

УДК 557.152.1+53

АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР, МОДИФІКОВАНИЙ БАГАТОШАРОВИМИ ВУГЛЕЦЕВИМИ НАНОТРУБКАМИ, ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ

*Н. С. Рогальова*¹*Л. В. Шкотова*¹*О. В. Львова*²*В. В. Гарбуз*³*В. Б. Муратов*³*Т. І. Дуда*⁴*О. О. Васильєв*⁴*Я. І. Корпан*¹*О. А. Білоіван*¹¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ²Київський національний університет імені Тараса Шевченка³Інститут проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича
НАН України, Київ⁴Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»*E-mail: olga_beloivan@mail.ru*

Отримано 14.11.2011

З метою поліпшення аналітичних характеристик амперометричних біосенсорів для визначення глюкози застосовано багатошарові вуглецеві нанотрубки. Атестовані зразки амінованих та карбоксильованих багатошарових вуглецевих нанотрубок суспендовано й використано для модифікації амперометричних біосенсорів на основі іммобілізованої глюкозооксидази та амперометричних перетворювачів С220АТ (Drop Sens, Іспанія). Біоселективну мембрану на основі глюкозооксидази формували на поверхнях робочих електродів кількома методами: ковалентним зшиванням і коіммобілізацією з пероксидазою хрому в гель бичачого сироваткового альбуміну в парах глутарового альдегіду та електрополімеризацією у плівку струмопровідного полімера поліетилендіокситіофену. Електрохімічні вимірювання виконували за допомогою приладу μ Stat 200 (Drop Sens, Іспанія). Встановлено, що біосенсори з біоселективною мембраною на основі багатошарових вуглецевих нанотрубок мають переваги над біосенсорами без вуглецевих нанотрубок в чутливості, можливості визначення глюкози за низького робочого потенціалу та ширшому діапазоні визначення концентрацій аналіту. Оптимізований біосенсор на основі мембрани з багатошаровими вуглецевими нанотрубками та глюкозооксидази використано для визначення глюкози у вині. Показано достовірну кореляцію результатів біосенсорного методу з методом вискоефективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: багатошарові вуглецеві нанотрубки, амперометричний біосенсор, глюкоза, глюкозооксидаза, нанокompозитні мембрани.

Розроблення електрохімічних ензимосенсорів є важливим напрямом біотехнології впродовж останніх десятиріч. На сьогодні вирішення проблем екологічного моніторингу доквілля, аналізу якості харчових продуктів, клінічної діагностики тощо ставить на порядок денний створення моно- та мультисенсорних пристроїв та аналітичних приладів на їх основі. Часто при розробленні біосенсорів виникає необхідність підвищення чутливості та селективності ензимних мембран, зниження мінімальної концентрації, що вимірюється біосенсором, можливості проводити аналізи в широкому діапазоні концентрацій та за низького робочого потенціалу. Головну роль у вирішенні цих завдань відіграє залучення наноматеріалів

та нанотехнологій. Останнім часом інтенсивно ведуться роботи зі створення високочутливих і селективних електрохімічних біосенсорів на основі вуглецевих нанотрубок (ВНТ) [1–7].

Як відомо, у більшості розроблених амперометричних біосенсорів на основі іммобілізованих оксидоредуктаз використано принцип електрохімічної детекції пероксиду водню як продукту ензиматичного перетворення аналіту (субстрату). Біосенсори для визначення глюкози, зокрема на основі іммобілізованої глюкозооксидази (ГОД), не тільки мають важливе практичне застосування, але й завдяки тому, що ГОД є активною, високостабільною, добре вивченою і комерційно доступною оксидоредуктазою, набули широкого використання

як модель для впровадження нових технологічних рішень у біосенсоріці.

Раніше нами було запропоновано метод іммобілізації глюкозооксидази за участю багатопорових вуглецевих нанотрубок, модифікованих аміногрупами [БШВНТ(NH₂)], у протейновий гель зшиванням глутаровим альдегідом (ГА) на поверхню золотих електродів [8]. З метою більш детального аналізу впливу БШВНТ у складі ензимних мембран на електрохімічні властивості біосенсорів у роботі проведено дослідження біосенсорів, створених із застосуванням декількох методів іммобілізації глюкозооксидази на електроди фірми Drop Sens (Іспанія), та здійснено аналіз глюкози у реальних зразках.

Матеріали і методи

У роботі використовували глюкозооксидазу (ЕС 1.1.3.4) з *Aspergillus niger* активністю 271 У/мг фірми Gengume Corp. (Німеччина), D-глюкозу, пероксидазу хрому, тип VI (ПО) (ЕС 1.11.1.7) з активністю 263 У/мг, бичачий сироватковий альбумін (БСА), 50% -й розчин глутарового альдегіду (ГА) виробництва Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина), аміновані БШВНТ(NH₂) та карбоксильовані БШВНТ(COOH) фірми Drop Sens (Іспанія), полівінілпіролідон (ПВП) фірми Merck (Німеччина), мономер 3,4-етилендіокситіофен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (ФРН), поліетиленгліколь 1450 (ПЕГ) фірми Sigma (Швейцарія), карбодіімід, моноіодоцтову кислоту, диметилсульфоксид (ДМС), диметилформамід (ДМФА) та інші сполуки вітчизняного виробництва категорії «х. ч.» та «ч. д. а.».

