

*Редколлегия журнала продолжает публикацию статей видных ученых и специалистов о тенденциях и перспективах развития приоритетных разделов современной химии.*

*Учитывая важность целевых комплексных программ фундаментальных и научно-технических работ, выполняемых в учреждениях НАН Украины и ведущих вузах страны, редколлегия решила предоставить свои страницы обзору по тематике проектов: сенсорные системы и технологии (2004–2006 гг.) и сенсорные системы для медико-экологических и промышленно-технических потребителей (2007–2009 гг.). Целью публикуемого обзора является анализ работ в основном зарубежных ученых для демонстрации мирового уровня исследований в этой наиболее продвинутой области сенсорики, в первую очередь, биосенсорики и обеспечения отечественным исследователям адресного доступа к многочисленным, но разрозненным источникам столь важной информации.*

УДК 41.138

**Е.П. Ковальчук, С.В. Волков****ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ СЕНСОРИКА**

Рассмотрены типы сенсорных устройств и физико-химические основы формирования электрохимического отклика химически и биологически активных поверхностных слоев. Описаны материалы, применяемые для изготовления чувствительных слоев, методы закрепления биологически активных компонентов. Особое внимание уделено наноструктурированным материалам в хемо- и биосенсорики. Сделан обзор важнейших областей применения, отмечены достижения и перспективы развития сенсорики.

**1. Введение**

Химические превращения, как известно, сопровождаются изменениями количества исходных и образующихся компонентов. По величинам изменения концентрации веществ можно определить их динамические свойства или же эволюцию системы во времени. Количественное определение компонентов классическими методами аналитической химии весьма трудоемко, поскольку требует отбора и приготовления проб, малочувствительно вследствие невозможности определения ультрамалых количеств примесей, характеризуется недостаточной селективностью. Для анализа методами классической аналитической химии необходимо множество трудно формализуемых операций, что препятствует созданию алгоритмов для автоматизации. Этих недостатков лишены сенсорные устройства и системы анализа, разработанные на их основе. Разработка теоретических основ функционирования и реализация физических устройств стала возможной благодаря прогрессу химии и физики твердого тела и в частности электрохимии, микроэлектроники, материаловедения, информационных технологий, физичес-

кой химии и молекулярной биологии. Появившаяся во второй половине XX века интегральная ветвь развилась в самостоятельное направление научных исследований — сенсорику. Термин “сенсорики” происходит от английского *sensitivity*, что означает “чувствительность”. В широком понимании сенсорики охватывает совокупность подходов, направленных на распознавание частиц различной природы в атмосфере, воде или в живых организмах и количественного их определения. Физическое устройство для распознавания и количественного определения нейтральных или ионизированных органических и неорганических частиц представляет собой сенсор. Главной составляющей сенсора является чувствительный слой, нанесенный на твердую подложку, который при контакте с определяемыми частицами субстрата подвергается изменению, что сопровождается генерированием сигналов. Компонентами активного слоя служат оксиды и сульфиды металлов с полупроводниковыми свойствами, электропроводные допированные и недопированные гелеобразные структуры, органические и неорганические полимеры. Если в качес-

© Е.П. Ковальчук, С.В. Волков, 2007

тве активного компонента используют биологически активные вещества, то индикаторное устройство будет ничем иным как биосенсором. Сигнал, который является откликом чувствительного слоя на наличие частичек аналита, может проявляться в форме изменения физических свойств компонентов активного слоя, таких, как изменение конформации частиц, электропроводности, показателя преломления света, вязкости, увеличение массы и т.д. Для фиксации генерированных в активном слое физико-химических изменений их необходимо преобразовать к виду, удобному для усиления, сравнения со стандартными и отображаемыми в цифровой или аналоговой форме. Преобразование физико-химических изменений в электрические сигналы осуществляется другой составной частью сенсорного устройства, известной как трансдюсер. Функцию трансдюсера может выполнять электрод в электрохимических сенсорах, торец оптического волокна в оптических и т.д. В зависимости от природы генерированного трансдюсером сигнала различают электрохимические, оптические, магнитные, гравитметрические, термометрические и другие сенсорные устройства. В свою очередь, из отдельных типов сенсоров можно вычлнить подтипы. Например, электрохимические сенсоры можно разделить на потенциометрические, амперометрические, кулонометрические и кондуктометрические. С целью увеличения чувствительности, сокращения времени формирования сигнала отклика и увеличения надежности измерения проводят в проточном режиме, а также производят микросенсоры, объединенные в наборы микрочипов. Схематическое устройство сенсора показано на рис. 1.

