiosensors and Nanobioanalyses.* Tokyo: Springer Japan. 2015;137–66.
122. Hossain MF, Park JY. Fabrication of sensitive enzymatic biosensor based on

- multi-layered reduced graphene oxide added PtAu nanoparticles-modified hybrid electrode. Mishra YK, editor. PLoS One. 2017;12(3):e0173553.
123. Morteza Naghib S. Synthesis, characterization and electrochemical evaluation of polyvinylalchol/graphene oxide/silver nanocomposites for glucose biosensing application. *Int J Electrochem Sci* . 2018 Jan;1013–26.
 124. Varmira K, Mohammadi G, Mahmoudi M, Khodarahmi R, Rashidi K, Hedayati M, et al. Fabrication of a novel enzymatic electrochemical biosensor for determination of tyrosine in some food samples. *Talanta*. 2018;183:1–10.
 125. Shin DH, Kim W, Jun J, Lee JS, Kim JH, Jang J. Highly selective FET-type glucose sensor based on shape-controlled palladium nanoflower-decorated graphene. *Sensors Actuators B Chem*. 2018;264:216–23.
 126. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Kasap OO, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Application of silicalites with different particle sizes during development of enzyme-based conductometric biosensors. *Sens Electron Microsyst Technol*. 2013;10(1):60–9.
 127. Creighton E., Ganeshie S., Downing R., van Bekkum H. Stereoselective meerwein–ponndorf–verley and oppenauer reactions catalysed by zeolite BEA1. Communication presented at the First Francqui Colloquium, Brussels, 19–20 February 1996.1. *J Mol Catal A Chem*. 1997;115(3):457–72.
 128. Soldatkin O, Nazarova A, Krisanova N, Borysov A, Kucherenko D, Kucherenko I. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta*. 2015;135:67–74.
 129. Кучеренко ІС, Яковлева ОС, Солдаткін ОО, Мельник ВГ, Семеничева ЛМ, Солдаткін ОП. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних нікелевих перетворювачів за допомогою потенціостату «Palmsens» та його вітчизняного аналогу. *Biosensors*. 2014;11(1):42–52.

130. Soldatkin OO, Peshkova VM, Saiapina OY, Kucherenko IS, Dudchenko OY, Melnyk VG, et al. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*. 2013;115:200–7.
131. Sheliakina M, Arkhypova V, Soldatkin O, Saiapina O, Akata B, Dzyadevych S. Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*. 2014;121:18–23.
132. Дзядевич СВ, Шульга АА, Пацковский СВ, Архипова ВН, Солдаткин АП. Тонкопленочные кондуктометрические датчики для ферментных биосенсоров. *Электрохимия*. 1994;30(8):982–7.
133. Dzyadevych SV, Soldatkin AP. *Solid-State Electrochemical Enzyme Biosensors*. Kyiv: IMBG; 2008. 221 p.
134. Saiapina OY, Pyeshkova VM, Soldatkin OO, Melnik VG, Kurç BA, Walcarius A. Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination. *Mater Sci Eng C*. 2011 Oct;31(7):1490–7.
135. 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.
136. Камышников В. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: «МЕДпресс-информ»; 2009. 896 с.
137. Rangnekar N, Mittal N, Elyassi B, Caro J, Tsapatsis M. Zeolite membranes – a review and comparison with MOFs. *Chem Soc Rev*. 2015;44(20):7128–54.
138. Bonnet C, Andreescu S, Marty J-L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal Chim Acta*. 2003;481(2):209–11.
139. Tosheva L, Valtchev VP. Nanozeolites: synthesis, crystallization mechanism, and applications. *Chem Mater*. 2005;17(10):2494–513.
140. Willis RR, Benin AI. Toward commercialization of nanozeolites. *Stud Surf*