Застосовували також триелектродні перетворювачі С220АТ (далі — «золоті електроди»), виготовлені методом трафаретного друку, виробництва фірми Drop Sens (Іспанія), які описано раніше [8].

Для виготовлення лабораторних макетів біосенсорів чутливу мембрану формували на поверхні робочого електрода іммобілізацією ензиму. Для контрольних вимірювань застосовували датчики як без мембрани, так і з відповідними мембранами без ензиму.

Підготовка БШВНТ до роботи

Ідентифікацію складу зразків БШВНТ проводили за методом фракціонованого окиснення вуглецевих наноматеріалів (ВНМ), що є кулонометричним варіантом ступінчастої температурної карбоксиметрії [9]. Діапазон робочих температур становив

300–1 350 °С. Поточні значення масової частки спаленого вуглецю (X_C,%) , температури (t,%) та часу (τ, с) фіксували кожні 0,5–1,0 хв. Окиснення в потоці очищеного кисню здійснювали протягом 30–40 хв. Маса проби дорівнювала 5–10 мг. Повноту окиснення газів, що виділялися за низьких (300–600 °С) температур, забезпечували допалювальним пристроєм. Контрольний дослід визначення загального вмісту вуглецю [X_{C(зар.)}] проводили з окремої наважки при 1 200 °С. Відносне квадратичне відхилення становило близько 3% мас. Температура екстремумів (утворення/розкладання) є індивідуальною для кожної структури нановуглецю у ВНМ і для багато- та одношарових нанотрубок відповідає 760 і 800 °С [9].

З метою встановлення типу функціонального покриття та ступеня функціоналізації матеріалів досліджували вміст газотворювальних домішок методом імпульсної високотемпературної відновної екстракції вуглецем у потоці газу-носія гелію з наступним хроматографічним розділенням, ідентифікацією та вимірюванням кількості газів, що утворилися. Калібрування установки було виконано за допомогою державних стандартних зразків.

Суспендування БШВНТ. Суспендування зразків БШВНТ проводили за допомогою ультразвукового сонікатора RK 102 Н (Vandelin electronic, Німеччина). Аміновані БШВНТ суспендували у водному розчині ПВП (100 мг/мл) протягом 30 хв за кімнатної температури. Такий же час сонікації застосовували для виготовлення суспензій зразків БШВНТ у ДМС чи ДМФА. Водну суспензію карбоксильованих БШВНТ обробляли ультразвуком протягом 4 годин.

Електронна мікроскопія БШВНТ. Фотографії ТЕМ отримали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230 (JEOL, Японія) колективного центру користування НАН України при Інституті ботаніки ім. М. Г. Холодного НАНУ.

Якість водних суспензій БШВНТ(COOH) визначали за розміром наночастинок за допомогою приладу Nanosizer та за величиною Z-потенціалу на приладі Zetasizer Nano Z фірми Malvern Instruments (www.novations.com.ua).

Електрохімічні вимірювання

Вивчення вольтамперних характеристик електродів і вимірювання амперометричного сигналу біосенсорів здійснювали за допомогою приладу μStat 200 (Drop Sens, Іспанія) з відповідним програмним забезпе-

ченням, що був підключений до комп'ютера (<http://www.dropsens.com/en/inicio.html>).

Вимірювання проводили у відкритій комірці об'ємом 2,5 мл у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за кімнатної температури та інтенсивного перемішування, як описано раніше [8]. За величину сигналу біосенсора, що відповідає певній концентрації субстрату, приймали середнє арифметичне з трьох паралельних вимірювань. Похибка вимірювань не перевищувала 7%.

Методи формування ензимоматриці на поверхні золотого електрода

Імобілізація ГОД методом міжмолекулярного зшивання в протеїновий гель БСА у парах ГА. Чутливу матрицю біосенсора формували нанесенням крапельним методом на поверхню робочого електрода 1,7 мкл відповідної вихідної суміші та подальшою іммобілізацією ковалентним зшиванням у протеїновий гель у насичених парах ГА [8]. Мембранна суміш містила 0,05–0,5% ГОД, 6% БСА, 2–6% суспензії БШВНТ(NH₂) та 5% гліцеролу [далі — суміш ГОД-БСА-БШВНТ(NH₂)]. Розчини протеїнів готували із застосуванням 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,0. Електроди з нанесеною сумішшю інкубували в парах ГА протягом 40 хв за кімнатної температури. Після цього мембрани висушували на повітрі упродовж 30 хв та тричі відмивали 25 мМ фосфатним буфером (рН 7,0). Контрольну мембранну суміш готували за тією самою процедурою без додавання нанотрубок (далі — суміш ГОД-БСА).

Коіммобілізація ГОД та ПО у протеїнову мембрану в парах ГА (ГОД-ПО-БСА). Чутливу матрицю біосенсора формували аналогічно процедурі, що її описано вище. Мембранна суміш містила 0,05% ГОД, 1% ПО, 5% БСА та 5% гліцеролу.