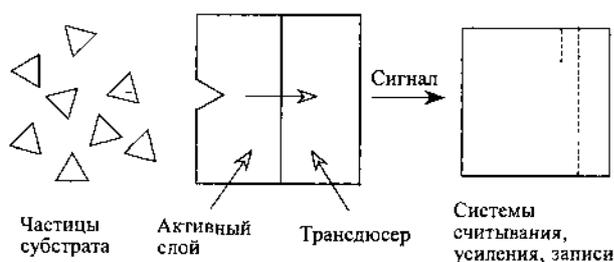


Рис. 1. Схема сенсорного устройства.

Принцип действия устройства в общих чертах сводится к следующему. Под влиянием частиц аналита в активном слое происходят изменения, которые трансдюсером преобразуются в сигналы, поддающиеся измерению. Величина сигнала пропорциональна количеству определяемого вещества. Тогда по величине отклика и концентрации оп-

ределяемого компонента строят калибровочный график, с помощью которого по величине сигнала находят количество вещества в пробе.

## 2. Хемосенсорика

Рассмотрим полупроводниковые сенсоры на газ. Известно, что оксиды металлов ZnO, In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, WO<sub>3</sub>, MoO<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, помимо их полупроводниковых свойств, химически активны в отношении частиц в газовой фазе: H<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, ROH, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Вследствие взаимодействия возникает сигнал отклика. Химическая активность оксидных пленок зависит от множества параметров, которые не всегда известны и могут не быть определяющими. Главное в следующем: на поверхности полупроводника имеются особые поверхностные состояния с повышенным уровнем энергии; когда молекулы газа соударяются с поверхностными центрами, они могут адсорбироваться, а затем и химически взаимодействовать. Морфология поверхностного слоя является определяющим величину адсорбции фактором. Экспериментально установлено, что чем меньше размеры частичек, из которых образована двумерная пленочная структура, тем больше ее проводимость и, следовательно, чувствительность сенсора. Если принять, что зерна в пленке ориентированы параллельно, то сопротивление активного слоя прохождению электрического тока можно выразить соотношением:

$$R = \alpha \frac{R_{n_3}}{d}, \quad (1)$$

где  $\alpha$  — константа пропорциональности;  $R_{n_3}$  — сопротивление на границе зерен;  $d$  — размер зерен.

Чувствительность твердотельных металлооксидных сенсоров увеличивается модификацией оксидов легирующими добавками, смешиванием нескольких оксидов, введением примесей благородных металлов с каталитическими функциями (табл. 1).

В этом плане особый интерес представляют оксидные чувствительные слои из наноразмерных частичек. Например, чувствительность поверхностной пленки из SnO<sub>2</sub> с размером частиц до 30 нм в 460 раз превышает чувствительность пленки из микроразмерных частиц [12]. Чувствительность газооксидного сенсора повышается с увеличением рабочей температуры. Необходимость высоких (порядка 300—500 °С) температур для эффективной работы сенсора диктуется, во-первых, общими принципами химической кинетики и, во-вторых, условием удержания в парообразном состоянии высококипящих жидких компонентов. Высокотемпературные газовые сенсоры с твердотельными

Т а б л и ц а 1

Чувствительные материалы, модификаторы и определяемые компоненты

Оксид	Модификатор	Определяемый компонент	Литература
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ZnO, Au	CO, NO <sub>2</sub>	[1]
TiO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	[2]
SnO <sub>2</sub>	Cu	CO, H <sub>2</sub> , выбросы ДВС*	[3]
SnO <sub>2</sub>	CuO	H <sub>2</sub> S, NO, CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>	[4,5]
InO <sub>3</sub>	SiO	H <sub>2</sub> O	[6]
CuO–BaTiO <sub>3</sub>	Ag	CO <sub>2</sub>	[7]
TiO <sub>2</sub>	Pt	CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	[8]
MoO <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub> , WO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> , CO, NO <sub>2</sub>	[9]
WO <sub>3</sub>	Zr <sub>0.84</sub> Y <sub>0.16</sub> O <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> , CO	[10]
ZnO		CO, NO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S	[11]

\* ДВС — двигатели внутреннего сгорания.