- Sci Catal. 2007;170:242–9.
141. Schuvailo OM, Soldatkin OO, Lefebvre A, Cespuglio R, Soldatkin AP. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. *Anal Chim Acta*. 2006;573–574:110–6.
 142. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*. 2008;29(2–3):171–80.
 143. Patriarca M, Menditto A, Morisi G. Determination of ascorbic acid in blood plasma or serum and in seminal plasma using a simplified sample preparation and high-performance liquid chromatography coupled with uv detection. *J Liq Chromatogr*. 1991;14(2):297–312.
 144. Salemi G, Gueli MC, D'Amelio M, Saia V, Mangiapane P, Aridon P. Blood levels of homocysteine, cysteine, glutathione, folic acid, and vitamin B12 in the acute phase of atherothrombotic stroke. *Neurol Sci*. 2009;30(4):361–4.
 145. Noroozifar M, Khorasani-Motlagh M, Hassani NH, Saeed HM, Mehdi FM. Modified fluorine-doped tin oxide electrode with inorganic ruthenium red dye-multiwalled carbon nanotubes for simultaneous determination of a dopamine, uric acid, and tryptophan. *Sensors Actuators B Chem*. 2014;204:333–41.
 146. Lupu S, Mucci A, Pigani L, Seeber R, Zanardi C. Polythiophene derivative conducting polymer modified electrodes and microelectrodes for determination of ascorbic acid. effect of possible interferents. *Electroanalysis*. 2002;14(7–8):519–25.
 147. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry* 4th ed: Saunders, 2005;2448.
 148. Herrasti Z, Martínez F, Baldrich E. Electrochemical detection of dopamine using streptavidin-coated magnetic particles and carbon nanotube wiring. *Sensors Actuators B Chem*. 2014;203:891–8.
 149. Álvarez-Martos I, Ferapontova EE. Electrochemical label-free aptasensor for specific analysis of dopamine in serum in the presence of structurally related

- neurotransmitters. *Anal Chem.* 2016;88(7):3608–16.
150. Cosnier S, Holzinger M. Electrosynthesized polymers for biosensing. *Chem Soc Rev.* 2011;40(5):2146.
 151. Stejskal J. Polymers of phenylenediamines. *Prog Polym Sci.* 2015;41:1–31.
 152. Zhang Y, Hu Y, Wilson GS, Moatti-Sirat D, Poitout V, Reach G. Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor. *Anal Chem.* 1994;66(7):1183–8.
 153. Moussy F, Harrison DJ, O'Brien DW, Rajotte RV. Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating. *Anal Chem.* 1993;65(15):2072–7.
 154. Yang Q, Atanasov P, Wilkins E. Development of needle-type glucose sensor with high selectivity. *Sensors Actuators B Chem.* 1998;46(3):249–56.
 155. Kelly SC, O'Connell PJ, O'Sullivan CK, Guilbault GG. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of l-lysine in food. *Anal Chim Acta.* 2000;412(1–2):111–9.
 156. Dai YQ, Zhou DM, Shiu KK. Permeability and permselectivity of polyphenylenediamine films synthesized at a palladium disk electrode. *Electrochim Acta.* 2006;52(1):297–303.
 157. Shamsipur M, Karimi Z, Amouzadeh Tabrizi M. A highly sensitive hydrogen peroxide sensor based on (Ag–Au NPs)/poly[*o*-phenylenediamine] modified glassy carbon electrode. *Mater Sci Eng C.* 2015;56:426–31.
 158. Craig JD, O'Neill RD. Comparison of simple aromatic amines for electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication. *The Analyst.* 2003;128(7):905.
 159. Killoran SJ, O'Neill RD. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochim Acta.* 2008;53(24):7303–12.
 160. Soldatkin OO, Schuvailo OM, Marinesco S, Cespuglio R, Soldatkin AP. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on