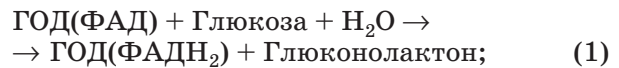
Модифікація поверхні електрода БШВНТ(СООН). Поверхню робочого електрода обробляли протягом 30 хв спочатку 0,2 М водним розчином моноіодоцтової кислоти, а потім 0,2 М водним розчином карбодіїміду. Після кожної обробки поверхню відмивали дистильованою водою. 2% -ну водну суспензію БШВНТ(СООН) крапельним способом наносили на поверхню електрода, витримували 30 хв і відмивали буфером. Модифіковані електроди застосовували для подальшої іммобілізації ензиму.

Включення ГОД до плівки електропровідного полімеру поліетилендіокситіофену (ГОД-ПЕДТ). Для електрохімічної полімеризації застосовували суміш, яка складалася

з 10 мМ ЕДТ, 1 мМ ПЕГ та 0,048 мг/мл ГОД. Усі компоненти суміші готували у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2. На поверхню всіх електродів сенсора наносили 20 мкл такої суміші, підключали до потенціостату фірми DropSens і проводили 15 сеансів циклічної вольтамперометрії у діапазоні прикладених потенціалів +0,2 ... +1,5 В зі швидкістю 0,1 В/с [10, 11].

Результати та обговорення

Глюкозооксидаза є ФАД-вмісним ензимом, що забезпечує окиснення β-D-глюкози до D-глюконолактону з утворенням пероксиду водню за схемою:



Розроблення біосенсорів на основі БШВНТ і ГОД передбачало вирішення таких питань: атестація електродів, визначення фазової чистоти та ступеня функціоналізації нанотрубок, суспендування нанотрубок і оцінювання якості суспензії, вибір методу іммобілізації нанотрубок і ГОД на поверхню електрода, визначення оптимальних умов функціонування і вивчення електрохімічних характеристик макетів біосенсорів.

У попередніх дослідженнях нами вивчено вольтамперні характеристики золотих електродів DropSens без ензимних мембран [8]. Показано, що додавання пероксиду водню змінює величину сигналу електроду за потенціалу 0,3–0,9 В, що свідчить про окиснення H₂O₂ на поверхні електрода, тимчасом як додавання глюкози практично не змінює форму кривої. Потенціал 0,8 В було обрано як оптимальний для проведення подальших амперометричних вимірювань. Встановлено, що глюкоза не окиснюється/відновлюється на електроді за цього потенціалу [8].

Результати атестації фазового складу зразків нанотрубок, модифікованих різними функціональними групами: аміно-[БШВНТ(NH₂)] та карбоксильними [БШВНТ(СООН)], наведено відповідно на рис. 1, А і 1, Б. Як видно з рисунків, подані зразки — це високоякісний продукт, що містить лише нанотрубки як основну фазу. Інших фаз нановуглецю (наноцибулін, графітових нанопакетів, поперечно-шаруватих, конусно-шаруватих та сувоєподібних нановолокон) не виявлено.

Модифікований аміногрупами зразок містить як основну фазу багатошарові

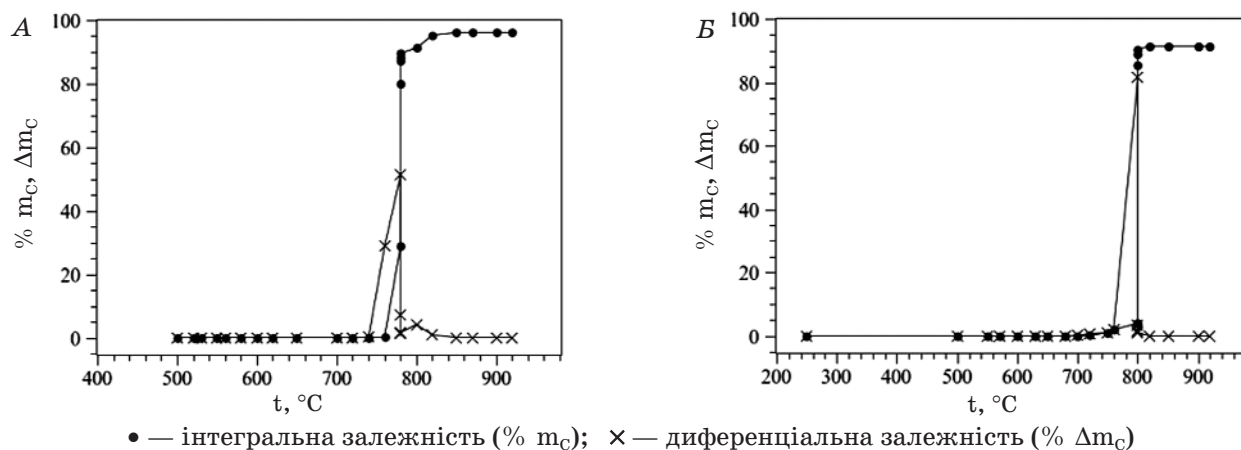


Рис. 1. Температурна залежність окиснення зразків БШВНТ: А — БШВНТ(NH₂); Б — БШВНТ(COOH)

нанотрубки (близько 91% мас.) з домішкою одношарових у кількості близько 4% мас. Зразок, модифікований карбоксильними групами, виявляє чітко виражений синглет окиснення, температура якого вказує на наявність однієї нановуглецевої фази — багатошарових нанотрубок.

