

Є.П. Ковальчук, Я.С. Ковалишин, І.В. Кекіс, Р.В. Лагоцька

## АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ УРЕАЗНИЙ БІОСЕНСОР

Електрохімічним окисненням еквімолекулярних сумішей аніліну та орто-сульфоаніліну на платиновому електроді синтезовані багат шарові полімерні матриці для вклинення ензиму уреазу. Створений ферментний електрод тестований на вміст карбаміду в аналіті в інтервалі концентрацій 0.2—20 мМ при рН 7.4. Чутливість амперометричного уреазного сенсора зростає з 7 до 70 нА/ммоль в присутності зшиваючого агента — глутарового альдегіду.

Моніторинг рівня карбаміду в крові та фізіологічних виділеннях — важливий чинник у діагностуванні хвороби нирок. Якщо рівень сечовини у здорової людини є в межах 2.3—8.3 ммоль/л, то у крові нирково хворих він сягає 25—42 ммоль/л [1]. Аналіз на вміст сечовини важливий також в агрохімії, у визначенні якості питної і рівня забрудненості морської води [2]. Подібні аналізи найчастіше здійснюють біосенсорними пристроями, активний шар яких містив уреазу. Ензим уреазу ефективно каталізує гідроліз сечовини згідно з рівнянням:



Принцип визначення сечовини полягає у фіксації величини сигналу перетворювача під впливом продуктів каталітичного розкладу сечовини — амонійних чи гідрокарбонатних іонів. З цією метою використовують потенціометричне детектування [3—5], вимірювання зміни імпедансу [6], частоти кварцмікробалансового електрода [7], електропровідності [8], величини струмового відклику [9].

Ключовою проблемою створення біосенсорної електрохімічної системи є нанесення чутливого шару на поверхню електрохімічного перетворювача. Оскільки безпосередній контакт ензиму з поверхнею приводить до втрати каталітичної активності, то необхідно вживати запобігливих заходів, які б попереджували денатурацію. З цією метою на поверхню електрода наносять органічну матрицю, в яку потім вклинають біоактивний компонент. В якості матеріалу матриці-платформи використовують нанопористі алюміній-оксидні мембрани [10], поліакриламідний гель [11], багат шарові структури йонізованих полімерів (полідиметил-діаліл хлорид амонію, полісульфостирен) [12]. Особливо корисними в цьому плані виявились електропровідні полімери, завдяки простоті синтезу і легкості переробки [13]. Уреаза була успішно інкорпорована в поліанілін-бутил-метакрилатну електропровідну матрицю [14], ком-

позитну поліанілін-нафіонову плівку [15], пористий діоксид кремнію, модифікований полі(3-метил тіофеном) [16].

Не дивлячись на великий обсяг досліджень з використанням найновіших методів, багато питань стосовно синтезу електропровідних полімерів взагалі і ПАН зокрема, їх мікроструктури, формування надмолекулярних утворень, фізико-хімічних властивостей полімеризатів, залишилися нез'ясованими.

Метою даної роботи був електрохімічний синтез поліаніліну та співполімеру з анілін-2-сульфоною кислотою на поверхні платинового електрода в потенціодинамічному режимі електролізу для створення ензимного електрода шляхом іммобілізації уреазу адсорбційним методом та прищепленням парами глутарового альдегіду. Ензимний електрод забезпечував добрий амперометричний відклик у присутності карбаміду, що давало можливість його кількісного визначення в аналіті.

Анілін, анілін-2-сульфоновою кислотою, уреазу (Ur) — фермент із Jack Beans з активністю 54 од/мг, карбамід і 50 %-й водний розчин глутарового альдегіду (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l, Франція) використовували марки ALDRICH без подальшої очистки.

Циклічні вольтамперограми одержували з використанням електрохемілюмінесцентного аналізатора, який був комутований з персональним комп'ютером (виробництво Фізико-технічного інституту НАН України, Харків).