электролитами полезны для очистки выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания. В качестве твердых электролитов используют оксиды циркония, стабилизированные оксидом иттрия Zr<sub>0.84</sub>Y<sub>0.16</sub>O<sub>2</sub> (YSZ), или смешанный оксид LaGaO<sub>3</sub>, модифицированный SrCO<sub>3</sub>, CoO, NiO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO [13, 14]. На рис. 2 показаны токовые отклики газо-сенсорной ячейки при экспонировании воздухом, содержащим NO<sub>2</sub> и CO. Необходимо отметить, что разработанные сенсоры на платформах из оксидов металлов пригодны для измерений при высоких температурах и их эксплуатация сопряжена со значительными трудностями. Снизить рабочую температуру оксидного сенсора вплоть до комнатной можно, модифицируя его поверхность полимерными диэлектриками. С этой же целью были использованы твердотельные полимер-

ные электролиты — сульфированный полистирол или содержащий гидрофильные группы полиацетилен [15]. Под влиянием водяных паров полимерные слои между гребневыми электродами изменяют электрические свойства, что было основанием для создания сенсоров для измерения влажности.

Содержание ионизированных металлических примесей в жидкой фазе можно контролировать с помощью сенсорных устройств, которые чувствительны при комнатной температуре и не подвержены деструктивным изменениям при контакте с жидкостями. Этим требованиям удовлетворяют стеклообразные смеси халькогенидов Pb–Ag–As–I–S, Cd–Ag–As–I–S и Cu–Ag–As–Se, полученные лазерным осаждением на монокристаллические кремниевые пластинки [16]. В зависимости от типа халькогенидного стекла сенсор будет чувствительным только к тем ионам, которые входят в состав чувствительного слоя.

Конструктивно сенсорное устройство было сконструировано таким образом, что на одной плате размещались три сенсора и хлорсеребряный электрод сравнения. Исследования трех сенсорных систем на халькогенидных стеклах легло в основу создания портативной электрохимической системы для анализов в реальном времени.

**2.1. Супрамолекулярная стратегия в хемосенсорике.** Отличный от ранее рассмотренного принцип молекулярного распознавания базируется на платформах из органических соединений со специфическим расположением структурных подъединиц с образованием пустот различных размеров и формы. Олигомерные соединения, в том числе супрамолекулярные, способны образовывать комплексы с частицами меньших размеров по прин-

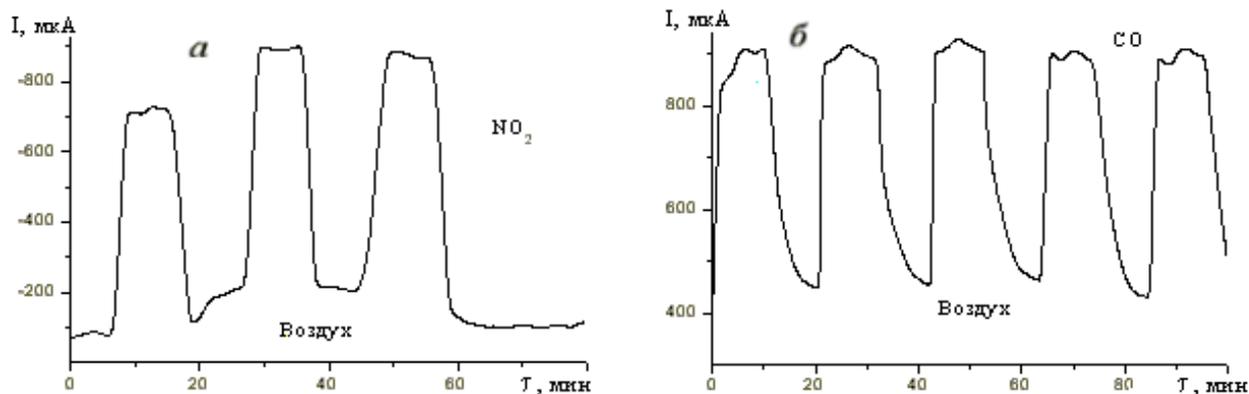


Рис. 2. Амперометрический отклик сенсора Au/YSZ/Au/WO<sub>3</sub> в присутствии 1000 ppm NO<sub>2</sub> ( $U=-0.3$  В,  $T=650$  °С) (а) и Pt/YSZ/Pt/WO<sub>3</sub> в присутствии 1000 ppm CO ( $U=0.5$  В,  $T=600$  °С) (б).