У результаті дослідження типу функціонального покриття та ступеня функціоналізації зразків (див. розділ «Матеріали та методи») показано, що багатошарові нанотрубки, модифіковані аміногрупами, містили (% мас.): Н — 0,23; N — 0,3; О — 0,5. Залишок мінеральної складової після окиснення становив 3,6% мас. Згідно з результатами аналізу на газотвірні домішки, відповідно до розрахунку за можливими стехіометричними співвідношеннями, у зразку можуть бути присутні такі функціональні групи: аміно-, гідрокси-, СН-. Цей висновок потребує уточнення, наприклад методом ІЧ-спектроскопії.

Аналогічно зразок, модифікований карбоксильними групами, містить (% мас.): Н — 0,07; N — не виявлено; О — 6,6. Згідно з даними результатів аналізу, 65% COOH-груп утворюють ангідриди, які в разі контакту з водою повністю відновлюються до COOH. Залишок мінеральної складової — 1,9% мас.

Таким чином, дослідження фазового складу зразків нанотрубок показало, що застосовані препарати є високоякісними продуктами, які містять як основну фазу багатошарові нанотрубки. Атестовані зразки нанотрубок було випробувано для отримання суспензій для подальшої модифікації як поверхні золотих робочих електродів перед іммобілізацією ензимної мембрани, так і чутливих мембран біосенсорів (див. розділ «Матеріали і методи»).

Оскільки БШВНТ(NH₂) не «розчиняються» у воді, для визначення способу їх суспендування було випробувано ультразвукову обробку сумішей амінованих БШВНТ у полярних розчинниках ДМС, ДМФА та водорозчинному полімері ПВП, як описано в розділі «Матеріали і методи». У разі застосування ДМС зміну стану нанотрубок не спостерігали, а використання ДМФА призвело до часткового збільшення об'єму БШВНТ(NH₂). У випадку ПВП отримували стабільну суспензію нанотрубок. Окрім того, ушкоджувальна дія ПВП, що використовується як заміник крові та входить до складу ліків і косметичних засобів, є меншою для ензиму [12], а це важливо за умов включення суспензії до складу ензимної мембрани. Оптимальним часом для оброблення ультразвуком визначено 30 хв. Загальний вигляд суспензії, а також розподіл БШВНТ-NH₂ у полімері подано на рис. 2.

Отриману суспензію було використано для модифікації мембранної суміші ГОД-БСА

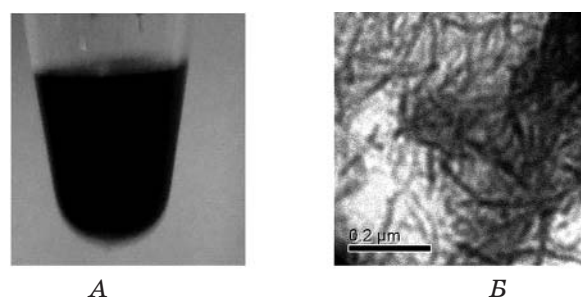


Рис. 2. Фотографії суспензії БШВНТ(NH₂) у ПВП: А — загальний вигляд суспензії через місяць після утворення; Б — розподіл БШВНТ(NH₂) у полімері ПВП (фото зроблено за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230 фірми JEOL, Японія)

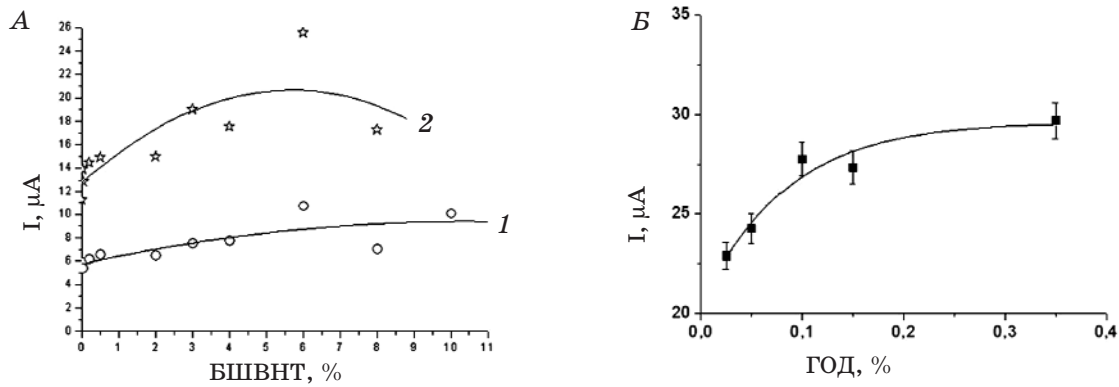


Рис. 3. Оптимізація складу мембрани біосенсора на основі мембрани ГОД-БСА-БШВНТ(NH_2):
 А — залежність величини відгуку біосенсора (0,5% ГОД) на внесення глюкози (крива 1 — 1 мМ, крива 2 — 3 мМ) від концентрації нанотрубок у мембрані;
 Б — залежність величини відгуку біосенсора [2% БШВНТ(NH_2)] на внесення глюкози (3 мМ) від концентрації ГОД у мембрані. Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за кімнатної температури та поданого потенціалу 0,8 В

і подальшої іммобілізації у випарах ГА на поверхні золотого електрода з метою створення біоматриці як системи зв'язаних елементів ГОД-БСА-БШВНТ(NH_2), в якій відбувається полегшене перенесення електронів, як описано раніше [8]. Показано, що концентрація БШВНТ у мембрані 1–2% є оптимальною (рис. 3, А). Підвищення концентрації БШВНТ вище 2% сприяло збільшенню величини амперометричного сигналу, але водночас значно зростали «шуми», що негативно впливало на точність результатів і підвищувало рівень мінімальної концентрації глюкози, яка може бути виміряна (табл. 1). Збільшення концентрації ГОД вище 0,3% неістотно впливає на величину сигналу біосенсора (рис. 3, Б).