- platinum microelectrode for selective ATP detection. *Talanta*. 2009;78(3):1023–8.
161. Hosny NM, Samir G, Zoromba MS, Alghool S. Doped poly(m-phenylenediamine) (PmPDA): A new precursor for Cr₂O₃ nanoparticles. *Polym Sci Ser B*. 2017;59(1):91–6.
 162. Angélica del Valle M, Díaz FR, Bodini ME, Alfonso G, Soto GM, Borrego ED. Electrosynthesis and characterization of o -phenylenediamine oligomers. *Polym*. 2005;54(3):526–32.
 163. Gutsche CD. *Calixarenes Revisited*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1998.
 164. Neri P, Sessler JL, Wang MX. *Calixarenes and Beyond*. Cham: Springer International Publishing; 2016.
 165. Sharma KC. Calixarene based chemical sensors. *Chemical sensors*. 2011;1(9).
 166. Hirooka Y, Egashira K, Imaizumi T, Tagawa T, Kai H, Sugimachi M. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24(4):948–55.
 167. Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K. Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation*. 1996;94(3):266–71.
 168. Brusilow SW., Horwich AL. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York. McGraw-Hill; 2001:1909–1963.
 169. Lam TL, Wong GKY, Chong HC, Cheng PNM, Choi SC, Chow TL. Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett*. 2009;277(1):91–100.
 170. Glazer ES, Stone EM, Zhu C, Massey KL, Hamir AN, Curley SA. bioengineered human arginase i with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma xenografts. *Transl Oncol*. 2011;4(3):138–46.

171. Lam TL, Wong GKY, Chow HY, Chong HC, Chow TL, Kwok SY. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(2):366–76.
172. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer.* 1992;70(4):733–6.
173. Morales CM. Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach. *An Sist Sanit Navar.* 2011; 34(3):453–61.
174. Kalchenko OI, Lipkowski J, Nowakowski R, Kalchenko VI, Vysotsky MA, Markovsky LN. host-guest complexation of phosphorus contained calixarenes with aromatic molecules in RP HPLC conditions. The stability constants determination. *Molecular Recognition and Inclusion.* 1998;23:377–80.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

1. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Kasap BO, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. Novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(260):1-8.
2. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Pyeshkova VM, Alekseev SA, Soldatkin OO, Dzyadevych SV. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):594.
3. Кучеренко ІС, **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ. Адаптація процедури нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові перетворювачі. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017;14(1):48-57.
4. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Dudchenko OY, Akata Kurç B, Dzyadevych SV. Development of electrochemical biosensors with various types of zeolites *Applied Nanoscience Int.*2018.doi: 10.1007/s13204-018-0725-9.
5. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Cherenok SO, Kalchenko OI, Prynova OS, Sylenko OM, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Conductometric sensor with calixarene-based chemosensitive element for arginine detection. *Chemical Papers* 2018; 72(11):2687–97.
6. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Velychko TP, Prilipko VO, Kuibia MA, Dzyadevych SV. Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*. 2018;124:40-46.

Патент на корисну модель:

7. **Солдаткіна ОВ**, Марченко СВ, Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Черенок СО, Пріньова ОС, винахідники; Інститут молекулярної біології

та генетики НАН України, патентовласник. Кондуктометричний сенсор на основі каліксарену для кількісного аналізу аргініну в водних розчинах. Патент України № 129983. 2018 Лис 26.

Тези:

8. **Soldatkina OV**, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B, Dzyadevych SV. Zeolite as a perspective material for amperometric biosensor creation. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 3-4.

9. Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Akata B, Dzyadevych SV. Biosensor based on urease, adsorbed on silicalite. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 4-5.

10. **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Кучеренко ІС, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі уреазі адсорбованої на силікаліті для визначення сечовини. 5-а Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2016 трав. 12-13; Київ. Київ: Компринт; 2016, с. 123-124.

11. Soldatkin OO, Kasap BO, **Soldatkina OV**, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. A novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2016), 2016 Aug 24-27; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016, p. 503.

12. Soldatkin OO, Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Dzyadevych SV. Analysis of using various modifications of zeolites in electrochemical biosensors. International

research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2017), 2017 Aug 23-26; Chernivtsi. Kyiv: SME Burlaka, 2017, p. 659.

13. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Kalchenko VI, Kalchenko OI, Cherenok SO, Prynova OS, Dzyadevych SV. Calixarene-based sensor for the arginine determination. 8-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8), 2018 трав. 28-черв. 01; Одеса. Одеса: Астропринт, 2018, с. 119.

14. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Prilipko VO, Kuibida MA, Cherenok SO, Prynova OS, Sylenko O.M, Kalchenko OI, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Comparison of the possibility of using a calixarene based sensor and a two enzymes based biosensor for the arginine analysis. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 2018 Aug 27-30; Kyiv: SME Burlaka, 2018, p. 66.