ципу "хозяин-гость" без химического связывания между компонентами. Нанесенные на поверхность транзюсера супрамолекулы под влиянием малых гостевых молекул дают механический или электрохимический отклик, пропорциональный количеству молекул субстрата.

Оптимизация структуры изменением диаметра и высоты пустот или конверсией полярности в гидрофильность позволяет тонко регулировать чувствительность и селективность супрамолекулярных материалов к анализам различной природы. К типичным супрамолекулярным образованиям относятся циклодекстрины, моноциклические парациклофаны, каликсарены и металлопорфирины (рис. 3) [17]. Конструирование и изготовление сенсоров сводится к нанесению супрамолекулярной структуры на поверхность кварцкристаллического микробалансового электрода (КМЭ) с отслеживанием частотного или электрического сигнала. Частицы аналита диффундируют в пустоты и образуют слабосвязанный комплекс типа "хозяин-гость", вследствие чего увеличивается масса, что фиксируется изменением частоты КМЭ или потенциала углерод-пастообразного электрода [18]. С термодинамической точки зрения пенетрация частичек в пустоты супрамолекулярного рецептора идентична конденсации и ее количественно можно характеризовать величиной изменения энтропии. Изменение энтальпии

комплексообразования, которая рассчитывалась методом молекулярной механики, было учтено при расчетах энергии Гиббса. На рис. 4 показан отклик тетразапарациклофана для различных аналитов. Наибольший сенсорный эффект наблюдается для тетрахлорэтилена и ароматических углеводородов, которым свойственно сильное взаимодействие между  $\pi$ -электрондефицитными и  $\pi$ -электронобогатыми системами.

Близкая к идеальной упорядоченность реализуется в случае полимерных структур, синтезированных топохимической полимеризацией муконовой кислоты [19]. Использование в качестве гостевых частиц алкиламинов открывает путь к созданию тонко регулируемых слоистых материалов для селективного распознавания частиц и определения их содержания с высокой точностью.

**2.2. Ион-селективные электроды.** Для того чтобы сделать полимерную матрицу из полимерных диэлектриков или полимеров с  $\pi$ -сопряженной системой связей в ее структуру вводят специальные вещества: ионофоры — в случае электрохимических транзюсеров или люминесцентные метки — в оптодах. Электрохимическая мода аналитического определения ионизированных частиц заключается в определении ЭДС цепи, состоящей из рабочего и электрода сравнения. В качестве рабочего электрода используют хлорсеребряный или каломельный электрод, покрытый полупроницаемой мембраной, а электродом сравнения — тот же электрод без каких-либо модификаций. Материалом полимерной мембраны служат полимерные диэлектрики, например, поливинил-