На рис. 4 (А, крива 6) показано калібрувальну криву біосенсора на основі розробленої мембрани. У додатковому експерименті ми використовували як контроль карбоксильовані нанотрубки (Б, крива 2) і показали, що «зшивання» протеїну та амінованих нанотрубок за допомогою ГА (Б, крива 1) сприяє поліпшенню чутливості біосенсора (рис. 4, Б).

З метою полегшити перенесення електронів у мембрані біосенсорів традиційно застосовують електропровідні полімери як матрицю для включення ензиму [13] або додають медіатори, функцію яких може виконувати пероксидаза хрому [14]. Нами проведено порівняння характеристик біосенсорів, створених на основі золотих електродів

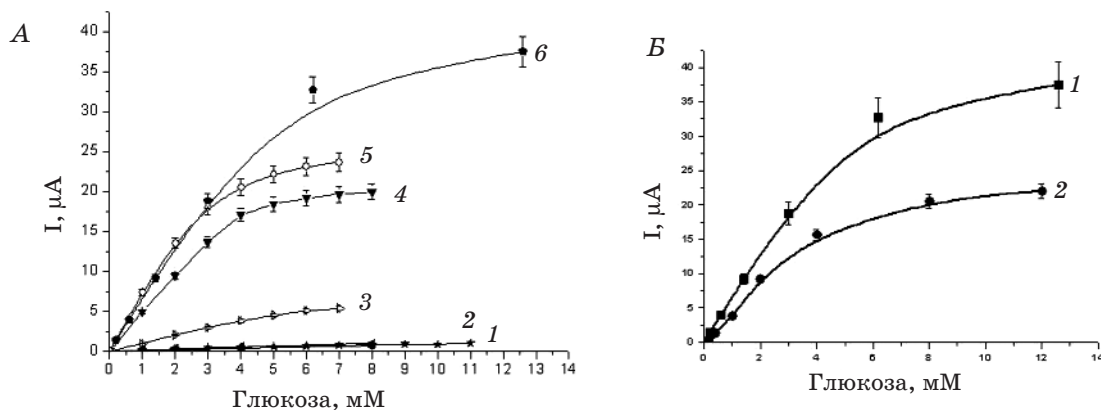


Рис. 4. А — калібрувальні криві біосенсорів для визначення концентрації глюкози, створених на основі золотих електродів, та ГОД, іммобілізованої різними методами:
 1 — електрод без мембрани; 2 — БСА; 3 — ГОД-ПЕДТ; 4 — ГОД-БСА; 5 — ГОД-ПО-БСА; 6 — ГОД-БСА-БШВНТ(NH_2);

Б — калібрувальні криві біосенсорів, створених на основі мембран:
 1 — ГОД (0,05%)-БШВНТ(NH_2) (2%)-БСА; 2 — ГОД (0,05%)-БШВНТ(COOH) (2%)-БСА.
 Вимірювання проводили за поданого потенціалу 0,8 В у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за кімнатної температури; ПО — пероксидаза хрому, ПЕДТ — поліетилендіокситіофен

та ГОД, іммобілізованої різними методами (див. розділ «Матеріали і методи») (рис. 5, А). Показано, що включення БШВНТ до ензимної матриці біосенсора (рис. 5, А, крива б) є найбільш ефективним підходом для підвищення його чутливості та розширення лінійного діапазону визначення глюкози. Дослідження стабільності розроблених біосенсорів також показали, що на відміну від біосенсора, створеного з матрицею ПЕДТ-ГОД, який втрачав 77% своєї вихідної активності впродовж 15 діб, стабільність біосенсорів на основі БШВНТ була значно кращою (табл. 1).

Водночас основні очікування від застосування нанотрубок пов'язані з можливістю ефективною роботи біосенсора за різних робочих потенціалів. Багато речовин у біологічних рідинах можуть легко окиснюватись чи відновлюватись за значень потенціалу, близьких до 0,8 В. Зниження потенціалу вимірювання аналіту може запобігати впливу інтерферуючих речовин та підвищувати точність аналізів.

Перевірено можливість визначення глюкози розробленими біосенсорами за низького

потенціалу. Показано, що включення БШВНТ до біосенсорної матриці ГОД є найбільш ефективним щодо зниження робочого потенціалу вимірювань (табл. 2).

Низку експериментів проведено з метою з'ясування впливу модифікації поверхні робочого електрода шаром нанотрубок (див. розділ «Матеріали і методи») на величину сигналу біосенсора.