Ензимний електрод виготовляли шляхом адсорбції уреазу на поверхні Pt-електрода, модифікованого електрохімічно осадженим полімером. Для запобігання дифузії уреазу в розчин на поверхню сформованого електрода накладалась нанопориста полікарбонатна плівка (виробництво Sigma-Aldrich.com, D9777, Lot2140628), що була проникною для частинок аналіту і низькомолекулярних продуктів реакції.

На рис. 1 приведені циклічні вольтамперограми платинового електрода в розчині, що містив ані-

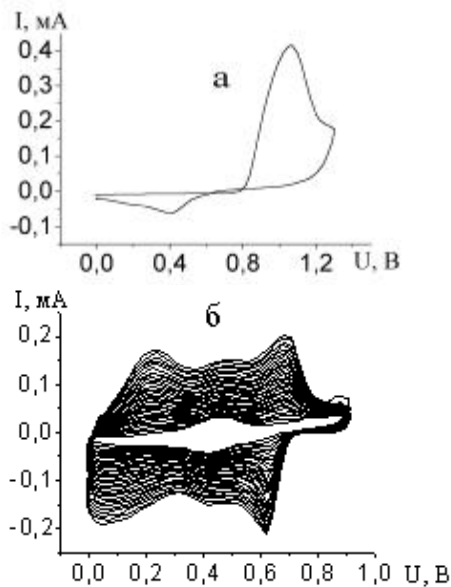


Рис. 1. Циклічна вольтамперограма окиснення 0.1 М розчину аніліну в 0.1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : *a* — перший цикл; *б* — 2–20 цикли. Швидкість розгортки 50 мВ/с.

лін при розгортці потенціалу від 0 до 1.3 В (перший цикл) і від 0 до 0.9 В — при наступних циклах сканування.

На першому циклі сканування спостерігається чіткий максимум струму окиснення аніліну по місцю аміногрупи (1.02–1.1 В), що відповідає утворенню катіон-радикала, наступні хімічні перетворення якого приводять до утворення поліаніліну і його осадження на поверхні електрода [17]. В наступних циклах сканування потенціалу струм витрачається на окиснення поліаніліну, що утворився в попередніх циклах розгортки потенціалу, і на полімеризацію нових порцій аніліну за запропонованим раніше механізмом [18].

ЦВА для співполімеру мають дещо відмінний характер. Тут струми окиснення з кожним наступним скануванням зменшуються (рис. 2). Очевид-

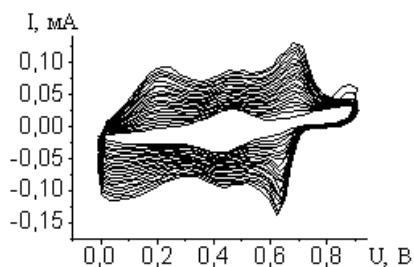


Рис. 2. Циклічна вольтамперограма окиснення співполімеру анілін : анілінсульфонова кислота = 1:1. Швидкість розгортки 50 мВ/с.

но, депресія струмів окиснення зумовлена блокуванням поверхні електрода менш електропровідним за поліанілін співполімерним продуктом.

Попередніми дослідями було встановлено, що адсорбована на поверхні Pt уреаза не впливає на форму циклічної вольтамперограми. Ферментний електрод на поліаніліновій матриці був протестований на вміст карбаміду в аналіті в інтервалі концентрацій від 0 до 20 мМ при рН 7.4. При цьому фіксувалась сила струму при нав'язаному потенціалі +0.2 В відносно насиченого хлорсрібного електрода у фосфатному буферному розчині (рН 7.4). Стаціонарне значення струму встановлювалось через 10–15 хв. До вмісту карбаміду 2 ммоль/л спостерігалась лінійна залежність струму відклику від кількості доданого карбаміду. Подальше збільшення кількості субстрату в аналіті приводить до виходу кривої на плато (рис. 3, *a*). Ферментний електрод на співполімерній платформі характеризується дещо меншим струмом відклику у присутності карбаміду у тому самому часовому інтервалі виходу на стаціонарний струм (рис. 3, *б*).

