

## АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ ГЛЮКОЗНИЙ СЕНСОР НА ПОЛІЛЮМІНОЛЬНІЙ ПЛАТФОРМІ

Досліджено хімічне (з використанням  $\text{KIO}_3$  і  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) та електрохімічне окиснення люмінолу на платиновому електроді. Імобілізація глюкозооксидази (GOx) на поверхні електрода, модифікованого електропровідним полімером, дозволяє застосувати одержаний ферментний електрод як амперометричний глюкозний сенсор. Даний ферментний електрод був протестований на вміст глюкози в аналіті в інтервалі концентрацій 0.2—100 мМ при рН 7.4. Лінійність залежності струм насичення—концентрація глюкози спостерігається на ділянці 0—10 ммоль/л глюкози, що свідчить про високу чутливість амперометричного сенсора до мінімальних кількостей глюкози в пробі.

Пізнання суті функціонування живих організмів можливе на молекулярному рівні і успіхи пізнання таємниці живого безпосередньо пов'язані з умінням маніпулювати окремими молекулами. Тому розробка методів аналітичного визначення ультра-малих кількостей біологічно активних речовин є однією з вузлових передумов прогресу в молекулярній біології. Біосенсорні системи, в яких біологічні структури (ензим, клітини, тканини, антитіла) іммобілізовані на поверхні перетворювача сигналів — трансдюцера, є типовим прикладом цього. Серед численних стратегій закріплення біологічно активних частинок на поверхні твердого тіла найбільш широко використовуються високомолекулярні речовини, нанесені на поверхню метала або напівпровідника у вигляді тонкої плівки. Використання полімерних платформ вирішує проблему сумісності, а у випадку електропровідних полімерів, макромолекули яких являють своєрідне продовження поверхні електронного провідника, досягається кращий контакт біологічних компонентів з трансдюцером [1]. Перевага цієї стратегії ще полягає також в тому, що індуковані частинками субстрату в аналізі фізико-хімічні зміни біологічно активного компонента можна зафіксувати у простий спосіб, наприклад вимірювати зміни величини струму, як це робиться у випадку амперометричних сенсорів [2]. Біосенсорні платформи з електропровідних полімерів найкраще створювати шляхом електрохімічної полімеризації піролу [3], аніліну [4], пара-хлорфеніламіну [5], N,N-диметиланіліну [6], метилен зеленого [7], люмінолу [8]. В роботі [8] були досліджені умови електрохімічного синтезу полілюмінолу і методом циклічної вольтамперометрії та електрохімічного кварцевого мікробалансу був вивчений процес формування полілюмінольної плівки *in situ*. Однак внаслідок мізерних кіль-

костей утвореного на поверхні електрода полілюмінолу його неможливо було виділити і через це структура продукту поліконденсації люмінолу залишилась нез'ясованою.

Нами був розроблений метод синтезу полілюмінолу шляхом окиснення люмінолу  $\text{KIO}_3$  і  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  у змішаних водно-диметилформамідних (ДМФА), диметилсульфоксидних (ДМСО) і N-метил-2-піролідонінових (NM-2-П) сумішах. Одержані продукти ідентифікувались ІЧ-спектрами, елементним аналізом. У роботі здійснено також електрохімічний синтез полілюмінолу на поверхні платинового електрода при багатократній розгортці потенціалу і створенні ензимного електрода шляхом іммобілізації глюкозооксидази. Ензимний електрод забезпечував добрий амперометричний відклик у присутності глюкози, що давало можливість її кількісного визначення в аналіті.

Люмінол, NM-2-П, ДМСО, ДМФА, глюкозооксидаза і глутаровий альдегід використовували марки ALDRICH без подальшої очистки.  $\text{KIO}_3$  і  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  були марки ч.д.а. В роботі використовували глюкозооксидазу (ГОД) — фермент із *Penicilium Vitale* з активністю 85 од/мг, препарат виробництва КНПО Діагностикум (Львів), глюкозу і 50 %-й водний розчин глутарового альдегіду (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l, Франція). В ролі робочого фосфатного буферу використовували  $(\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O})$  із рН 7.4.