На рис. 5 наведено калібрувальні криві біосенсорів з мембраною БСА-ГОД на основі золотих електродів (крива 3) та золотих електродів, модифікованих шаром БШВНТ (крива 4). Порівняння калібрувальних кривих показало, що шар нанотрубок, створений на електроді, не впливав на підвищення чутливості вимірювань, однак сприяв розширенню лінійного діапазону визначення концентрації глюкози у пробі, що свідчить про підвищення ефективної площі поверхні самого електрода. Водночас включення БШВНТ у склад ензимної мембрани підвищує величину сигналу біосенсора (криві 5, б), імовірно за рахунок збільшення ефективної площі поверхні іммобілізованого ензиму.

Табл. 1. Загальні характеристики розроблених біосенсорів на основі БШВНТ(NH₂)

Склад біоселективної мембрани	Чутливість, $\mu\text{A}/\text{mM}$	Мінімальна концентрація для визначення, mM	Лінійний діапазон, mM	Збереження активності під час зберігання, %	Збереження активності протягом 5 год безперервної роботи, %	Похибка вимірювань, %	Час стабілізації базової лінії, с	Час відгуку, с
ГОД (0,05%) БСА	4,8	0,05	0,05–3,00	90% після 35 діб	100	5	400	60
ГОД (0,05%) БШВНТ(NH ₂) (2%) БСА	6,6	0,05	0,05–6,00	88% після 35 діб	100	8	800	80
ГОД (0,05%) БШВНТ(NH ₂) (6%) БСА	7,0	0,50	0,5–8,0	–	100	10	1 500–2 000	100

Примітка. Вимірювання проводили за значення потенціалу 0,8 В.

Табл. 2. Порівняння аналітичних характеристик амперометричних біосенсорів для визначення глюкози на основі золотих електродів Drop Sens та іммобілізованої ГОД

Потенціал, В	Електрополімеризація ГОД		ГОД-БСА		ГОД-ПО-БСА		ГОД-БСА-БШВНТ	
	$\mu\text{A}/\text{mM}$	Лінійний діапазон, mM	$\mu\text{A}/\text{mM}$	Лінійний діапазон, mM	$\mu\text{A}/\text{mM}$	Лінійний діапазон, mM	$\mu\text{A}/\text{mM}$	Лінійний діапазон, mM
0,2 В	0	–	0,1	–	1,2	0,05–1,6	2,6	0,05–1,3
0,5 В	0,02	0,5–8,0	3,4	0,05–2,0	4,53	0,05–3,0	4,3	0,05–2,0
0,8 В	0,42	0,1–17,0	4,8	0,05–3,0	7,3	0,05–3,0	6,6	0,05–6,0

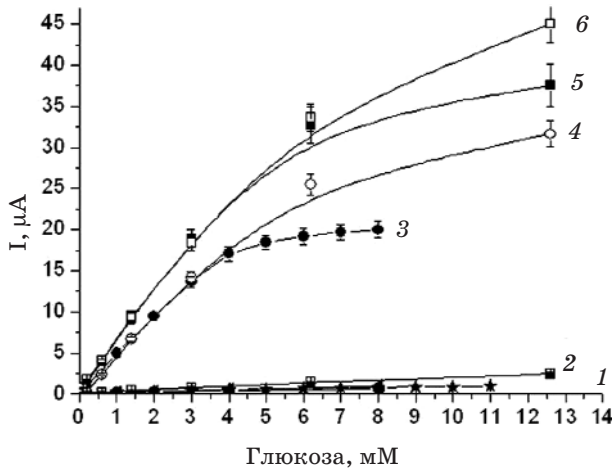


Рис. 5. Залежність величини амперометричного сигналу глікозних біосенсорів, модифікованих БШВНТ, різного дизайну:

- 1 — контрольний електрод;
- 2 — датчик із шаром БШВНТ(СООН);
- 3 — біосенсор на основі мембранної суміші ГОД-БСА без нанотрубок;
- 4 — електрод, модифікований шаром БШВНТ(СООН) з мембраною ГОД-БСА;
- 5 — біосенсор на основі мембранної суміші ГОД-БСА-БШВНТ(NH₂);
- 6 — електрод, модифікований шаром БШВНТ(СООН), з мембраною ГОД-БСА-БШВНТ(NH₂).

Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) за поданого потенціалу 0,8 В, при кімнатній температурі

Розроблений біосенсор з матрицею ГОД-БСА-БШВНТ(NH₂) було випробувано для визначення концентрації глюкози в зразках мікробіологічного середовища МЕМ Dulbecco, виробництва фірми Serva (Німеччина), у сироватці та плазмі крові, цільній крові й зразках марочного вина порівняно з традиційними методами. Оптимальні умови для роботи біосенсора (25 мМ фосфатний буфер, рН 7,0) було визначено раніше [8]. З'ясовано, що для проведення вимірювань у зразках мікробіологічного середовища, сироватці і плазмі крові та цільній крові потрібно застосовувати додаткові захисні мембрани, що є завданням нашої подальшої роботи.

Проведено аналізи вмісту глюкози в зразках вина різних сортів з використанням амперометричного біосенсора з матрицею ГОД-БСА-БШВНТ(NH₂). Результати вимірювань — порівняно з даними, отриманими за методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в умовах виробництва в Інституті винограду та вина «Магарач». Показана достовірність кореляція результатів (рис. 6).

