

## АМПЕРОМЕТРИЧНІ ФЕРМЕНТНІ БІОСЕНСОРИ



С. В. ДЗЯДЕВИЧ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ  
E-mail: dzyad@yahoo.com

Розроблення біосенсорів на сьогодні є одним із найперспективніших напрямів досліджень у галузі аналітичної біотехнології. В огляді висвітлено основні електрохімічні принципи, на яких ґрунтується застосування амперометричного методу визначення у біоаналітичній практиці. Амперометричні біосенсиори класифіковано на три групи (безмедіаторні, медіаторні та на основі прямого перенесення електронів), які докладно описано з наведенням прикладів і зазначенням їхніх переваг та недоліків. Розглянуто сучасні комерційні системи на базі амперометричних біосенсорів та галузі їх застосування.

**Ключові слова:** амперометричний біосенсор, фермент, медіатор, електрод, комерційна система.

Дедалі зростаюча необхідність поліпшення охорони довкілля, контролю за біотехнологічними процесами, перевірки якості харчових продуктів і питної води, збільшення кількості клінічних тестів у медичній та ветеринарній діагностиці потребує ширшого використання у практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу, серед яких на велику увагу заслуговують прилади нового покоління – біосенсиори [1–3].

Розроблення біосенсорів на сьогодні є одним із найперспективніших напрямів досліджень у галузі аналітичної біотехнології. Електрохімічний біосенсор перетворює зміну фізико-хімічних характеристик біоматриці на електричний чи оптичний сигнал з амплітудою, яка залежить від концентрації певної речовини в розчині. Функціонально прилад складається з двох частин: біоматриці — детектувального шару іммобілізованого біоматеріалу та електрохімічного перетворювача (рис. 1) [2, 3]. У цьому огляді описано амперометричні ферментні біосенсиори — найбільш успішний з погляду комерціалізації клас приладів біомолекулярної електроніки.

Перші дослідження біосенсорів, зокрема амперометричних, були ініційовані L. Clark, який опублікував у 1956 р. роботу, присвячену використанню кисневого електрода [4]. Базуючись на цих експериментах, він разом з S. Lyons зробив доповідь на симпозиумі

Нью-Йоркської академії наук, в якій запропонував, як «зробити електрохімічний сенсор розумнішим», додавши до нього «ферментний перетворювач у вигляді мембранного сендвіча». Цю концепцію було ілюстровано експериментами, в яких глюкозооксидазу розміщували на чутливій поверхні кисневого «електрода Кларка», покритій напівпроникною діалізною мембраною, та відокремлювали її від вимірюваного розчину додатковою діалізною мембраною [5]. У цій роботі Clark і Lyons уперше ввели поняття «ферментний електрод», що його багато авторів помилково приписують S. Updiks і G. Hicks [6], які згодом розвинули цю ідею і застосували для створення біосенсора гель із доданим до нього ферментом. Вони також першими детально описали ферментний глюкозний електрод, який виявився простішим за кларківський та мав кращу операційну стабільність. Саме ці перші роботи й заклали основи успішного розвитку і подальшої комерціалізації амперометричних біосенсорів.

Амперометричні біосенсиори можна розділити на три основних класи:

1. Датчики, в основу роботи яких покладено вимірювання концентрацій природних субстратів і продуктів ферментативної реакції (*безмедіаторні амперометричні біосенсиори*).

2. Сенсиори, в яких переносниками електронів з активного центру ферменту на електрод є медіатори (*медіаторні амперометричні біосенсиори*).

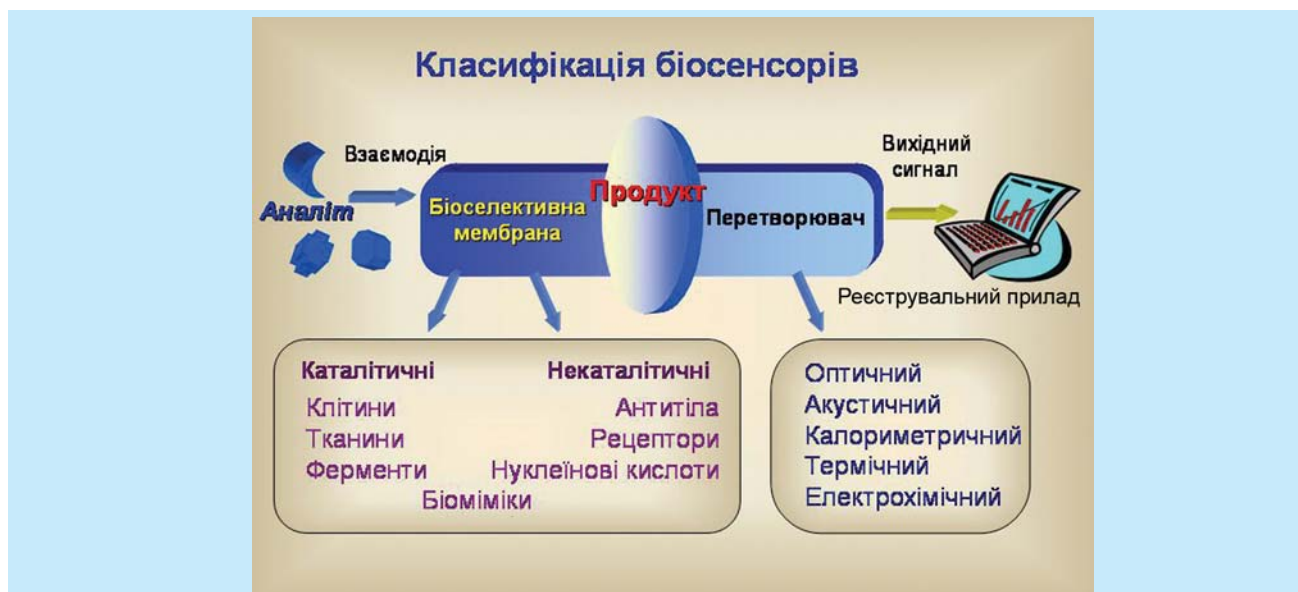


Рис. 1. Класифікація біосенсорів

3. Амперометричні біосенсори, робота яких ґрунтується на прямому перенесенні електронів між активним центром ферменту і електродом.

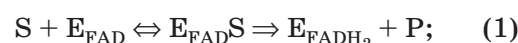
### Безмедіаторні амперометричні біосенсори

Перший клас амперометричних біосенсорів — це датчики, в основу роботи яких покладено вимірювання природних субстратів чи продуктів ферментативної реакції. Під час будь-якої реакції утворюються продукти та поглинаються субстрати. Якщо вони є електроактивними частинками, то відповідно концентрація їх може безпосередньо вимірюватись за допомогою амперометричного перетворювача. Перший клас ферментів, який, в основному, каталізує реакції такого типу, — це оксидази (табл. 1).

Таблиця 1. Оксидази, використовувані при створенні амперометричних біосенсорів

| Фермент                    | Субстрат     | Джерело  |
|----------------------------|--------------|----------|
| Глюкозооксидаза            | Глюкоза      | [7–9]    |
| Лактатоксидаза             | Лактат       | [10, 11] |
| Холіноксидаза              | Холін        | [12, 13] |
| Алкогольоксидаза           | Етанол       | [14, 15] |
|                            | Метанол      | [16, 17] |
|                            | Формальдегід | [18]     |
| Глутаматоксидаза           | Глутамат     | [19]     |
| Триптофан-2-монооксигеназа | Триптофан    | [20]     |
| Лізиноксидаза              | Лізин        | [21, 22] |
| Ћсантиноксидаза            | Гіпоксантин  | [23]     |

Ферментативні реакції за участю оксидаз можна зобразити такою схемою:



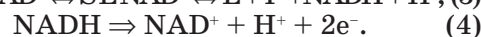
Робота більшості сенсорів такого типу ґрунтується на процесі поглинання кисню під час біокаталітичної реакції, що вимірюється за допомогою відновлення  $O_2$  на електроді при потенціалі  $-0,7$  В відносно  $Ag/AgCl$  електрода, або біокаталітичної генерації пероксиду водню, який вимірюється за допомогою окислення  $H_2O_2$  на електроді при потенціалі  $+0,65$  В також відносно  $Ag/AgCl$  електрода (рис. 2).

Другий клас ферментів, що їх широко використовують у безмедіаторних амперометричних сенсорах, — це дегідрогенази (табл. 2).