Хімічний синтез полілюмінолу здійснювали окисненням люмінолу  $\text{KIO}_3$  і  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  у водно-органічних сумішах (1:9). Задану наважку люмінолу розчиняли в органічному розчиннику, а окислювача — у воді. Розчини зливали і залишали стояти протягом доби при температурі 20 °С. Утворений осад полілюмінолу відфільтровували, промивали багатократно водою і сушили у вакуумній сушильній шафі протя-

гом доби при температурі 50 °С. ІЧ-спектри одержували на спектрофотометрі Bruker IFS 66. Елементний аналіз здійснювали з допомогою елементного аналізатора ПФ 1108 (Carlo Erbo, Італія). Циклічні вольтамперограми одержували з використанням електрохемілюмінесцентного аналізатора, який був комутований з персональним комп'ютером (виробництво Фізико-механічного інституту НАН України, Харків).

Ензимний електрод виготовляли шляхом адсорбції на поверхні Pt-електрода, модифікованого електропровідним полімером (ЕПП). Адсорбцію проводили з буферних водних розчинів протейнових молекул фермента, які іммобілізували на поверхні макромолекулярного шару ЕПП з допомогою парів глутарового альдегіду [12]. Для запобігання дифузії адсорбованих ферментних протейнів у розчин на поверхню сформованого електрода накладали полікарбонатну плівку певної пористості, яка є проникною для молекул субстрата і низькомолекулярних продуктів реакції (виробництво Sigma-Aldrich.com, D9777, Lot2140628).

Раніше виявлена нами аналогія між електро- і хімічною поліконденсацією аніліна була поширена на окиснення люмінолу [9]. Переваги електрохімічного окиснення полягають у легкому регулюванні потенціалу окиснення, але тут одержуються незначні кількості продукту окиснення внаслідок малих фарадеївських струмів. На рис. 1 приведені циклічні вольтамперограми платинового електрода в розчині, що містив люмінол при розгортці потенціалу від 0 до 1.3 В.

На циклічній вольтамперограмі спостері-

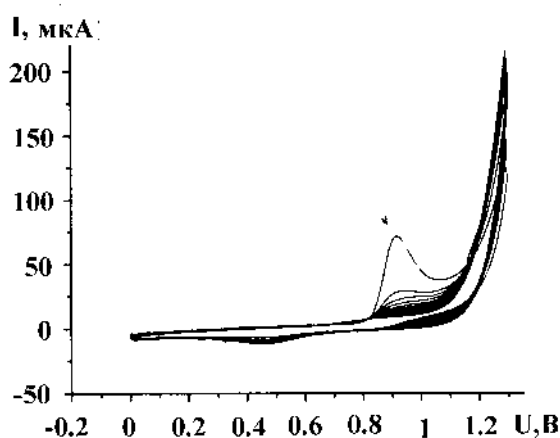


Рис. 1. ЦВА 0.01 М розчину люмінолу. Швидкість розгортки потенціала 50 мВ/с.

Т а б л и ц я 1

Залежність виходу люмінолу від природи і кількості компонентів у змішаних водно-органічних розчинах (співвідношення вода : органічний компонент = 1:9;  $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\tau = 24$  год)

Розчинник	Концентрація, моль/л		Вихід полілюмінолу, %
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		
N-метилпіролідон	0.22	0.11	26.5
ДМФА	0.22	0.11	26.9
ДМСО	0.22	0.11	26.9
	0.22	0.22	27.5
	0.22	0.33	27.8
	0.44	0.22	41.6
	0.55	0.22	42.5
	KIO <sub>3</sub>		
ДМСО	0.22	0.11	5.7