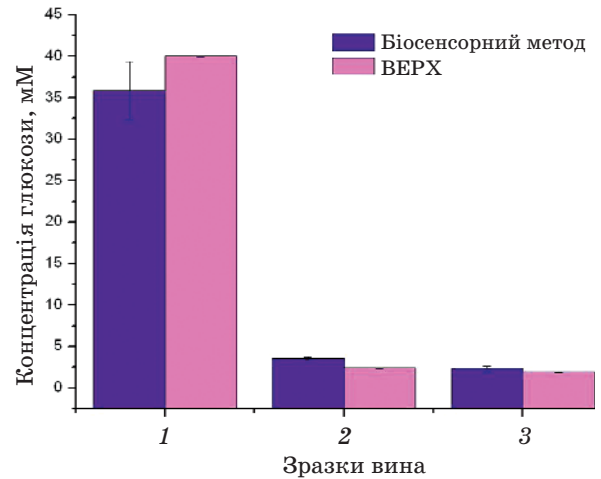
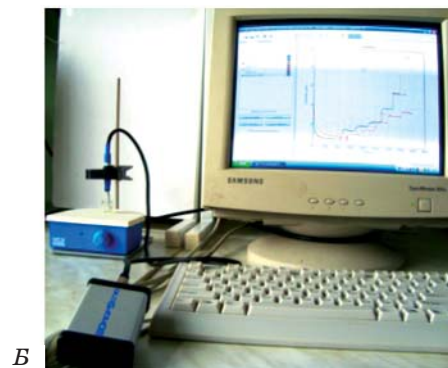
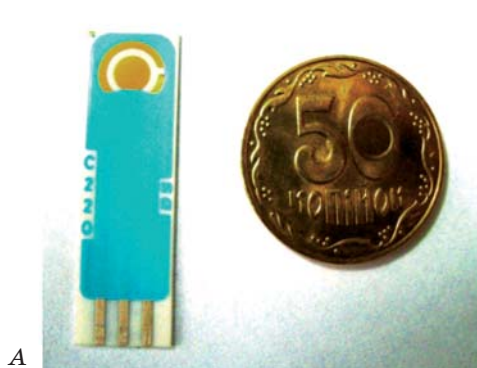


Рис. 6. Результати вимірювання глюкози у зразках марочного вина біосенсорним та хроматографічним методами (надані виробником):
1 — Мадера «Массандра»;
2 — Каберне «Голіцинські вина»;
3 — Фетяска «Голіцинські вина»

Таким чином, комерційні зразки амінованих [БШВНТ(NH₂)] та карбоксильованих [БШВНТ(СООН)] багатозарових нанотрубок досліджено відносно фазового складу вуглецевого наноматеріалу, типу функціональних груп на їхній поверхні та ступеня їх функціоналізації. Показано, що проаналізовані препарати є високоякісними продуктами, які містять як основну фазу багатозарові нанотрубки. Підібрано умови суспендування БШВНТ(NH₂) у ПВП та БШВНТ(СООН) у воді. Розроблені суспензії застосовано для модифікації поверхні золотих амперометричних електродів та іммобілізації ензиму. На основі триелектродних амперометричних перетворювачів С220АТ (Drop Sens) створено та досліджено лабораторні макети біосенсорів для визначення глюкози із застосуванням кількох стратегій іммобілізації ГОД (ковалентне зшивання ГОД з БШВНТ(NH₂) у гель БСА, електрополімерізація ГОД у матрицю електропровідного полімера, коіммобілізація ГОД з пероксидазою хрому). Встановлено, що БШВНТ у складі біосенсорів поліпшують аналітичні характеристики біосенсорів відповідно за рахунок виконання ними електропровідної та медіаторної функції, а також збільшення ефективної площі поверхні електродів. Оптимізований біосенсор на основі мембрани з БШВНТ(NH₂) та ГОД застосовано для визначення глюкози у вині. Показано добру кореляцію біосенсорного методу з методом високоефективної рідинної хроматографії.

Роботу виконано за фінансової підтримки ДЦНТ «Нанотехнології та наноматеріали» у рамках проекту № 5.20.1.13.



Загальний вигляд триелектродного амперометричного датчика C220AT («DropSens», Іспанія) (А) та експериментальної установки, зібраної на базі приладу μ Stat 200 («DropSens», Іспанія) (Б)