Таблиця 2. Дегідрогенази, що їх використовують при створенні амперометричних біосенсорів

| Фермент               | Субстрат  | Джерело  |
|-----------------------|-----------|----------|
| Альдегіддегідрогеназа | Альдегіди | [24, 25] |
| Алкогольдегідрогеназа | Етанол    | [26–28]  |
| Лактатдегідрогеназа   | Лактат    | [29–31]  |
| Глутаматдегідрогеназа | Глутамат  | [29, 32] |
| Глюкозодегідрогеназа  | Глюкоза   | [7]      |
| Гліцеролдегідрогеназа | Гліцерол  | [32]     |

Схематично ферментативні реакції за участю дегідрогеназ можна зобразити так:



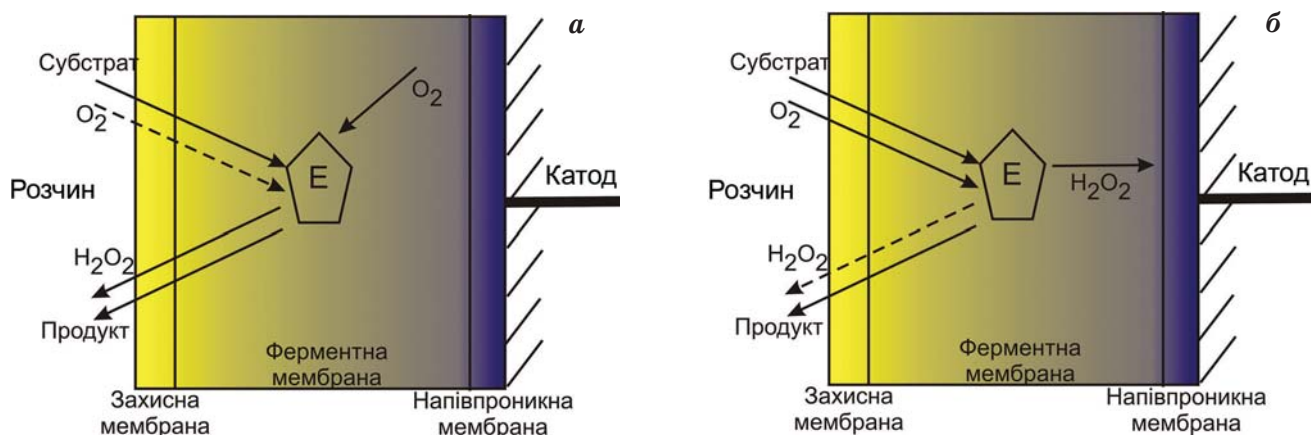


Рис. 2. Загальний механізм роботи амперометричного біосенсора, що ґрунтується на визначенні кисню (а) та пероксиду водню (б)

До цієї групи амперометричних біосенсорів належать також датчики, на поверхні яких коїммобілізовано одночасно кілька ферментів. У такій системі продукт однієї ферментативної реакції є субстратом для іншої. Однак кінцевим продуктом має бути електроактивна речовина (рис. 3). У табл. 3 наведено зразки таких систем.

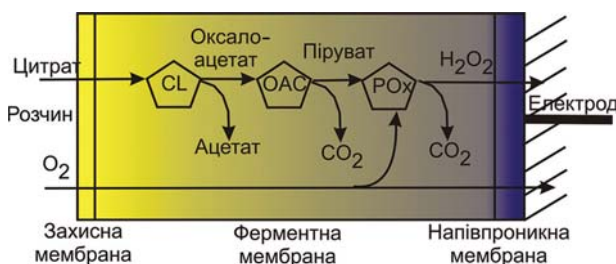


Рис. 3. Принцип роботи мультиферментного амперометричного біосенсора для визначення цитрату: CL — цитратліаза; OAC — оксалоацетатдекарбоксилаза; POx — піруватоксидаза

Основні недоліки безмедіаторних амперометричних біосенсорів:

- постійна потреба в підготовці електродів для одержання поверхні, яка добре відновлюється;
- вплив на відгук сенсора геометричних параметрів електродів;
- вплив на відгук біосенсора масоперенесення молекул через біокаталітичні й напівпроникні мембрани;
- потреба у постійному підкалібруванні сенсорів через фарадеївські процеси на електродах, особливо за тривалого використання;
- необхідність постійно враховувати вплив фонового розчину, пов'язаного з інтерференцією з неспецифічними електро-

активними частинками, які завжди присутні в розчині.

Для усунення першого недоліку застосовують полірування поверхні, термічну та хімічну обробку, циклічну вольтамперометрію. Усе це сприяє поліпшенню відтворюваності відгуку. Однак після довгочасної експозиції в досліджуваному розчині електрод так само не дає відтворених результатів. Можливі шляхи вирішення цієї проблеми — хімічна модифікація поверхні [24, 43], використання високопровідних органічних матеріалів [44, 45] чи редокс-полімерів [46]. Наприклад, провідні органічні солі, одержані із N-метилфеназину (NMP) і тетраціанохінодіметану (TCNQ), успішно застосовували в сенсорах на основі дегідрогеназ [45, 47], а провідні органічні солі на основі TCNQ і тетратіафульвалену (TTF) використовували як електродний матеріал у біосенсорах на основі оксидаз [48].

Важливим моментом також є підбір геометричних параметрів електродів, особливо у разі мініатюризації сенсорів [49].

Масоперенесення частинок під час реакції охоплює такі процеси: дифузію субстрату до поверхні мембрани, дифузію субстрату через мембрану до активного центру ферменту, генерацію пероксиду водню і поглинання кисню та дифузію їх до поверхні електрода.

На практиці часто вдаються до інтенсивного перемішування, що зменшує товщину дифузійного шару і, відповідно, його вплив на величину відгуку. Однак вплив мембран залишається і його слід завжди враховувати в аналізі відгуків. Штучно змінюючи коефіцієнти дифузії для субстратів, можна регулювати діапазон роботи сенсора, час відгуку і його чутливість [50].

Основними проблемами використання безмедіаторних амперометричних сенсорів

Таблиця 3. Мультиферментні системи, застосовувані в амперометричних біосенсорах

| Субстрат    | Ферментна система  | Джерело  |
|-------------|--|----------|
| Цитрат      | Цитратліаза — оксалоацетатдекарбоксилаза — піруватоксидаза | [33, 34] |
| Сахароза    | Інвертаза — глюкозооксидаза                                | [35]     |
| Мальтоза    | Амілоглюкозидаза — глюкозооксидаза                         | [36, 37] |
| Лактоза     | $\beta$ -Галактозидаза — глюкозооксидаза                   | [38, 39] |
| Ацетилхолін | Ацетилхолінестераза — холіноксидаза                        | [40]     |
| Фосфат      | Лужна фосфатаза — глюкозооксидаза                          | [41]     |
| Лецитин     | Фосфоліпаза — холіноксидаза                                | [42]     |

є потреба в постійному підкалібруванні і корегуванні сигналу, а також необхідність урахування електроактивних інтерферуючих частинок, таких як аскорбінова кислота, сечова кислота, глутатіон тощо. Для вирішення цих проблем найпростіше застосовувати диференційний режим вимірювань [51], коли враховується різниця сигналів між ферментним електродом та ідентичним йому електродом, що не має ферменту. Також можна використовувати різні заряджені діалізні мембрани [32, 52]. Найчастіше із цією метою використовують ацетатцелюлозу і полікарбонатні чи полівінілхлоридні плівки. Застосування саме цих діалізних мембран дозволило поліпшити стабільність сенсорів і працювати в реальних біологічних рідинах в умовах як *in vitro*, так й *in vivo*.

### Медіаторні амперометричні біосенсори

До другого класу амперометричних біосенсорів належать датчики, в яких переносниками електронів є альтернативні окиснювальні агенти — медіатори. Це дає змогу працювати з більш низькими потенціалами, зменшуючи тим самим вплив кисню на відгук (випадок оксидаз) і певною мірою вирішуючи питання впливу різних інтерферуючих частинок. У табл. 4 наведено деякі важливі редокс-потенціали, що їх застосовують в амперометричних вимірюваннях.

У загальному випадку медіатор — це низькомолекулярна частинка, що переносить

електрон між редокс-центром ферменту та робочим електродом. У цьому разі реакції (2) та (4) набирають вигляду:



Принцип роботи медіаторного амперометричного сенсора показано на рис. 4.

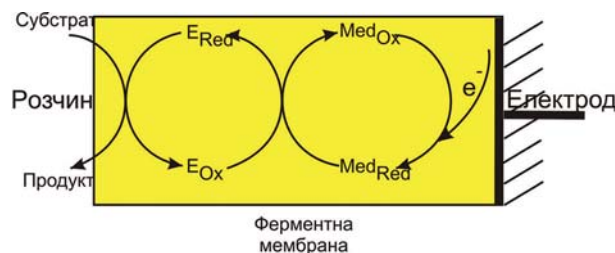


Рис. 4. Принцип роботи амперометричного медіаторного біосенсора:  $E_{Red}$ ,  $E_{Ox}$  — відновлена та окиснена форми ферменту;  $Med_{Red}$ ,  $Med_{Ox}$  — відновлена та окиснена форми медіатору

Усі медіатори можна розділити на дві групи: природні та штучні електронні переносники (табл. 5). Найвідомішими й найпоширенішими є штучні медіатори — феріціанід та фeroцен.