гається максимум струму при 0.92—1.04 В, який, очевидно, відноситься до окиснення люмінолу за місцем аміногрупи, оскільки потенціал окиснення аніліну дорівнює 1.13 В [10]. Кожне наступне сканування потенціалу приводить до депресії струмів окиснення внаслідок екранування поверхні електрода шаром утвореного на його поверхні нерозчиненого продукту. З електрохімічних вимірювань можна дійти висновку, що при низьких значеннях електродного потенціалу люмінол зазнає окиснення за місцем фталімідних груп, а при високих — за місцем аміногрупи. Тому для хімічного синтезу ми вибрали два окисники (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> із стандартним значенням редокс-потенціалу 2.05 В і KIO<sub>3</sub>, стандартний потенціал якого в два рази менший (1.085 В) [11]. Очевидно, що редокс-потенціал KIO<sub>3</sub> недостатній для окиснення люмінолу за місцем аміногрупи. Внаслідок малої розчинності неорганічних окисників в органічних розчинниках у співвідношенні 1:9, в яких досить добре розчинний люмінол, довелося використовувати змішані водно-органічні розчинники, в яких органічним компонентом був ДМСО, ДМФА і NM-2P. Якщо розчинність люмінолу у воді становить  $8.4 \cdot 10^{-4}$  моль/л, то у змішаному диметилсульфоксид-водному можна досягнути концентрації люмінолу 0.55 моль/л. Вихід

продукту поліконденсації люмінолу не залежить від природи розчинника, а визначається співвідношенням мономер : розчинник (табл. 1).

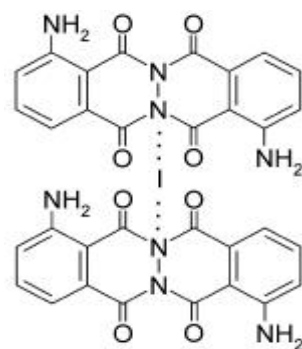
Найнижчий вихід поліконденсату спостерігався у випадку  $\text{KIO}_3$ . Слід зазначити, що колір кінцевого продукту залежить від природи окислювача. У випадку  $\text{KIO}_3$  утворювався продукт чорного кольору, тоді як при використанні  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  полімер був темно-зеленого кольору, подібний за виглядом до поліаніліну. Співставлення ІЧ-спектрів вихідного люмінолу і продуктів окислювальної конденсації в присутності  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  і  $\text{KIO}_3$  при інших ідентичних умовах дало підстави вважати, що процес окиснення протікає по-різному в залежності від природи окиснювача. Наслідком цього є відмінності у структурі продуктів окиснення, що витікає із ІЧ-спектроскопічних досліджень (ІЧ-спектри тут не приводяться). Продукти, що одержані при окисненні  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , мало відрізняються за структурою від вихідного люмінолу, тоді як у випадку  $\text{KIO}_3$  вони докорінно відмінні. Дані елементного аналізу також суттєво відмінні для продукту конденсації в присутності  $\text{KIO}_3$  (табл. 2).

Редокс-потенціал  $\text{KIO}_3$  недостатній для окиснення люмінолу за місцем аміногрупи і тут можуть зазнавати окиснення імідні групи атома азоту. Внаслідок окиснення утворюються поряд з іншими продуктами і атоми йоду, які є ефективними комплексоутворювачами. Структуру продукту окиснення можна зобразити у вигляді двох зв'язаних через місток йоду димерних ланок (схема (1)).

Розрахунок складу на основі цієї структури дав наступні результати: С 49.7409 %; N 4.5077; H 2.8497; O 16.5803 і I 16.3212 %, які виявилися близькими до експериментально знайдених

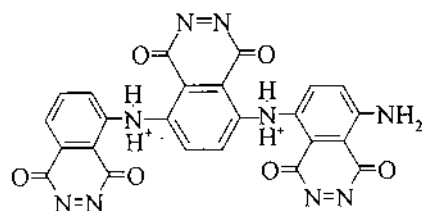
Т а б л и ц я 2  
Дані елементного аналізу