ЛІТЕРАТУРА

1. Agui L., Yanez-Sedeno, Pingarron J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review // *Anal. Chim. Acta.* — 2008. — V. 622. — P. 11–47.
2. Rivas G. A., Rubianes M. D., Rodriguez M. C. et al. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing // *Talanta.* — 2007. — V. 74. — P. 291–307.
3. Merkoci A., Pumera M., Llopis X. et al. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes // *Trends Anal. Chem.* — 2005. — V. 24, N 9. — P. 826–838.
4. Hierold C., Jungen A., Stampfer C., Helbling T. Nano electrochemical sensors based on carbon nanotubes // *Sens. Actuat. A.* — 2007. — V. 136. — P. 51–61.
5. Kerman K., Saito M., Yamamura S. et al. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications // *Trends Anal. Chem.* — 2008. — V. 27, N 7. — P. 585–592.
6. Qureshi A., Kang W. P., Davidson J. L., Gurbuz Y. Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications // *Diam. Relat. Mater.* — 2009. — V. 18. — P. 1401–1420.
7. Scida K., Stege P. W., Haby G. et al. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review // *Anal. Chim. Acta.* — 2011. — V. 691. — P. 6–17.
8. Biloivan O. A., Rogaleva N. S., Korpan Y. I. Optimization of bioselective membrane of amperometric enzyme sensor on basis of glucose oxidase using NH_2 -modified multi-walled carbon nanotubes // *Biopolymers and Cell.* — 2010. — V. 26, N 1. — P. 56–61.
9. Гарбуз В. В., Захаров В. В. Особенности образования и окисления углеродных наноструктурных материалов // *Нанострукт. материаловед.* — 2007. — № 1. — С. 74–83.
10. Garreau S., Louarn G., Buisson J. P. et al. In situ spectroelectrochemical raman Studies of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT) // *Macromolecules.* — 1999. — V. 32. — P. 6807–6812.
11. Khan M. A., Armes S. P. Synthesis and characterization of micrometer-sized, poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated polystyrene latexes // *Langmuir.* — 1999. — V. 15. — P. 3469–3475.
12. Канюков В. Н., Стрекаловская А. Д., Килькинов В. И., Базарова Н. В. *Материалы для современной медицины: Уч. пособие.* — Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. — 113 с.
13. Malhotra B. D., Chaubey A., Singh S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors // *Anal. Chim. Acta.* — 2006. — N 578. — P. 59–74.
14. Преснова Г. В., Рубцова М. Ю., Егоров А. М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева).* — 2008. — Т. LII, № 2. — С. 60–65.

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР,
МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МНОГОСТЕНОЧНЫМИ
УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ,
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ**

*Н. С. Рогалева¹, Л. В. Шкотова¹, О. В. Львова²,
В. В. Гарбуз³, В. Б. Муратов³, Т. И. Дуда⁴,
А. А. Васильев⁴, Я. И. Корпан¹, О. А. Белоиван¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко

³Институт проблем материаловедения им.
И. Н. Францевича НАН Украины, Киев

⁴Национальный технический университет
Украины «Киевский политехнический институт»

E-mail: olga_beloivan@mail.ru

С целью улучшения аналитических характеристик амперометрических биосенсоров для определения глюкозы использованы многостеночные углеродные нанотрубки. Аттестованные образцы аминированных и карбоксилированных многостеночных углеродных нанотрубок суспендированы и использованы для модификации амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованной глюкозооксидазы и амперометрических преобразователей C220AT (Drop Sens, Испания). Биоселективную мембрану на основе глюкозооксидазы формировали на поверхности рабочих электродов несколькими методами: ковалентным связыванием и коиммобилизаций с пероксидазой хрена в гель бычьего сывороточного альбумина в парах глутарового альдегида, электрополимеризацией в пленку токопроводящего полимера полиэтилендиокситиофена. Электрохимические измерения выполняли при помощи прибора μ Stat 200 (Drop Sens, Испания). Установлено, что биосенсоры с биоселективной мембраной на основе многостеночных углеродных нанотрубок, имеют преимущества по сравнению с биосенсорами без углеродных нанотрубок в чувствительности, возможности определения глюкозы при низком рабочем потенциале и в более широком диапазоне определения концентраций аналита. Оптимизированный биосенсор на основе мембраны с многостеночными углеродными нанотрубками и глюкозооксидазы использован для определения концентрации глюкозы в вине. Показана достоверная корреляция результатов биосенсорного метода с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: многостеночные углеродные нанотрубки, амперометрический биосенсор, глюкоза, глюкозооксидаза, нанокomпозитные мембраны.

**AMPEROMETRIC BIOSENSOR MODIFIED
WITH MULTIWALLED CARBON
NANOTUBES FOR GLUCOSE
DETERMINATION**

*N. S. Rogaleva¹, L. V. Shkotova¹, O. V. L'vova²,
V. V. Garbuz³, V. B. Muratov³, T. I. Duda⁴,
O. O. Vasil'ev⁴, Ya. I. Korpan¹, O. A. Beloivan¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

³Frantsevich Institute for Problems of Materials
Science, Kyiv

⁴National Technical University of Ukraine
«Kyiv Polytechnic Institute»

E-mail: olga_beloivan@mail.ru

To improve analytical characteristics of amperometric biosensors for glucose determination, aminated and carboxylated multiwalled carbon nanotubes were applied. Attested samples of nanotubes were suspended and used for modification of amperometric transducers C220AT of DropSens production and bio-selective membranes. The glucose oxidase membranes were formed on the surface of working electrode by several methods: covalent crosslinking and co-immobilization with horseradish peroxidase in bovine serum albumin gel in glutaraldehyde vapors; electropolymerization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) in the conductive polymer film. Electrochemical measurements were performed using the device μ Stat 200 of DropSens production. The developed amperometric biosensors with a membrane with carbon nanotubes have been shown to be advantageous as compared to those without carbon nanotubes in terms of higher sensitivity, lower working potential, and wider dynamic range of the target analyte detection. The optimized biosensor was used for detection of glucose in real wine samples. A reliable correlation was observed between the results of biosensor method proposed and those obtained by high performance liquid chromatography.

Key words: multiwalled carbon nanotube, amperometric biosensor, glucose, glucose oxidase, nanocomposite membranes.