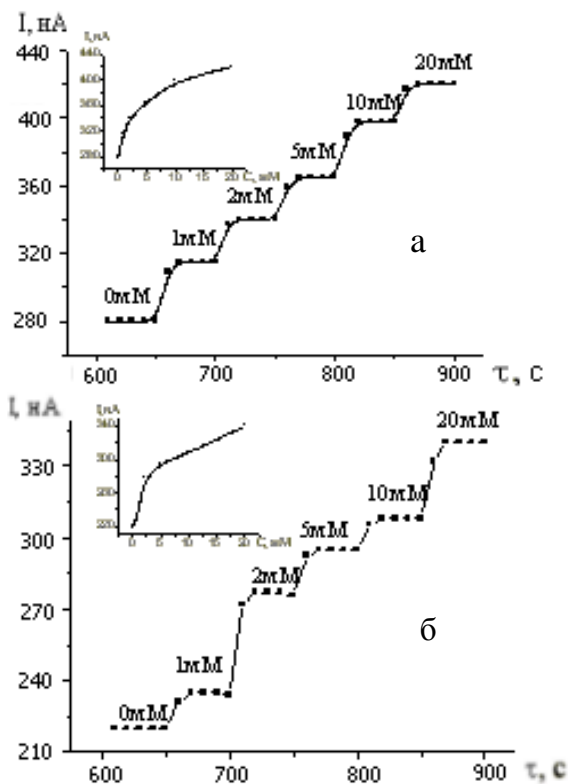


Рис. 3. Амперометричний відклик електрохімічної чарунки на додані кількості карбаміду. Pt-електрод модифікований поліаніліном (*a*) і співполімером (*б*) у присутності Уг; вимірювання у 50 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7.4; графік на вставці — калібрувальна крива для визначення карбаміду.

Наступна видозміна роботи полягала у конструюванні карбамідного сенсора з допомогою парів глутарового альдегіду. Результати наведені на рис. 4.

Подібна залежність струмового відклику одержана для модифікованого поліаніліном уреазного електрода, але струми відклику були дещо меншими.

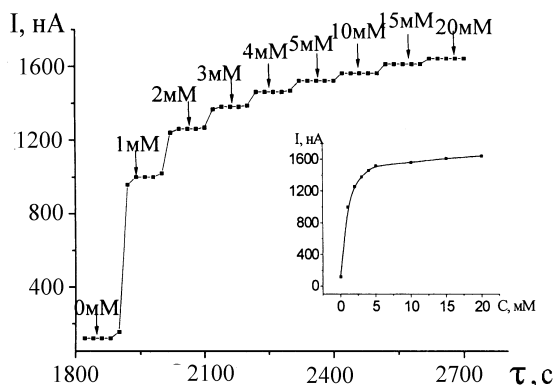


Рис. 4. Амперометричний відклик електрохімічної чарунки на додані кількості карбаміду. Pt-електрод модифікований глутаровим альдегідом; вимірювання у 50 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7.4; графік на вставці — калібрувальна крива для визначення карбаміду.

Величина струму відклику визначається швидкістю ферментативного окиснення. Лінійність залежності струм насичення—концентрація карбаміду спостерігається на ділянці 0—5 ммоль/л субстрату, що свідчить про високу чутливість амперометричного сенсора до мінімальних кількостей карбаміду в пробі.

Відгук сенсора контролюється швидкістю ензимної реакції, коли вона менша за швидкість дифузії. І, навпаки, якщо швидкість взаємодії між частинками субстрата і ензимом є високою, то загальна швидкість процесу визначається швидкістю дифузії. Швидкість реакції в кінетичному режимі виражається співвідношенням

$$I_S = \frac{I_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (2)$$

де  $I_S$  — швидкість ензимної реакції при концентрації субстрата  $[S]$ ;  $I_{\max}$  — максимальна швидкість ензимної реакції;  $K_M$  — константа Міхаеліса. Рівняння (2) є електрохімічним еквівалентом класичного рівняння Міхаеліса–Ментен. Розрахована константа Міхаеліса для даного біосенсора коливається в межах від  $0.4 \pm 0.02$  до  $0.37 \pm 0.011$  мМ.