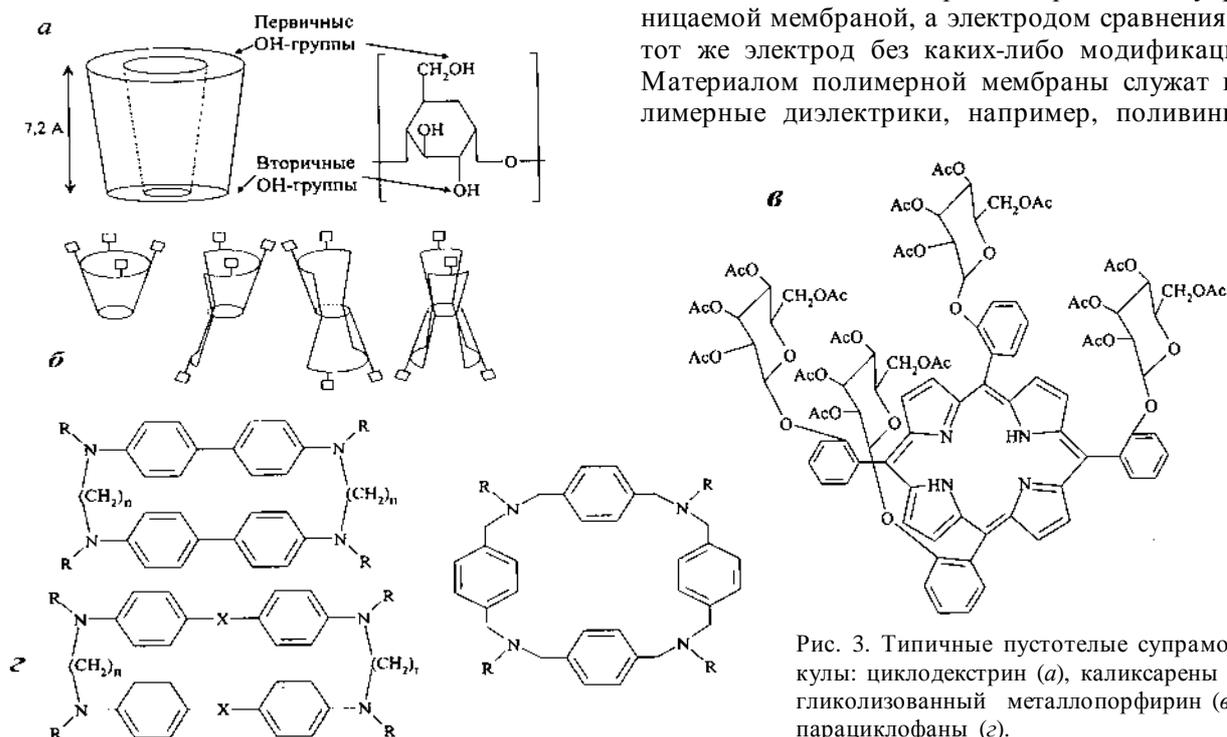


Рис. 3. Типичные пустотелые супрамолекулы: циклодекстрин (а), каликсарены (б), гликолизированный металлопорфирин (в) и парациклофаны (г).

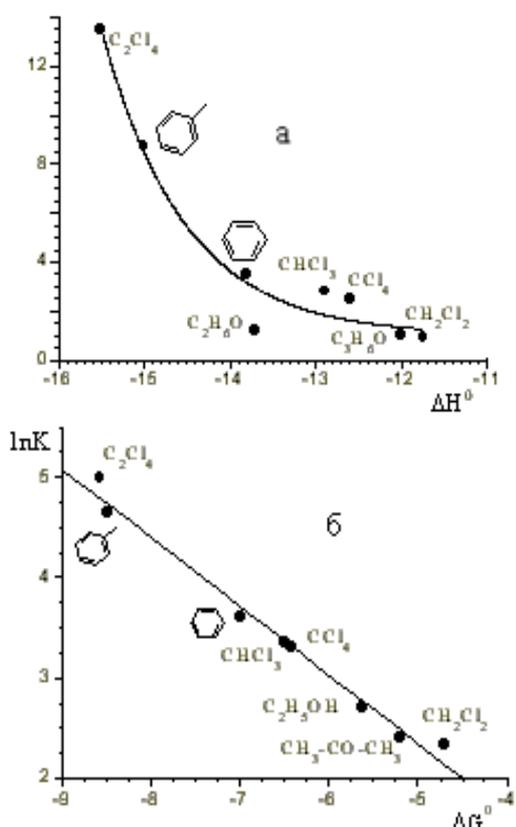


Рис. 4. Сенсорный эффект тетраазарадикалофана от величины  $\Delta H^0$  (а) и полулогарифмическая зависимость константы равновесия комплексообразования от  $\Delta G^0$  (б). Концентрация аналитов — 1000 миллионных частей, толщина слоя — 50 нм.

хлорид,  $\pi$ -сопряженные полимеры (поливиологен) или электропроводные полианилины, полипирролы, политифены и др.

Совместить синтез полимеров с их отложением на электропроводной подложке можно с помощью электрохимического инициирования полимеризации. Пленки, получаемые на электроде при полимеризации разветвленного мономера с тремя функциональными группами — 1,3,5-трис(4'-трицианнитридино-1'-метил)-2,4,6-триэтилбензол трибромида, представляли собой густо разветвленный поливиологен. Сетчатая структура виологеновых фрагментов содержала вклиненные анионы из раствора электролита; ее можно представить шаблоном с отверстиями щелей, комплементарных по размерам к анионам электролита. Вероятная структура поливиологеновой пленки (CPV/X<sup>-</sup>) показана на рис. 5 [20].