Медіатори можна додавати у вимірювальний розчин чи іммобілізувати на поверхню електрода. Перший варіант простіший, але не технологічний. До того ж, наприклад, органічні барвники, такі як метиленовий синій, фталоціанін чи метиленовий фіолетовий,

Таблиця 4. Редокс-потенціали для деяких реакцій, pH 7 [53]

| Реакція                           | $E^0$ , В | Реакція                             | $E^0$ , В |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
| Ацетат — ацетальдегід             | -0,6      | Оксалоацетат — L-малат              | -0,17     |
| Ацетон — пропан-2-ол              | -0,43     | Фумарат — сукцинат                  | +0,03     |
| $H^+ - H_2$                       | -0,42     | Дегідроаскорбат — аскорбат          | +0,06     |
| Ксантин — гіпоксантин             | -0,37     | Убіхінон — відновлений убіхінон     | +0,10     |
| $NAD^+ - NADH$                    | -0,32     | Фероцен                             | +0,17     |
| Окиснений — відновлений глутатіон | -0,23     | $O_2 - H_2O_2$                      | +0,31     |
| Цистин — цистеїн                  | -0,22     | $[Fe(CN)_6]^{3-} - [Fe(CN)_6]^{4-}$ | +0,45     |
| Ацетальдегід — етанол             | -0,20     | $Fe_3^+ - Fe^{2+}$                  | +0,53     |
| Піруват — L-малат                 | -0,19     | $O_2 - H_2$                         | +0,82     |

Таблиця 5. Деякі природні і штучні медіатори та їхні редокс-потенціали, рН 7 [53]

| Природні медіатори       | E°, В         | Штучні медіатори                   | E°, В |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|-------|
| Цитохром a <sub>3</sub>  | +0,29         | Фериціанід [гексаціаноферат (III)] | +0,45 |
| Цитохром c <sub>3</sub>  | +0,24         | 2,6-Дихлорфенол                    | +0,24 |
| Убіхінон                 | +0,10         | Індофенол                          | +0,24 |
| Цитохром b               | +0,08         | Фероцен                            | +0,17 |
| Вітамін K <sub>2</sub>   | -0,03         | Феназин метасульфат                | +0,07 |
| Рубредоксин              | -0,05         | Метиленовий синій                  | +0,04 |
| Флавопротеїни            | [-0,4]–[+0,2] | Фталоціанін                        | -0,02 |
| FAD–FADH <sub>2</sub>    | -0,23         | Феносафранін                       | -0,23 |
| FMN–FMNH <sub>2</sub>    | -0,23         | Бензил фіолетовий                  | -0,36 |
| NAD <sup>+</sup> –NADH   | -0,32         | Метил фіолетовий                   | -0,46 |
| NADP <sup>+</sup> –NADPH | -0,32         |                                    |       |
| Феродоксин               | -0,43         |                                    |       |

є токсичними, нестабільними у відновленні, рН-залежними і часто просто самоокиснюються. Оптимальний і водночас більш технологічний варіант — це іммобілізовані медіатори.

У табл. 6 наведено приклади медіаторних амперометричних біосенсорів.

Одним із недоліків біосенсорів на основі іммобілізованих медіаторів є низька стабільність таких датчиків. Для вирішення цієї проблеми застосовували різні методи. У найпростішому випадку порошок медіатора змішували з вуглецевою пастою (суміш рідкого парафіну з порошком графіту) і таким чином виготовляли вуглецевий електрод, на який далі адсорбували фермент [66]. У такому варіанті використовували також діалізну мембрану, яка захищала компоненти суміші від вимивання в розчин. В інших випадках медіатори просто адсорбували на поверхню електрода. Наприклад, у роботі [54] краплю розчину диметилфероцену в толуолі наносили на поверхню електрода і вже після випарювання толуолу іммобілізували глюкозооксидазу. Проте в такому варіанті на характеристики сенсора починає впливати розчинність медіатору. Коли сенсор занурюють у водний розчин, нерозчинний медіатор залишається на поверхні. Але в разі прикладання потенціалу утворюються іони ферицину, які надто розчинні у водних розчинах і одразу ж вимиваються, зменшуючи

тим самим кількість медіатору на поверхні електрода і, відповідно, відгук сенсора.

Для усунення цього недоліку було розроблено провідні полімери, модифіковані медіаторами [67]. У цій роботі поліпірольну плівку з розчину ацетонітрилу наносили на поверхню золотого електрода, а потім до неї ковалентно пришивали фероценкарбонілхлорид і глюкозооксидазу. Одержаний таким чином електрод був стабільним у присутності розчину глюкози протягом 5 днів.

Ще одним засобом вирішення проблеми вимивання медіатору із мембрани є введення одночасно медіатору і ферменту в колоїдну графітову емульсію, поверх якої фіксується катіонна мембрана [68]. Таким чином позитивно заряджені іони ферициніуму затримуються на поверхні електрода. Електрод простий у виготовленні, має швидкий час відгуку і досить широкий діапазон визначення глюкози. При зберіганні протягом 6 місяців у сухому вигляді залишкова активність ферменту становила 70%.

Вибираючи медіатор завжди слід враховувати такі фактори:

- потенціал, що прикладається, має бути менший за потенціал відновлення кисню;
- відновлений медіатор не повинен реагувати з киснем;
- електронне перенесення між відновленим медіатором і ферментом має відбуватися дуже швидко;

Таблиця 6. Приклади медіаторних амперометричних біосенсорів

| Субстрат | Фермент                 | Медіатор           | Джерело  |
|----------|-------------------------|--------------------|----------|
| Глюкоза  | Глюкозооксидаза         | Фероцен            | [54–56]  |
| Фруктоза | D-фруктозодегідрогеназа | Фериціанід         | [57, 58] |
| Лактат   | Лактатоксидаза          | Фероцен            | [59, 60] |
| Глутамат | L-глутаматоксидаза      | Фероцен            | [61, 62] |
| Лізин    | Лізиндегідрогеназа      | Фериціанід         | [63]     |
| Етанол   | Алкогольдегідрогеназа   | Фериціанід         | [64]     |
| Морфін   | Морфіндегідрогеназа     | Феназинметасульфат | [65]     |

- бажано, щоб медіатор не залежав від рН;
- медіатор не повинен бути реакційним стосовно біологічного матеріалу.

Якщо задовольнити всім цим умовам, то можна сподіватись на одержання амперометричного біосенсора з аналітичними характеристиками, який працюватиме в реальних умовах протягом тривалого часу.

### Амперометричні сенсори на основі прямого перенесення електронів

Робота амперометричних біосенсорів третього класу ґрунтується на прямому перенесенні електронів між ферментом та електродом. Цей феномен також часто називають біоелектрокаталізом. Основні властивості цих біосенсорів, які, власне, і вирізняють їх з-поміж інших амперометричних сенсорів, пов'язані з каталітичною природою процесу в цілому і з тим, що перенесення електрона з електрода на молекулу субстрату і навпаки відбувається безпосередньо через активний центр ферменту за відсутності будь-яких переносників електронів.

Відповідно до теорії електронного перенесення [69, 70], константа швидкості прямої електрохімічної взаємодії між донором і акцептором визначається різницею потенціалів між редокс-центром ферменту і електродом, енергією перетворення під час перенесення електронів та, найістотніше, дистанцією між активним сайтом ферменту і поверхнею електрода. Пептидне оточення просторово відокремлює редокс-сайт ферменту від поверхні електрода і практично ізолює активний центр від електричного контакту з поверхнею електрода. Тому необхідним є електричний контакт між редокс-білком і електродом, для чого й застосовують медіатори як переносники електронів [54–65], а також різні модифіковані поверхні електродів [24, 43–48]. Ці засоби розглядалися вище в описі медіаторних і безмедіаторних амперометричних біосенсорів. Однак деякі автори помилково включають дані сенсори у клас амперометричних біосенсорів на основі прямого перенесення електронів. У разі ж біоелектрокаталізу електрон сам є косубстратом реакції, і ферментативна та електродна реакції не можуть відбуватися незалежно одна від одної (рис. 5).