Сполука	С	Н	Н	О
	Знайдено, %			
Люмінол	54.2354	3.9385	23.6088	
	Розраховано, %			
Люмінол	54.2372	3.9648	23.7342	18.0791
Полілюмінол $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	54.2454	3.8816	23.6648	
Полілюмінол $\text{KIO}_3$	47.3914	3.0773	18.3376	



(1)

(табл. 2). Окиснення люмінолу  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  відбувається за місцем аміногрупи люмінолу, і структура утвореного поліконденсату містить мономерні ланки, які майже не відрізняються від структури вихідного люмінолу. На користь цього свідчать дані елементного аналізу, а



(2)

також ІЧ- і КР-спектри продуктів окиснення. Для цього випадку структура конденсату може бути зображена наступним чином:

Структура, що подібна до цієї, була запропонована авторами для продукту електрохімічного окиснення люмінолу [8]. Внаслідок наявності в ній гідрофільних і гідрофобних ділянок, а також заряджених центрів вона виявилася доброю матрицею для інкорпорації в ній частинок ферменту.

Попередніми дослідженнями було встановлено, що адсорбована на поверхні Pt глюкозооксидаза не впливає на форму циклічної вольтамперограми, як це можна бачити з рис. 2, а. В присутності глюкози спостерігається незначний максимум струму при  $E=0.6$  В, який повільно зростає із збільшенням числа циклів (рис. 2, б).

Даний ферментний електрод був протестований на вміст глюкози в аналіті в інтервалі концентрацій від 0.2 до 100 мМ при рН 7.4. При цьому фіксувалася сила струму при нав'язаному потенціалі +0.6 В відносно насиченого хлорсрібного електрода при рН 7.4. Фіксувалося стаціонарне значення струму, яке встановлювалось через 15—30 хв. До вмісту глюкози 10.0

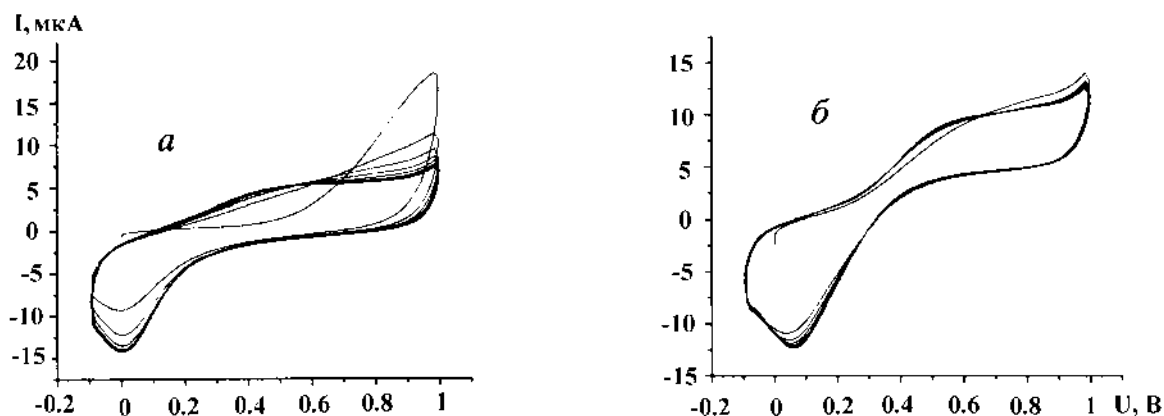


Рис. 2. ЦВА: *a* — фосфатний буфер, рН 7.4 на Pt-електроді з глюкозооксидазою, *б* — фосфатний буфер, рН 7.4 + 10 мМ глюкози. Швидкість розгортки потенціала 50 мВ/с.