Отже, модифікований аніліном та співполімером платиновий електрод придатний як платформа

для іммобілізації уреазы методом адсорбції та з допомогою глутарового альдегіду і захистом полікарбонатною мембраною. Використана в роботі методика виготовлення ензимного електрода виявилась оптимальною, оскільки співполімерна анілін-2-сульфоанілінова платформа більш придатна для іммобілізації ензиму.

**РЕЗЮМЕ.** Электрохимическим окислением анилина и его смесей с 2-сульфоанилином на платиновом (Pt) электроде синтезированы полимеры с электронной проводимостью. Иммобилизация уреазы (Ur) на поверхности электрода, модифицированного электропроводным полимером, позволяет применять полученный ферментный электрод как амперометрический биосенсор. Данный ферментный электрод протестирован на содержание карбамида в анализе в интервале концентраций 0.2—20 мМ при рН 7.4. Линейность зависимости ток насыщения—концентрация карбамида наблюдается на участке 0—5 ммоль/л карбамида, что свидетельствует о высокой чувствительности амперометрического сенсора к минимальным количествам карбамида в пробе.

**SUMMARY.** The electrochemical aniline oxidation on the platinum electrode was studied. Immobilization of urease on the electrode surface was made. The electrode as amperometric urease sensor was used. In this conditions this electrode could be detected in the range 0.2—20 mmol/l (pH 7.4). The linear range current saturation—concentration was obtained 0—5 mmol/l. The sensor is highly sensitivity for the detection of some analytes.

1. Taylor A.J., Vadgama P. // Ann. Clin. Biochem. -1992. -**29**. -P. 245—264.
2. Abdel L.M.S., Guilbault G.G. // J. Biotechnol. -1990. -**14**. -P. 53—60.
3. Sehıtogulları A., Uslan A.H. // Talanta. -2002. -**57**. -P. 1039—1044.
4. Basu I., Subramanian R.V., Mathew A. et al. // Sensor Actuators B. -2005. -**107**. -P. 418—423.
5. Gutierrez M., Alegret S., del Valle M. // Biosens. Bioelectron. -2007. -**22**. -P. 2171—2178.
6. De la Rica R., Fernandez-Sanchez C., Baldi A. // Electrochem. Comm. -2006. -**8**. -P. 1239—1244.
7. Wei Li-Fang, Shin J.-Sh. // Anal. Chim. Acta. -2001. -**437**. -P. 77—85.
8. Thavarungkul P., Asawatreratonakul P., Kanatharana P. et al. // Science Asia. -1999. -**25**. -P. 157—163.
9. Rodriguez B.B., Bolbot J.A., Tothill I.E. // Biosens. Bioelectron. -2004. -**19**. -P. 1157—1167.
10. Yang Z., Si Sh., Dai A., Zhang Ch. // Ibid. -2007. -**22**. -P. 3283—3287.
11. Das N., Kayastha A.M., Malhotra O.P. // Biotechnol. Appl. Biochem. -1988. -**27**. -P. 25—29.
12. Disawal S., Qin J., Elmore B.B., Lvov Y.M. // Coll. Surf. B: Biointerfaces. -2003. -**32**. -P. 145—156.
13. Guimard N.K., Gomez N., Schmidt E. // Progr. Polym.

- Sci. -2007. -**32**. -P. 876—921.
14. Castillo-Ortega H.M., Rodriguez D.E., Eucinas J.C. et al. // Sensors Actuators B. -2002. -**85**. -P. 19—25.
15. Luo Y.-Ch., Do J.-Sh. // Biosens. Bioelectron. -2004. -**20**. -P. 15—23.
16. Jin J.-H., Min N.K., Hong Suk-in // Appl. Surf. Sci. -2006. -**252**. -P. 7397—7406.
17. Ковальчук С., Срібний В., Блажейовський Є. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Хім. -2002. -Вип. 42. -Ч. 1. -С. 142—145.
18. Koval'chuk E.P., Whittingham M.S., Skolozdra O.M. et al. // Mater. Chem. Phys. -2001. -**69**. -P. 154—162.