Пряме електронне перенесення між цитохромом *c* та електродом уперше було показано за допомогою циклічної вольтамперометрії на електроді з оксиду індію, допонованого оловом [71], та на золотому електроді, модифі-

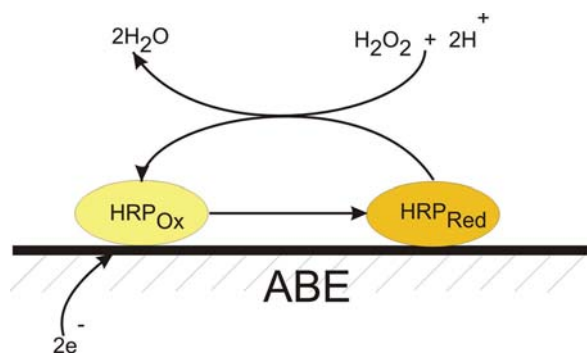
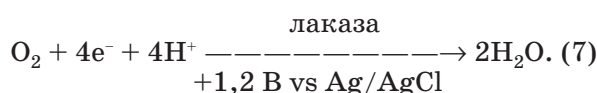


Рис. 5. Схема прямого відновлення пероксидази на активному вуглецевому електроді: HRP — пероксидаза хрому; ABE — активований вуглецевий електрод

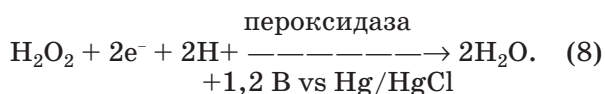
кованому 4-4'-біпіридином [72]. Водночас виявлено, що цитохром *c*<sub>3</sub> із *Desulfovibrio vulgaris* може обмінюватись електронами із ртутним електродом [73]. Відтоді опублікована низка робіт на тему прямого перенесення електронів між цитохромом *c* й редокс-білками та іншими, як модифікованими, так і не модифікованими електродами. Ці роботи детально аналізуються в оглядах F. A. Armstrong [74, 75]. Утім, з погляду створення біосенсорів більший інтерес становить пряме електронне перенесення між редокс-ферментами і електродом.

M. R. Tarasevich зі співавторами вперше проаналізували безмедіаторний біоелектрокаталіз грибової лакази (блакитна мідьвмісна оксидаза) [76]. Вони здійснили відновлення кисню на сажистому вуглецевому електроді з іммобілізованою лаказою при потенціалі +1,2 В відносно хлоросрібного електрода при рН 5,0:



Пізніше цей феномен було досліджено більш детально з обговоренням можливого механізму біоелектрокаталітичної реакції, який виявився досить складним [77, 78]. Lee Chi Woo зі співавторами одержали каталітичний струм відновлення кисню у воді на лаказному графітовому електроді [79]. Біоелектрокаталітичний процес був подібний, але не повністю ідентичний тому, який показано в роботі Tarasevich зі співавторами [76]. Потенціал каталітичного відновлення кисню дорівнював +0,74 В відносно каломельного електрода при рН 4,7, тобто відрізнявся від значення +1,2 В, одержаного раніше [76–78]. Ця різниця могла бути зумовлена відмінністю електродних матеріалів.

Електрохімічне відновлення пероксидази хрому вперше було вивчено О. Ш. Ярополовим зі співавторами на сажистому вуглецевому електроді при потенціалі менше +1,2 В відносно каломельного електрода [80]:



Відтоді біоелектрокаталіз пероксидази і його застосування при створенні біосенсорів для визначення пероксиду водню було досліджено великою кількістю авторів з використанням різних електродних матеріалів (золото, платина, піролітичний графіт, вуглецева паста, сажистий чи активований вуглець) [81–84]. У роботі [85] особливу увагу приділено важливості пероксидазно-каталітичного відновлення пероксиду водню, що утворюється в реакціях з оксидазами, для розроблення амперометричних сенсорів. На рис. 5 подано схему прямого відновлення пероксидази на активованому вуглецевому електроді [86].

Такі електроди мали відмінні електрокаталітичні характеристики та високу щільність струму за присутності пероксиду при низькому потенціалі без якихось додаткових електрохімічних чи фізичних передобробок поверхні. Пряме електронне перенесення між електродом і пероксидазою, що має місце в електроферментативному відновленні пероксиду водню, відбувається при потенціалі +480 мВ відносно хлоросрібного електрода порівняння.

У роботах [87–89] також показана можливість прямого перенесення електронів для цитохром с-пероксидази.

Для забезпечення електричного контакту між редокс-центром ферменту і поверхнею електрода запропоновано хімічну модифікацію редокс-білків за допомогою редоксзв'язаних компонентів [90, 91]. Автори змінили структуру глюкозооксидази, ковалентно зв'язавши 12 фероценкарбоксильних груп із аміногрупами ферменту, внаслідок чого дистанція електронного перенесення зменшилась, оскільки ці групи діють як електронні ретранслятори між FAD/FADH<sub>2</sub>, редокс-центрами ферменту і електродом.

Ще одним додатковим способом електричного зв'язування редокс-центру ферменту з електродом є його іммобілізація в редокс-полімерну матрицю [92, 93]. Таким чином іммобілізували глюкозооксидазу в фероценмодифікований полімер чи в осмії (II)-поліпіридинзаміщений полімер, що зумовлювало

біоелектрокаталіз глюкози [93]. Подібним же чином іммобілізували нітратредуктазу в N,N'-біпіридинмодифікований політіофен [94].

Електрохімічна активація редокс-ферментів і подальше пряме перенесення електронів між ферментом і електродом набувають особливої ваги при розробленні амперометричних біосенсорів. Ці сенсори мають такі переваги:

- висока чутливість завдяки значній щільності струму, що дозволяє мініатюризацію електродів;
- істотне зменшення неспецифічних інтерферуючих відгуків завдяки ефективній електричній активації редокс-ферменту, що уможливило створення високоселективних чутливих біосенсорів.

### Комерційні варіанти систем на основі амперометричних біосенсорів

Основними галузями практичного застосування біосенсорів є медична діагностика, харчова промисловість, біотехнологічне виробництво, екологічний моніторинг [95]. Медична діагностика не випадково на першому місці в цьому списку, адже понад 80% усіх комерційних приладів застосовується саме в цій галузі. У табл. 7 наведено варіанти аналізаторів для клінік і лабораторій на основі біосенсорів. Як приклад можна назвати YSI Incorporated, яка виробляє аналізатор YSI 2300 StatPlus, що визначає глюкозу в цільній крові, сироватці та плазмі, а також лактат у цереброспінальній рідині (рис. 6).



Рис. 6. Зовнішній вигляд аналізатора YSI 2300 StatPlus (YSI Incorporated) [111]

Таблиця 7. Аналізатори для клінічних досліджень на основі біосенсорів [95]

| Компанія                            | Країна          | Модель                         | Речовина                              | Джерело |
|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Yellow Springs Instr., Ohio, OH     | США             | YSI 2300 Stat Plus<br>YSI 2700 | Глюкоза, лактат<br>Етанол, холін      | [96]    |
| NOVA Biomedical, Waltham, MA        | США             | NOVA Stat Profile              | Глюкоза, лактат,<br>сечовина          | [97]    |
| PGW Medingen GmbH, Dresden          | Німеччина       | ESAT 6660<br>ECA 2000          | Глюкоза, лактат<br>Глюкоза, лактат    | [98]    |
| Eppendorf AG, Hamburg               | Німеччина       | EBIO Plus<br>EBIO Compact      | Глюкоза, лактат<br>Глюкоза, лактат    | [99]    |
| EKF Diagnostic GmbH, Magdeburg      | Німеччина       | BIOSEN 5030<br>BIOSEN 5040     | Глюкоза, лактат<br>Глюкоза, лактат    | [100]   |
| Analox Instruments Ltd, London      | Велика Британія | GM7 MicroStat<br><br>GM9       | Глюкоза, лактат,<br>етанол<br>Глюкоза | [101]   |
| Dr. Muller Geratebau GmbH, Freital  | Німеччина       | Super G                        | Глюкоза                               | [102]   |
| Biometra, Gottingene                | Німеччина       | OLGA                           | Глюкоза, лактат                       | [102]   |
| Gonotec, Berlin                     | Німеччина       | SENSOMAT                       | Етанол                                | [103]   |
| Fresenius AG, Hamburg               | Німеччина       | Ionometer                      | Глюкоза                               | [103]   |
| Fuji Electric Corp., Osaka          | Японія          | GLUCO 20<br>UA-300 A           | Глюкоза,<br>Сечова кислота            | [103]   |
| Kyoto Daiichi Kodaku Co. Ltd, Kyoto | Японія          | GT 1630<br>LT 1710             | Глюкоза<br>Лактат                     | [104]   |
| Завод точної механіки, Паневежис    | Литва           | ЕКСАН                          | Глюкоза, лактат,<br>сечовина          | [105]   |
| Seres, Aix-en-Provence              | Франція         | ENZYMAT                        | Глюкоза, лізин,<br>холін              | [102]   |
| Solea-Tacussel, Villeurbanne        | Франція         | Glucoprocasseur                | Глюкоза, лактат                       | [103]   |
| SGI, Toulouse                       | Франція         | MICROZYM-L                     | Лактат, глюкоза                       | [103]   |
| Roche, Basel                        | Швейцарія       | LA 640                         | Лактат                                | [104]   |

Усі наведені в таблиці аналізатори мають схожі характеристики, оскільки більшість із них базується на подібних техніці та принципах. Найбільшу кількість аналізаторів створено для визначення глюкози. Перевагою таких аналізаторів є можливість роботи з нерозведеними зразками, оскільки в разі введення зразка в комірку виконується його автоматичне розведення, що дозволяє визначити досить високі концентрації глюкози у пробі. На сьогодні це найпростіші у використанні та дешеві лабораторні аналітичні методи аналізу.