Компенсация локализованных на атомах азота положительных зарядов осуществляется анионами из полимеризационного раствора. Путем подбора электролита можно инкорпорировать в пленку различные по величине противоионы, образуя штампы соответствующих размеров. В окислительно-восстановительных процессах вклиненные в структуру поливиологена противоионы перемещаются из пленки в раствор, а ионы из раствора — в пустоты, образованные анионами в исходной полимеризационной смеси. Диффундировать из раствора могут только те ионы, размеры которых меньше размеров пустот в пленке. В основе прин-

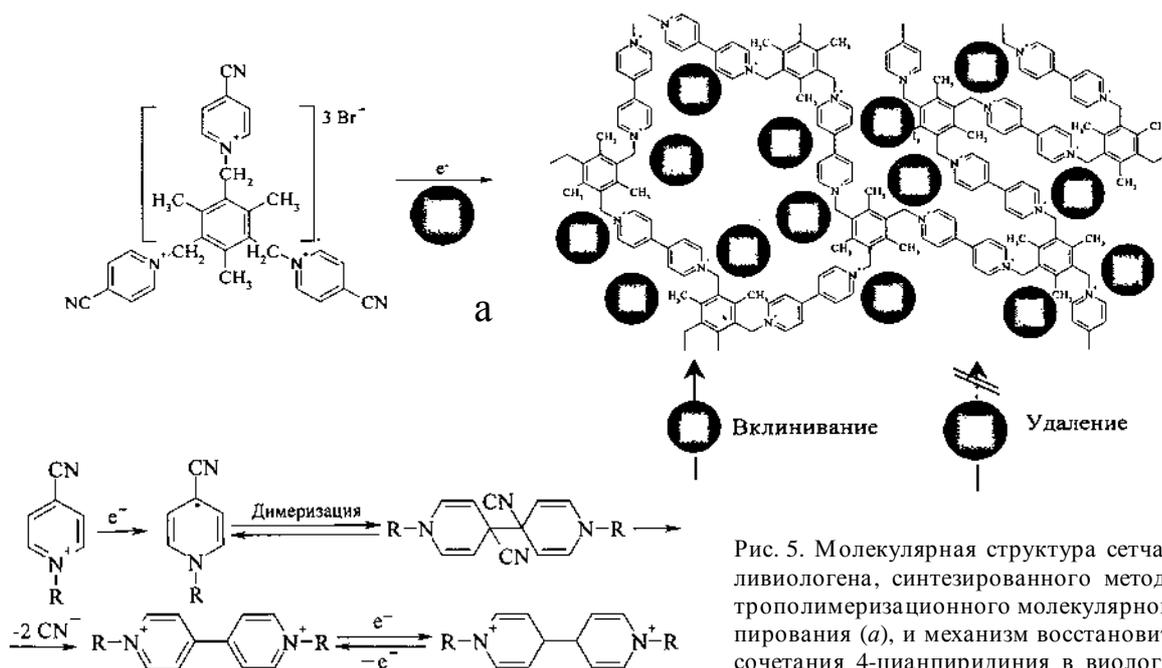


Рис. 5. Молекулярная структура сетчатого поливиологена, синтезированного методом электрополимеризационного молекулярного штампования (а), и механизм восстановительного сочетания 4-цианпиридиния в виологен (б).