Львівський національний університет ім. Івана Франка

Надійшла 25.06.2007

УДК 541.138

О.А. Джамбек, О.І. Джамбек, Ф.В. Макордей, З.І. Жиліна, Ю.В. Ішков

### ЕЛЕКТРОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЛЕКТРОДІВ НА ОСНОВІ 5,10,15,20-ТЕТРА-(4-МЕТОКСІФЕНІЛ)-ПОРФІРИНУ ТА ЙОГО КОМПЛЕКСУ З Со (II)

Методом циклічної вольтамперометрії в лужному розчині досліджено електрохімічні та електрокаталітичні властивості 5,10,15,20-тетра-(4-метоксіфеніл)-порфірину та його комплексу з кобальтом (II) у складі повітряних газодифузійних електродів. Виявлено вплив різних режимів електрохімічних досліджень на  $I-E$ -криві в інтервалі потенціалів  $-0.4-0.7$  В (о.р.е.).

Високоєфективні електрокаталізатори на основі металоорганічних сполук є перспективними для створення металоповітряних хімічних джерел струму [1—4]. Перевагою таких каталізаторів є можливість зміни в широкому діапазоні електронної будови комплексу, що дозволить регулювати потенціал йонізації центрального йона поляризацію реагенту. Важливим є встановлення загальних закономірностей підбору координаційних сполук перехідних металів для одержання електрокаталізаторів у залежності від природи центрального атома, типу лігандів, різних замісників у ліганді, структурних та фізико-хімічних властивостей.

Дана робота є продовженням електрохімічних досліджень повітряних (кисневих) газодифузійних електродів на основі металопорфіринів [5, 6]. Фізико-хімічною основою каталітичної активності органічних комплексів перехідних металів з порфіринами є їх здатність до координування та активації молекули кисню [7]. Для розробки катодного матеріалу на основі металопорфіринів важливим є і те, що вони стійкі до кислот та лугів.

Об'єктами дослідження були такі сполуки: 5,10,15,20-тетра-(4-метоксіфеніл)-порфірин (ТМФП) та його комплекс з Со (II) (СоТМФП). Комплексу сполуку СоТМФП синтезували взаємодією ТМФП з ацетатом Со (II) у розчині диметилформаміду при кип'ятінні [8].

Електрокаталізатори відновлення кисню одер-

жували нанесенням порфірину або його комплексу з Со (II) на високодисперсний носій (гідрофобна ацетиленова сажа) з диметилформамідних розчинів. Для досліджень були виготовлені повітряні газодифузійні електроди пресуванням гідрофобізованих (15 % мас. фторопласту) активного та гідрозাপорного шарів з струмовим колектором. Активний шар електродів містив до  $2 \text{ мг/см}^2$  ТМФП або СоТМФП. Умови термічної обробки електродів визначали відповідно [6]. За даними термічного аналізу встановлено, що в атмосфері повітря при  $300^\circ\text{C}$  для порфірину та його комплексу з Со (II) відбуваються процеси окиснення та деструкції органічної складової, які не спостерігаються в інертній атмосфері до  $400^\circ\text{C}$ . Тому термообробку повітряних електродів проводили в атмосфері азоту при  $350^\circ\text{C}$  (температура спікання фторопласту) протягом 50 хв.

Електрохімічне дослідження повітряних електродів на основі даних електрокаталізаторів проводили методом циклічної вольтамперометрії на потенціостаті ПИ-50-1,1 у 7 М розчині КОН при температурі  $30^\circ\text{C}$ , в напівелементі з нікелевим протиелектродом. Значення потенціалів наведено відносно оксидно-ртутного електрода порівняння. Методика випробувань включала попереднє змочування активного шару електрода лужно-спиртовим розчином перед установленням в комірку та послідовне вимірювання циклічних  $I-E$ -кривих: в ін-