У табл. 8 подано різні варіанти портативних аналізаторів на основі біосенсорів, а на рис. 7 — варіант портативного аналізатора Glucometer Elite для визначення глюкози, виробництва фірми Bayer Corporation (Німеччина). Останні досягнення в галузі розроблення і створення портативних аналізаторів для широкого використання спрямовані на створення приладів «безболісного аналізу», в яких зразок крові береться не

з пальця, а з менш болісної частини тіла (наприклад, передпліччя чи стегна). Перші успішні варіанти було розроблено фірмою Amira Medical (Scotts Valley, CA, США) [113]. Так, AtLast робить маленький розріз на шкірі, використовуючи мікроскальпель, з'єднаний зі спеціальним механізмом для взяття проби. Для проведення аналізу необхідно всього 2 мкл крові, яка по капіляру надходить до датчика. Система може адаптуватись до різних типів шкіри. Фірма Roche Diagnostics викупила Amira Medical і розпочала виробництво свого продукту під торговою маркою Accu-Check, який поєднує в собі «know-how» Amira Medical та аналізатори фірми Roche [114]. Подібні прилади випускають фірма Abbott Laboratories із власним біосенсорним продуктом під торговою назвою Sof-Tac [106] та компанія Johnson & Johnson із сенсорним продуктом OneTouch Ultra серії LifeScan [110].



Таблиця 8. Портативні аналізатори для діагностики в домашніх умовах [95]

| Компанія                                     | Країна    | Модель                                    | Речовина           | Джерело |
|--|-----------|---|--------------------|---------|
| Abbott Laboratories, Illinois, IL            | США       | MediSense Exactech<br>MediSense Precision | Глюкоза<br>Глюкоза | [106]   |
| Bayer Corporation, Leverkusen                | Німеччина | Glucometer Elite                          | Глюкоза            | [107]   |
| i-STAT Corporation, Princeton, NJ            | США       | i-STAT G3+                                | Глюкоза,<br>кисень | [108]   |
| Roche Diagnostics, Basel                     | Швейцарія | Advantage Meter                           | Глюкоза            | [109]   |
| Johnson & Johnson, Brunswick, NJ             | США       | LifeScan OneTouch                         | Глюкоза            | [110]   |
| Home Diagnostics Inc., Fort Lauderdale FL    | США       | Prestige IQ                               | Глюкоза            | [111]   |
| MedTest Systems, College Park, MD            | США       | Medisensor 2001                           | Глюкоза            | [111]   |
| Inverness Medical Technology Inc., Inverness | Шотландія | Excel G                                   | Глюкоза            | [112]   |



Рис. 7. Зовнішній вигляд портативного аналізатора Glucometer Elite XL (Bayer Corporation) [107]

Під час створення аналізаторів для вимірювань *in vivo* у клінічних умовах потрібно було враховувати можливість автоматичного вимірювання кожні кілька хвилин та сумісність такого з людським організмом. Над розробленням подібних систем працювало декілька дослідницьких груп та фірм [115–117]. Першими спробу комерціалізувати таку систему зробили на фірмі Miles Laboratories (Elkhart, IN, США) [118]. Фірма MiniMed (Norrthridge, CA, США), яку згодом викупила фірма Medtronic (Minneapolis, США), була першою серед тих, кому вдалося комерціалізувати реальну систему для постійного моніторингу глюкози *in vivo* в клінічних умовах [119]. Наступною компанією, яка намагалася впровадити подібну техніку, була Cygnus Inc. (Redwood City, CA, США).

Система для постійного моніторингу глюкози (Continuous Glucose Monitoring System — CGMS) фірми MiniMed дозволяє вимірювати вміст глюкози кожні 5 хв упродовж 72 год імплантації. Сенсором у ній слугує мініатюрний електрод, що міститься всередині маленької голки, за допомогою якої його вводять під шкіру. Після видалення голки сенсор прикріплюється до маленького

пластикового диска розміром з невеличку монетку, яка утримує його в жорсткому положенні. Система моніторингу з'єднується з інсуліновою помпою, внаслідок чого створюється повністю замкнена система, яка має назву Paradigm Real Time (722) (рис. 8). Це новинка 2006 року, яка вперше експонувалась на виставці в Афінах у вересні 2005 р. (у рамках 41-ї щорічної конференції EASD 2005). Перспективи застосування такої техніки дуже великі, однак існує низка перепон, які стримують її швидкий успішний розвиток. Передусім, не всі пацієнти згодні на введення в їхній організм подібних систем. Окрім того, не всі лікарі ще повністю довіряють таким новітнім системам, віддаючи перевагу традиційним підходам.

Харчова промисловість та біотехнологічне виробництво — це галузі, в яких за останні декілька років розпочалося впровадження біосенсорів, хоча й не так інтенсивно, як у медичній діагностиці. Простішим є випадок, коли для контролю процесу виробництва адаптуються відомі комерційні системи,

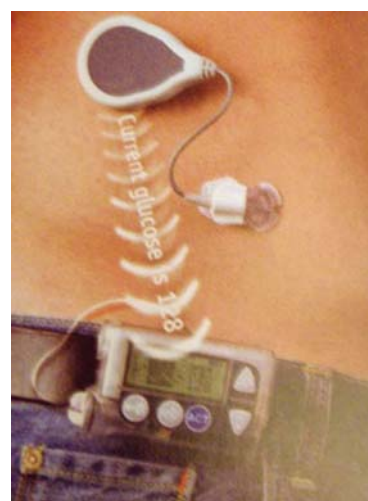


Рис. 8. Зовнішній вигляд системи Real Time (722) компанії Medtronic MiniMed [123]

що їх застосовують у медичній діагностиці. Окрім того, спеціально розробляються нові системи. Існують два основних варіанти (крім *off line*-аналізу) застосування біосенсорів для контролю процесу виробництва: *in situ* та *on line*. У разі безпосереднього використання датчиків усередині біореакторів (*in situ*) потрібно враховувати такі фактори: сенсор має залишатись у робочому стані навіть після стерилізації; концентрації, які потрібно визначати в біореакторах, часто перевищують діапазон роботи сенсора; присутність у біореакторі у великій концентрації багатьох інтерферуючих частинок; висока температура всередині біореактора, що може спричинити інактивацію біологічного матеріалу.

Такі умови не дозволили поки що розробити успішний комерційний варіант сенсора для безпосереднього використання усередині біореактора. Загалом усі системи, що застосовуються на сьогодні, працюють у так званому квазібезперервному режимі аналізу. В цьому разі аналізатор зв'язується із системою відбирання проб: пробу періодично відбирають із біореактора та аналізують. У табл. 9 наведено деякі комерційні варіанти аналізаторів для використання в харчовій промисловості та біотехнології.

У процесі моніторингу доквілля передусім використовують мікробні амперометричні сенсори [123]. Наприклад, під час проведення аналізу стічних вод визначають біохімічно окиснювані компоненти (БОК). Однак для такої оцінки потрібно близько 5 днів, тому датчики неможливо застосовувати для постійного контролю. Сенсори для експрес-визначення БОК розроблено на основі іммобілізованих клітин *Bacillus subtilis* і *Trishosporon cutaneum* [124]. У роботі [125] розглядається датчик для визначення бактеріального складу розчинів. Робота приладу ґрунтується на властивості медіаторів (наприклад,

*p*-бензохінону) видаляти електрони з дихального шляху мікроорганізмів. Переокиснення медіатору на електроді є прямим індикатором активності бактерій у розчині. Цей прилад було комерціалізовано фірмою Biosensori Iritech S.p.a (Італія). Він отримав назву Midas Pro [126]. Це, мабуть, поки що єдиний на сьогодні комерційний прилад на основі біосенсорів у галузі екології.

В огляді описано три класи амперометричних ферментних біосенсорів. Такий їх поділ зовсім не випадковий. Окрім головних принципів, які покладено в основу класифікації, — це ще й три різні генерації приладів.