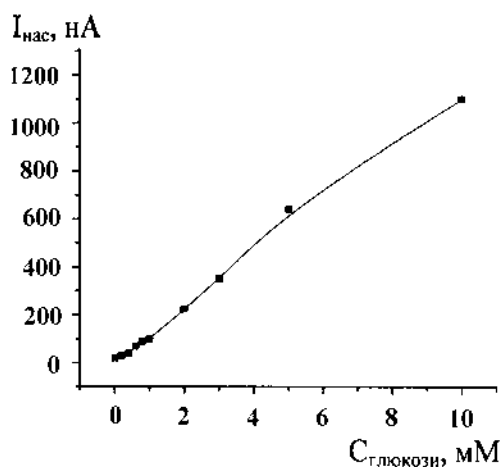


Рис. 3. Калібрувальна крива для відклику глюкозооксидазного сенсора в присутності різних кількостей глюкози при рН 7.4. Прикладений потенціал 0.6 В.

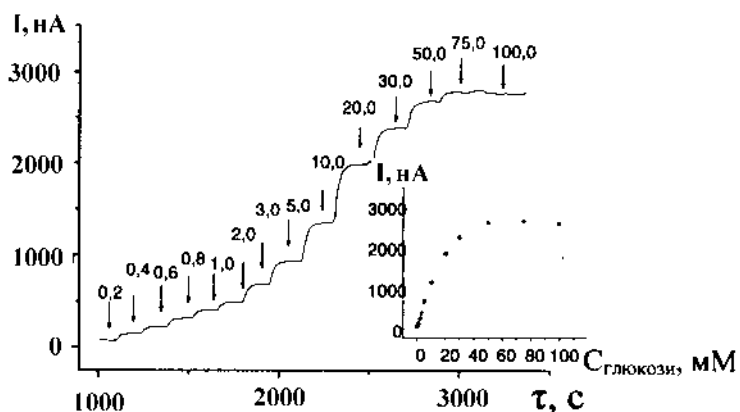


Рис. 4. Амперометричний відклик глюкозного сенсора в перемішуваному фосфатному буферному розчині, рН 7.4.

ммоль/л спостерігалась лінійна залежність струму відклику від кількості доданої глюкози. Подальше збільшення кількості глюкози в аналіті приводить до порушення лінійної залежності (рис. 3).

Наступна видозміна роботи сконструйованого амперометричного глюкозного сенсора полягала в тому, що у фосфатний буферний розчин послідовно вводили все більші кількості глюкози при постійному перемішуванні розчину і фіксації струму відклику (рис. 4).

Величина струму відклику визначається швидкістю ферментативного окиснення глюкози, внаслідок якого вивільняється пероксид водню. Експериментально фіксуються струми окиснення  $H_2O_2$ , величина якого пропорційна кількості глюкози в аналіті. Лінійність залежності струму насичення—концентрація глюкози спостерігається на ділянці 0—10 ммоль/л глюкози, що свідчить про високу чутливість амперометричного сенсора до мінімальних кількостей глюкози в пробі.

Отже, модифікований поліімінолом платиновий електрод придатний як платформа для іммобілізації глюкозооксидази з допомогою глутарового альдегіду і захистом полікарбонатною мембраною. Зазначимо, що моніторинг глюкози в крові людини вкрай важливий при захворюванні на цукровий діабет, про що свідчить поява нещодавнім часом огляду [13]. Використовувана в роботі процедура виготовлення ензимного електрода виявилась

оптимальною, оскільки іммобілізація ензиму шляхом адсорбції або сумісної з ензимом електрохімічної конденсації люмінолу не дали позитивних результатів.

**РЕЗЮМЕ.** Осуществлен синтез химического (с использованием  $\text{KIO}_3$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), а также электрохимического окисления люминола на платиновом электроде. Иммобилизация глюкозооксидазы (GOx) на поверхности электрода, модифицированного электропроводным полимером, позволяет применять полученный ферментный электрод как амперометрический глюкозный сенсор. Данный ферментный электрод был протестирован на содержание глюкозы в анализе в интервале концентраций 0.2—100 мМ при pH 7.4. Линейность зависимости ток насыщения—концентрация глюкозы наблюдается на участке 0—10 ммоль/л глюкозы, что свидетельствует о высокой чувствительности амперометрического сенсора к минимальным количествам глюкозы в пробе.