ципа распознавания лежит соответствие по размерам образованных во время полимеризации пустот и анионов в анализе. Движущей силой диффузии анионов являются редокс-процессы поливиологеновой пленки при электрохимической поляризации электрода. Во время развертки потенциала в катодную область генерируется сначала катион-радикал, а затем нейтральный бирадикал. Инкорпорированные в пленку противоионы диффундируют в раствор. Развертка потенциала в обратном направлении приводит к окислению радикальных частиц с образованием катион-радикалов, а затем — дикатионов и диффузии противоионов из раствора в пленку. Распознавание и количественное определение проводилось с одними и теми же ионами галогенов, которые были в структуре пленки и находились в растворе. На рис. 6 показано изменение плотности поверхностных редокс-активных виологеновых центров  $\Gamma_{CV}$  в пленке с инкорпорированными ионами галогенов  $CPV/Cl^-$ ,  $CPV/Br^-$  и  $CPV/I^-$  при экспонировании ее водными растворами  $KCl$ ,  $KBr$  и  $KI$ . Поскольку кристаллографические радиусы для ионов  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  соответственно равны 1.81, 1.96, 2.19 Å, то наименьшими будут пустоты в пленке с  $CPV/Cl^-$  и диффузия ионов в пленку будет уменьшаться в ряду  $Cl^- > Br^- > I^-$ .

Редокс-процессы, контролируемые анионами, изучались хроноамперометрически, электрохимическим кварцевым микробалансом и спектроэлектрохимически.

**2.3. Полимер-электропроводные сенсорные платформы.** Функции сопряженных полимеров не ограничиваются селективными мембранами. Уникальность электронной структуры полисопряжен-

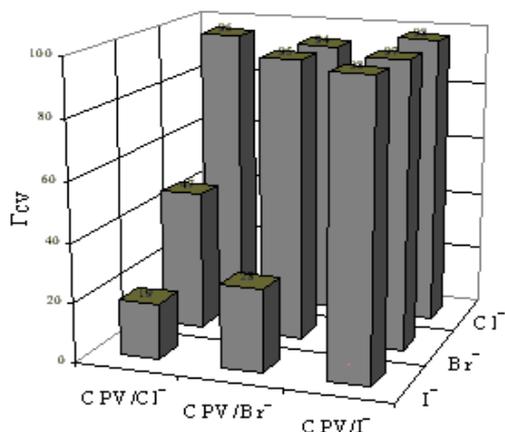
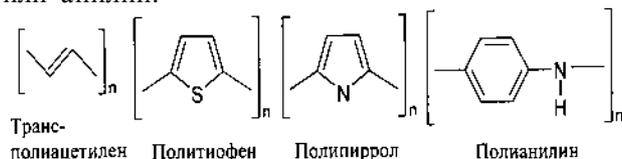


Рис. 6. Зависимость плотности редокс-активных виологеновых центров в пленке с инкорпорированными ионами  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  ( $CPV/Cl^-$ ;  $CPV/Br^-$ ;  $CPV/I^-$ ) в 0.1 M водных растворах  $KCl$ ,  $KBr$ ,  $KI$ .

ных систем и благодаря этому комплекс ценных физико-химических свойств стали основанием для развития нового научного направления — молекулярной оптоэлектроники. Обычно основная структурная единица электропроводного полимера представляет собой линейную цепь, которая состоит из повторяющихся звеньев сопряженных органических молекул, таких, как ацетилен, пиррол, тиофен или анилин:



Такого типа системы в нейтральном состоянии представляют собой изоляторы. Однако вследствие химического или электрохимического восстановления (*n*-допирования) или окисления (*p*-допирования) эти структуры преобразуются в проводники электрического тока. Появление электрической проводимости вызвано изменением зонной структуры и образованием заряженных носителей. С точки зрения физики твердого тела электропроводные полимеры (ЭП) относятся к одномерным широкозонным полупроводникам с плоской запрещенной зоной, поскольку в отличие от металлических проводников энергетическая щель существует при обычных температурах, а с понижением температуры их электропроводность снижается. Электрические и оптические свойства ЭП делают их аттракционными материалами разнообразных сенсорных устройств. Сенсорные платформы из ЭП обычно создают электрохимически в потенцио-, гальваностатическом или потенциодинамическом режимах. Изготавливать детекторы из ЭП можно различными способами. Первый из них заключается в сополимеризации гетероциклических соединений с другими моно- или полициклическими соединениями. Другая разновидность модификации сенсорной платформы осуществляется введением в структуру исходного мономера различных заместителей. Третий путь — использование различного типа противоионов для компенсации положительного заряда в случае *p*-допированного полимера, который образуется во время окисления полимерной цепи и производит проводящее состояние полимера. И, наконец, из одного и того же исходного мономера можно получать различные сенсорные платформы благодаря разным степеням окисления, изменением потенциала окисления, природы растворителя и концентрации компонентов. Это возможно пото-

му, что морфология, молекулярная масса, длина цепи сопряжения, порядок соединения мономерных звеньев (микроструктура), электропроводность, ширина запрещенной зоны определяются условиями полимеризации. Конструктивно сенсоры на ЭП-платформах аналогичны сенсорам на основе оксидов металлов и могут быть в моноили мультивариантном исполнении. ЭП в электрохимических сенсорных системах преимущественно используются с четырьмя типами преобразователей — кондуктометрическим, потенциометрическим, амперометрическим и потенциодинамическим [21].