Основою першої генерації біосенсорів є електроактивність субстратів і продуктів ферментативної реакції. Головні недоліки їх — високий робочий потенціал, що прикладається до електродів, та інтерференція з неспецифічними електроактивними частинками.

Друга генерація приладів ґрунтується на використанні медіаторів як переносників електронів. За їхньою допомогою вдалося зменшити прикладений потенціал й інтерференцію з неспецифічними частинками. Але, по-перше, медіатори потрібно зв'язувати з електродом, що ускладнює технологію, а, по-друге, іноді постає проблема участі їх в інших інтерферуючих реакціях.

В основу третьої генерації амперометричних біосенсорів покладено пряме перенесення електронів між ферментом і електродом. Їм притаманні висока селективність, чутливість і практично повна відсутність впливу інтерферуючих частинок і реакцій.

Більшість із комерційних пристроїв базуються на амперометричних біосенсорах, значною мірою за рахунок того, що це найстаріший, а відповідно найбільш повно вивчений клас електрохімічних перетворювачів. Основна галузь застосування

Таблиця 9. Аналізатори для контролю процесу виробництва та якості продуктів [95]

| Компанія                        | Країна          | Модель          | Речовина                           | Джерело |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|---------|
| Yellow Springs Instr., Ohio, OH | США             | YSI 2700        | Глюкоза, лактоза, етанол, сахароза | [96]    |
| Analox Instruments Ltd, London  | Велика Британія | GM6             | Глюкоза, лактат, етанол, гліцерол  | [101]   |
| Biometra, Gottingene            | Німеччина       | OLGA            | Глюкоза, етанол                    | [120]   |
| Seres, Aix-en-Provence          | Франція         | ENZYMAT         | Глюкоза, лактат                    | [120]   |
| Solea-Tacussel, Villeurbanne    | Франція         | Glucoprocasseur | Глюкоза, лактат                    | [120]   |
| Oriental Electric Co., Ltd      | Японія          | Freshness Meter | «Свіжість риби»                    | [121]   |
| Toyo Jozo Co.                   | Японія          | Biosensor       | Холестерол, фосфоліпіди            | [122]   |

біосенсорів — медична діагностика, де вже існує велика кількість комерційних приладів. У галузі ж харчової промисловості, біотехнології та екології застосовується надто мала кількість таких приладів, що відкриває перспективу впровадження нових розроблених приладів саме в цих галузях. Також дуже перспективними та конкурентоспроможними можуть бути прилади на основі мультисенсорних та мультиферментних масивів, особливо в разі використання сучасних досягнень мікроелектронної технології.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб».

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Coulet P. R. What is a biosensor // Biosensor principles and application / Eds. L. J. Blum, P. R. Coulet. — New York: Marcel Dekker, 1991. — P. 1–6.
2. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report) // Pure Appl. Chem. — 1999. — V. 71. — P. 2333–2348.
3. Hall E. A. H. Recent progress in biosensor development // J. Biochem. — 1988. — V. 20, N 4. — P. 357–362.
4. Clark L. C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions // Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. — 1956. — V. 2. — P. 41–48.
5. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // Ann. NY Acad. Sci. — 1962. — V. 102. — P. 29–45.
6. Updike S. J., Hicks G. P. The enzyme electrode // Nature. — 1967. — V. 214. — P. 986–988.
7. Tran Minh C. Biosensors. — London: Chapman & Hall, 1993. — 236 p.
8. Warsinke A. Biosensors for food analysis // Frontiers in Biosensorics II. Practical Applications / Eds. F. W. Scheller, F. Schubert J. Fedrowitz. — Basel: Birkhauser Verlag, 1997. — P. 121–139.
9. Pfeiffer D. Commercial biosensors for medical application // Ibid. — P. 149–160.
10. Bardeletti G., Sechaud F., Coilet P. R. A reliable L-lactate electrode with a new membrane for enzyme immobilization for amperometric assay of lactate // Anal. Chim. Acta. — 1986. — V. 187. — P. 47–54.
11. Mizutani F., Yamanaka T., Tanabe Y., Tsuda K. An enzyme electrode for L-lactate with chemically amplified electrode // Ibid. — 1985. — V. 177. — P. 153–166.
12. Matsumoto K., Seijo H., Karube I., Suzuki S. Amperometric determination of choline with use of immobilized choline oxidase // Biotech. Bioeng. — 1980. — V. 22. — P. 1071–1086.
13. Xin Q., Wightman R. M. Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator // Anal. Chim. Acta. — 1997. — V. 341. — P. 43–51.
14. Verduyn C., Van Dijken J. P., Scheffers W. A. A simple, sensitive and accurate alcohol electrode // Biotech. Bioeng. — 1983. — V. 25. — P. 1049–1055.
15. Boujtita M., Hart J. P., Pittson R. Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer // Biosens. Bioelectronics. — 2000. — V. 15. — P. 257–263.
16. Clark L. C. A family of polarographic enzyme electrodes and the measurement of alcohol // Biotech. Bioeng. — 1972. — V. 3. — P. 377–394.
17. Belghitin H., Romette J. L., Thomas D. An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol // Biotech. Bioenergy. — 1987. — V. 30. — P. 1001–1005.
18. Korpan Y. I., Dzyadevich S. V., Arkhipova V. N. et al. Enzyme-based electrochemical sensors for formaldehyde detection // Sensors Materials. — 2000. — V. 12, N 2. — P. 79–86.
19. Wollenberger U., Scheller F., Bohmer A. et al. A specific enzyme electrode for L-glutamate-development and application // Biosensors. — 1989. — V. 4. — P. 381–391.
20. Simonian A. L., Rainina E. I., Wild J., Fitzpatrick P. F. A biosensor for L-tryptophan determination based on recombinant *Pseudomonas savastanoi* tryptophan-2-monoxygenase // Anal. Lett. — 1995. — V. 28. — P. 1751–1761.
21. Saurina J., Hernandez-Cassou S., Alegret S., Fabregas E. Amperometric determination of lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites // Biosens. Bioelectronics. — 1999. — V. 14. — P. 211–220.
22. Vrbova E., Marek M., Ralys E. Biosensor for determination of L-lisin // Anal. Chim. Acta. — 1992. — V. 279. — P. 131–136.
23. Niu J., Yang L. J. Renewable-surface graphite-ceramic enzyme sensors for the determination of hypoxantine in fish meat // Anal. Commun. — 1999. — V. 36. — P. 81–83.
24. Lorenzo E., Pariente F., Hernandez L. et al. Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes // Biosens. Bioelectronics. — 1998. — V. 13. — P. 319–332.
25. Eggins B. R. Biosensors: an introduction. — Chichester-Stuttgart: John Wiley & Sons and Teubner, 1996. — P. 31–51.