**SUMMARY.** The chemical oxidation of luminol by  $\text{KIO}_3$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  and electrochemical luminol oxidation on the platinum electrode was studied. Immobilization of glucose oxidase on the electrode surface was made. The electrode as amperometric glucose sensor was used. In this conditions this electrode could be detected in the range 0.2—100 mmol/l (pH 7.4). The linear range current saturation—concentration was obtained 0—10

mmol/l. The sensor is highly sensitivity for the detection of some analytes.

1. *Cosnier S.* // *Biosensors and Bioelectronics.* -1999. -**14.** -P. 443—456.
2. *Albery W.J., Banlett P.N., Cnaston D.M.* // *J. Electroanal. Chem.* -1985. -**194.** -P. 223—228.
3. *Ramanathan K., Kam M.K., Verghese M.M., Malhotre B.D.* // *J. Appl. Polym.* -1996. -**60.** -P. 2304—2316.
4. *Chanbey A., Paude K.K., Singh V.S., Malhotre B.D.* // *Anal Chim. Acta.* -2000. -**400.** -P. 97—10.
5. *Jing-Juan Xu., Zhi-Hao Yu., Hong-Yuan Chen.* // *Anal. Chim. Acta.* -2002. -**463.** -P. 239—247.
6. *Roy P.R., Okajima T., Ohsaka T.* // *J. Electroanal. Chem.* -2004. -**561.** -P. 75—82.
7. *Yang R., Ruan C., Deng J.* // *J. Appl. Electrochem.* -1998. -**28.** -P. 1269—1275.
8. *Chen Eh-M., Lin K-Ch.* // *J. Electroanal. Chem.* -2002. -**523.** -P. 93—105.
9. *Koval'chuk E. P., Whittingham M.S, Skolozdra O.M, et al.* // *Mater. Chem. Phys.* -2001. -**69.** -P. 154—162.
10. *Malinauskas A, Holze R.* // *J. Electroanal. Chem.* -1999. -**461.** -P. 184—193.
11. *Некрасов Б.В.* Основы общей химии. -М.: Высш. шк., 1967. -Т. 2.
12. *Шкотова Л.В., Солдаткин А.П., Дзядевич С.В.* // *Укр. биохим. журн.* -2004. -**76,** № 3. -С. 114—121.
13. *Ross S.A., Gulve E.A., Wang M.* // *Chem. Rev.* -2004. -**104.** -P. 125—128.

Львівський національний університет ім. Івана Франка

Надійшла 22.11.2004

УДК 541.13

**Н.А. Бербец, В.В. Нечипорук**

## **УСТОЙЧИВОСТЬ ЭЛЕКТРОДНЫХ ПРОЦЕССОВ С КИНЕТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ**

Исследована устойчивость стационарных состояний достаточно широкого класса электродных процессов, в которых могут иметь место кинетические и каталитические токи. Показано, что в зависимости от соотношения кинетических констант процесса реализуется различный тип устойчивости этих состояний. Это дает возможность качественно предсказать ход потенциостатических кривых, наступление колебательного режима и в этой связи произвести суждение о предполагаемой схеме и природе лимитирующих стадий того или иного электродного процесса, используя данные эксперимента.

Метод первого приближения является наиболее распространенным в исследовании устойчивости движения. Между тем в некоторых, так называемых критических, случаях, когда характер устойчивости определяется нелинейными членами, этот метод может отказать. Однако именно такие ситуации представляют особый интерес, как в химической, так и в электрохимической кинетике. В частности, в электрохимической системе с наличием сопутствующих химиче-

ских превращений по той или иной причине может установиться стационарное значение тока. Под воздействием флуктуаций, которые существуют всегда в любой системе, стационарное состояние может оказаться устойчивым либо неустойчивым, обуславливая соответствующее значение электрического тока. Как оказалось при исследовании, устойчивость стационарного состояния зависит от природы скоростьопределяющих стадий, соотношения

© Н.А. Бербец, В.В. Нечипорук, 2005