26. *Albery W. J., Bartlett P. N., Cass A. E. G., Sim K. W.* Amperometric enzyme electrodes. Part IV. An enzyme electrode for ethanol // *J. Electroanal. Chem.* — 1987. — V. 218. — P. 127–134.
27. *Miyamoto S., Murakami T., Saito A., Kimura J.* Development of an amperometric alcohol sensor based on immobilized alcohol-dehydrogenase and entrapped NAD<sup>+</sup> // *Biosens. Bioelectronics.* — 1991. — V. 6. — P. 563–567.
28. *Blaedel W. J., Engstrom R. C.* Reagentless enzyme electrode for ethanol, lactate, and malate // *Anal. Chem.* — 1980. — V. 52. — P. 1691–1697.
29. *Bartlett P. N., Whitaker R. G.* Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes // *Biosensors.* — 1987/88. — V. 3. — P. 359–379.
30. *Jaraba P., Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.* NADH amperometric sensor based on poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fiber microelectrodes: application to the enzymatic determination of L-lactate // *Electrochimica Acta.* — 1998. — V. 43. — P. 3555–3565.
31. *Albery W. J., Bartlett P. N., Cass A. E. G.* Amperometric enzyme electrodes // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* — 1987. — V. 316. — P. 107–119.
32. *Wilson G. S., Thevenot D. R.* Unmediated amperometric enzyme electrodes // *Biosensors.* A practical approach / Ed. A.E.G. Cass. — Oxford: Oxford University Press, 1990. — P. 1–17.
33. *Gajovic N., Warsinke A., Scheller F. W.* A novel multienzyme electrodes for the determination of citrate // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* — 1995. — V. 63. — P. 337–344.
34. *Matsumoto K., Tsukatani T., Okajima Y.* Amperometric flow-injection determination of citric acid in food using free citrate lyase and coimmobilized oxalacetate decarboxylase and pyruvate oxidase // *Electroanalysis.* — 1995. — V. 7. — P. 527–530.
35. *Scheller F., Karsten C.* A combination of invertase reactor and glucose-oxidase electrode for successive determination of glucose and sucrose // *Anal. Chim. Acta.* — 1983. — V. 155. — P. 29–36.
36. *Filipak M., Fludra K., Gosciminska E.* Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode // *Biosens. Bioelectronics.* — 1996. — V. 11. — P. 355–364.
37. *Varadi M., Adanyi N., Nagy G., Rezessy-Szabo J.* Studying the bienzyme reaction with amperometric detection for measuring maltose // *Ibid.* — 1993. — V. 8. — P. 339–345.
38. *Pfeiffer D., Ralis E. V., Makower A., Scheller F.* Amperometric bienzyme based biosensor for the detection of lactose — characterization and application // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* — 1990. — V. 49. — P. 255–265.
39. *Xu Y., Guilbault G. G., Kuan S. S.* Fast responding lactose enzyme electrode // *Enzyme Microb. Technol.* — 1990. — V. 12. — P. 104–108.
40. *Larsson N., Ruzgas T., Gorton L. et al.* Design and development of an amperometric biosensor for acetylcholine determination in brain microdialysates // *Electrochimica Acta.* — 1998. — V. 43. — P. 3541–3554.
41. *Guilbault G. G., Nanjo M.* A phosphate selective electrode based on immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase // *Anal. Chim. Acta.* — 1975. — V. 78. — P. 69–80.
42. *Campanella L., Pacifici F., Sammartino M. P., Tomassetti M.* A new organic phase bienzymatic electrode for lecithin analysis in food products // *Bioelectrochem. Bioenerg.* — 1988. — V. 47. — P. 27–38.
43. *Albery W. J., Hillman A. R.* Transport and kinetics in modified electrodes // *J. Electroanal. Chem.* — 1984. — V. 170. — P. 27–49.
44. *Quing-Shan Li, Bang-Ce Ye, Bai-Xiang Liu, Jian-Jiang Zhong.* Improvement of the performance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation at low working potential by incorporating TTF-TCNQ into a platinum wire electrode for glucose determination // *Biosens. Bioelectronics.* — 1999. — V. 14. — P. 327–334.
45. *Albery W. J., Craston D. H.* Amperometric enzyme electrodes: Theory and experiment // *Biosensors. Fundamentals and Applications* / Eds. A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson. — Oxford: Oxford University Press, 1987. — P. 180–210.
46. *Cosnier S.* Biomolecule immobilization on electrode surface by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review // *Biosens. Bioelectronics.* — 1999. — V. 14. — P. 443–456.
47. *Albery W. J., Bartlett P. N.* An organic conductor electrode for the oxidation of NADH // *J. Chem. Soc.* — 1984. — *Chem. Commun.* — P. 234–236.
48. *Albery W. J., Bartlett P. N., Bycroft M. et al.* Amperometric enzyme electrodes. 3. A conducting salt electrode for the oxidation of four different flavoenzymes // *J. Electroanal. Chem.* — 1987. — V. 218. — P. 119–126.
49. *Albareda-Sirvent M., Mercoci A., Alegret S.* Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review // *Sensors Actuators B.* — 2000. — V. 69. — P. 153–163.
50. *Eddowes M.* Theoretical methods for analysing biosensor performance // *Biosensors.* A practical approach / Ed. A. E. G. Cass. — Oxford: Oxford University Press, 1990. — P. 211–263.

51. *Thevenot D. R., Sternberg R., Coulet P. R. et al.* Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose // *Anal. Chem.* — 1979. — V. 51. — P. 96–100.
52. *Reddy S. M., Vadgama P. M.* Membranes to improve amperometric sensor characteristics // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment* / Ed. E. Kress-Rogers. — New York: CRC Press, 1997. — P. 111–135.
53. *Дорохова Е. Н., Прохорова Г. В.* Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. — М.: Высшая школа, 1991. — 256 с.
54. *Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D. et al.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose // *Anal. Chem.* — 1984. — V. 56. — P. 667–571.
55. *Spinas G. A., Andre U. R., Heinzinger T., Berger W.* Evaluation des Pen-Meters zur Blutzuckerbestimmung bei ambulanten Diabetikern // *Schweiz. Med. Wochenschr.* — 1990. — V. 120. — 125 p.
56. *Bradley J., Schmid R. D.* Optimisation of a biosensor for in situ fermentation monitoring of glucose concentration // *Biosens. Bioelectronics.* — 1991. — V. 6. — P. 669–674.
57. *Stredansky M., Pizzariello A., Stredanska S., Miertus S.* Determination of D-fructose in foodstuffs by an improved amperometric biosensor based on a solid binding matrix // *Anal. Commun.* — 1999. — V. 36. — P. 57–61.
58. *Xie X., Kuan S. S., Guilbault G. G.* A simplified fructose biosensor // *Biosens. Bioelectron.* — 1991. — V. 6. — P. 49–54.
59. *White S. F., Higgins I. J., D'Costa E. et al.* Amperometric detection of lactate: a comparison between mediated and platinised carbon electrodes // *Biosensors: Fundamental technologies and application* / Eds. F. Scheller, R.D. Schmid. — Weinheim: VCH Publishers, 1992. — P. 403–421.
60. *Kulys J., Schuhmann W., Schmidt H.-L.* Carbon paste electrodes with incorporated lactate oxidase and mediators // *Anal. Lett.* — 1992. — V. 26. — P. 1011–1024.
61. *Hale P. D., Hung S.-L., Okamoto Y., Skotheim T. A.* Glutamate biosensors based on electrical communication between L-glutamate oxidase and a flexible redox polymer // *Ibid.* — 1991. — V. 24. — P. 345–356.
62. *Vahjen W., Bradley J., Bilitewski U., Schmid R. D.* Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate // *Ibid.* — 1991. — V. 24. — P. 1445–1452.
63. *Dempsey E., Wang J., Wollenberger U., Ozsoz M.* A lysine dehydrogenase-based electrode for biosensing of L-lysine // *Biosens. Bioelectron.* — 1992. — V. 7. — P. 323–327.
64. *Yon Hin B. F. Y., Lowe C. R.* Catalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotid at hexacyanoferrate-modified nickel electrodes // *Anal. Chem.* — 1987. — V. 59. — P. 2111–2115.
65. *Holt P. J., Gray Stephens L. D., Bruce N. C., Lowe C. R.* An amperometric opiate assay // *Biosens. Bioelectron.* — 1995. — V. 10. — P. 517–526.
66. *Пам 3.838.033 США.* Enzyme electrode / W. Mindt, P. Racine, P. Schlapfer. — Опубл. 1974.
67. *Dicks J. M., Hattori S., Karube I. et al.* Ferrocene modified polypyrrole with immobilised glucose oxidase and its application in amperometric glucose microsensors // *Ann. Biol. Clin.* — 1987. — V. 47. — P. 607–613.
68. *Rosen-Margalit I., Rishpon J.* Novel approaches for the use of mediators in enzyme electrodes // *Biosens. Bioelectron.* — 1993. — V. 8. — P. 315–323.
69. *Marcus R. A., Sutin N.* Electron transfer in inorganic, organic and biological systems // *Adv. Chem.* — 1991. — V. 228. — P. 1–23.
70. *Marcus R. A., Sutin N.* Electron transfer in chemistry and biology // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1985. — V. 811. — P. 265–322.
71. *Yeh P., Kuwana T.* Reversible electrode reaction of cytochrome c // *Chem. Lett.* — 1977. — P. 1145–1148.
72. *Eddows M. J., Hill H. A. O.* Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — 1977. — P. 770–772.
73. *Niki K., Yagi I., Inokuchi H., Kimura K.* Electrochemical behavior of cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*, strain Miyazaki, on the mercury electrode // *J. Am. Chem. Soc.* — 1979. — V. 101. — P. 3335–3340.
74. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Walton N. J.* Direct electrochemistry of redox proteins // *Acc. Chem. Res.* — 1988. — V. 21. — P. 407–413.
75. *Armstrong F. A.* Dynamic electrochemistry of iron-sulfur proteins // *Adv. Inorg. Chem.* — 1992. — V. 38. — P. 117–163.
76. *Tarasevich M. R., Yaropolov A. I., Bogdanovskaya V. A., Varfolomeev S. D.* Electron catalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase // *Bioelectrochem. Bioenerg.* — 1979. — V. 6. — P. 393–403.
77. *Berezin I. V., Varfolomeev S. D.* Principles of bioelectrocatalysis // *Enzym. Eng.* — 1980. — V. 5. — P. 95–100.
78. *Варфоломеев С. Д., Березин И. В.* Биоэлектрокатализ: ускорение электродных реакций с ферментами // *Успехи в физической химии* / Под ред. Я. М. Колотыркина. — М.: Мир, 1982. — С. 60–95.
79. *Lee Chi-Woo, Gray H. B., Anson F. C., Malmstrom B. G.* Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase // *J. Electroanal. Chem.* — 1984. — V. 172. — P. 289–300.
80. *Ярополов А. И., Маловик Б., Варфоломеев С. Д., Березин И. В.* Биоэлектрокатализ.

- Прямой электронный перенос из активно-го центра пероксидазы на электрод // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 249. — С. 1399–1402.
81. *Jonsson G., Gorton L.* An electrochemical sensor for hydrogen peroxide based on peroxidase adsorbed on a spectrographic graphite electrode // *Electroanalysis*. — 1989. — V. 1. — P. 465–468.
82. *Wollenberg U., Bogdanovskaya V., Bobrin S. et al.* Enzyme electrodes using bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide // *Anal. Lett.* — 1990. — V. 23. — P. 1795–1808.
83. *Zhao J., Henkens R. W., Stonehuerner J. et al.* Direct electron transfer at horseradish peroxidase-modified colloidal gold electrodes // *J. Electroanal. Chem.* — 1992. — V. 327. — P. 109–119.
84. *Ho W. O., Athey D., McNeil C. J. et al.* Mediatorless horseradish peroxidase enzyme electrodes based on activated carbon: potential application to specific binding assay // *Ibid.* — 1993. — V. 351. — P. 185–197.
85. *Ruzgas T., Gorton L., Emneus J., Marko-Verga G.* Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode // *Ibid.* — 1995. — V. 391. — P. 41–49.
86. *McNeil C. J., Athey D., Ho W. O.* Direct electron transfer bioelectronic interfaces: application to clinical analysis // *Biosens. Bioelectron.* — 1995. — V. 10. — P. 75–83.
87. *Armstrong F. A., Lannon A. M.* Fast interfacial electron transfer between cytochrome *c* peroxidase and graphite electrodes promoted by aminoglycosides: novel electroenzymatic catalysis of  $H_2O_2$  reaction // *J. Am. Chem. Soc.* — 1987. — V. 109. — P. 7211–7212.
88. *Paddock R. M., Bowden E. F.* Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide via direct electron transfer from pyrolytic graphite electrodes to irreversibly adsorbed cytochrome *c* peroxidase // *J. Electroanal. Chem.* — 1989. — V. 260. — P. 487–494.
89. *Scott D. L., Paddock R. M., Bowden E. F.* The electrocatalytic enzyme function on adsorbed cytochrome *c* peroxidase on pyrolytic graphite // *Ibid.* — 1992. — V. 341. — P. 307–321.
90. *Degani Y., Heller A.* Direct electrochemical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 1. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme // *J. Phys. Chem.* — 1987. — V. 91. — P. 1285–1289.
91. *Heller A.* Electrical wiring of redox enzymes // *Acc. Chem. Res.* — 1990. — V. 23. — P. 128–134.
92. *Gregg B. A., Heller A.* Crosslinked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor application // *Anal. Chem.* — 1990. — V. 62. — P. 258–263.
93. *Heller A.* Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes // *J. Phys. Chem.* — 1992. — V. 96. — P. 3579–3587.
94. *Katz E., Heleg-Shabtai V., Willner B. et al.* Electrical contact of redox enzymes with electrodes: novel approaches for amperometric biosensors // *Bioelectrochem. Bioenergetics*. — 1997. — V. 42. — P. 95–104.
95. *Дзядевич С. В.* Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // *Биополимеры и клетка*. — 2002. — Т. 18, № 5. — С. 363–376.
96. *YSI Incorporated.* — <http://www.ysi.com>.
97. *NOVA Biomedical.* — <http://www.biorsearchonline.com>.
98. *Prufgeratewerk Medingen.* — <http://www.pd-gruppe.de>.
99. *Eppendorf.* — <http://www.eppendorf.com>.
100. *EKF Diagnostic.* — <http://www.ekf.ru>.
101. *Analox Instruments.* — <http://www.analox.com>.
102. *Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.* Biosensori elettrochimici in *Biomedicina // Caleidoscopio Italiano*. — Genova: Medical-Systems S.p.A. — 1997. — N 112. — 67 p.
103. *Scheller F. W., Pfeiffer D.* Commercial Devices based on amperometric biosensors // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment / Ed. E. Kress-Rogers.* — New York: CRC Press, 1997. — P. 245–256.
104. *Market Overview: Lactate Analysers.* — <http://www.medizin.li/laktat/laktat.htm>.
105. *Инструкция по применению и эксплуатации ЭКСАН-Г.* — Паневежис: Завод точной механики, 1990 — 12 с.
106. *Abbott Laboratories.* — <http://www.abbottdiagnostics.com>.
107. *Bayer Corporation.* — <http://www.glucometer.com>.
108. *i-STAT Corporation.* — <http://www.i-stat.com>.
109. *ExtraCare from Roche Diagnostics.* — <http://www.extracare.co.nz>.
110. *LifeScan from Johnson & Johnson.* — <http://www.lifescan.com>.
111. *Home Diagnostics.* — <http://www.homediagnosticsinc.com>.
112. *Inverness Medical Technology.* — <http://invernessmedical.com>.
113. *Amira Medical.* — <http://www.amiramed.com>.
114. *AccuChek from Roche.* — <http://accu-chek.com>.
115. *Пат. 43 352 413 Нимеччина.* Verfahren zur kontinuierlichen Analyse von Bestandteilen einer Flüssigkeit / A. Schwock, P. Abel. — Оpubл. 1991.
116. *Armour J. C., Lucisano J. Y., McKean B. D., Gough D. A.* Application of chronic intravascular blood glucose in dogs // *Diabetes*. — 1990. — V. 39. — P. 1519–1523.

117. Koudelka M., Rohner-Jeanrenaud F., Terrettaz J. et al. In vivo behaviour of hypodermically implanted microfabricated glucose sensors // Biosens. Bioelectron. — 1991. — V. 6. — 31 p.
118. Turner A. P. F. Biosensors: past, present and future. — <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/chinap.htm>.
119. Medtronic MiniMed. — <http://www.minimed.com>.
120. Luong J. H. T., Bouvrette P., Male K. B. Developments and applications of biosensors in food analysis // Tibtech. — 1997. — V. 15. — P. 369–377.
121. Freshness Meter from Oriental Electric Co. Ltd // Chemical Sensors. — 1992. — V. 8, N 1. — 18 p.
122. Nagai R., Yaoita M., Yoshida Y. et al. High-performance biosensor for cholesterol // Proc. 9th Chemical Sensor Symposium. — Aoyama Gakuin University (Japan), 1989. — P. 17–20.
123. Hikuma M., Yasuda T. Microbial sensors for estimation of biochemical oxygen demand and determination of glutamate // Methods in enzymology /Ed. K. Mosbach. — V. 137, Part D. — San Diego: Academic Press, 1998. — 124 p.
124. Riedel K., Neumann B., Scheller F. W. Mikrobielle Sensoren auf Basis von Respirationsmessungen // Chem. — Ing. — Tech. — 1992. — V. 64. — 518 p.
125. White S. F., Turner A. P. F. Mediated amperometric biosensors // Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment / Ed. E. Kress-Rogers. — New York: CRC Press, 1997. — P. 227–244.
126. Biosensori Iritech. — <http://www.mclink.it/com/iritech/ebiosens.htm>.

## АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

*Дзядевич С.В.*

*Институт молекулярной биологии  
и генетики НАН Украины, Киев  
E-mail: dzyad@yahoo.com*

Сегодня разработка биосенсоров является одним из самых перспективных направлений исследований в области аналитической биотехнологии. В данном обзоре освещены основные электрохимические принципы, лежащие в основе применения амперометрического метода в биоаналитической практике. Амперометрические биосенсоры классифицированы по трем группам (безмедиаторные, медиаторные и основанные на прямом переносе электронов), которые подробно описаны с приведением примеров и указанием преимуществ и недостатков. Рассмотрены коммерческие системы на основе амперометрических биосенсоров и области их применения.

**Ключевые слова:** амперометрический биосенсор, фермент, медиатор, электрод, коммерческая система.

---



---

## AMPEROMETRIC ENZYME BIOSENSORS

*S. V. Dzyadevych*

*Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv  
E-mail: dzyad@yahoo.com*

Today the development of biosensors is one of promising directions in the field of analytical biotechnology. The key electrochemical principles connected with application of amperometric method in bioanalytical practice were considered. Amperometric biosensors were classified on three groups such as unmediated, mediated and based on direct transfer of electrons, which were described in detail, and their advantages and disadvantages were shown. The modern commercial systems based on amperometric biosensors and its applications were described.

**Keywords:** amperometric biosensor, enzyme, mediator, electrode, commercial system.