Кондуктометрический отклик наиболее часто применяется в сенсорике. Практически измеряют не собственно проводимость, а сопротивление электрическому току, отнесенное к сопротивлению в отсутствие аналита ( $R/R_0 - 1$ ). Взаимодействие сопряженных полимеров с акцепторами или донорами электронов приводит к изменению как плотности носителей, так и их подвижности и, вследствие этого, к значительным изменениям проводимости. Так, изменение электропроводности полиацетиленовой пленки, допированной парами иода под действием газообразного аммиака, позволяет определить количество последнего. Электроосажденные полипиррол и поли-3-метилтиофеновые пленки, допированные частицами меди или палладия, изменяют проводимость в присутствии газов-восстановителей  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$ . Взаимодействие ЭП с растворителем, например крезолом, индуцирует конформационные переходы полимерной цепи компактного полимерного клубка в вытянутую спираль. Переход одного конформера в другой сопровождается изменениями электропроводности. Изменение проводимости происходит при экспонировании парообразными метанолом, гексаном, хлороформом, тетрагидрофураном, бензолом, толуолом или ацетоном, что является предпосылкой создания сенсоров для их определения. Потенциометрическая мода модифицированного электрохимически осажденным полииндолом платинового электрода была использована для определения содержания неорганических катионов в анализе [22]. Отклик электрода исследовался в присутствии неорганических солей  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Оказалось, что ион-селективный электрод, практически неактивный по отношению к ионам  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , давал незначительный отклик на ионы  $\text{Pb}^{2+}$  и был высокочувствительным к ионам  $\text{Cu}^{2+}$ . Калибровочная кривая сенсора на ионы  $\text{Cu}^{2+}$  показана на рис. 7. Отклик нейтрального полимера на ионы меди обус-

ловлен допированием его ионами  $\text{Cu}^{2+}$  и образованием биполярного потенциала на мембране. Потенциометрический отклик с наклоном 140 мВ в концентрационном интервале  $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  хорошо описывается уравнением Нернста.

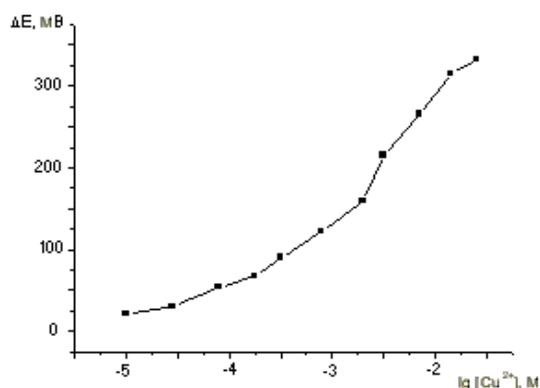
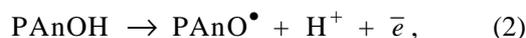


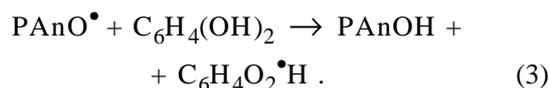
Рис. 7. Потенциометрический отклик ион-селективного сенсора на ионы  $\text{Cu}(\text{II})$  в 0.1 М растворе  $\text{KNO}_3$ .

Селективность сенсора на ионы меди, по-видимому, определяется связыванием ионов  $\text{Cu}(\text{II})$  с полииндолом в нейтральном состоянии с образованием комплекса типа "хозяин—гость".

В амперометрических сенсорах отклик происходит вследствие изменения величины тока при постоянном потенциале модифицированного полимером электрода. В этом случае ЭП играет активную роль, принимая участие в процессах окисления—восстановления. Использование импульсной техники типа импульсной постоянно-токовой амперометрии или импедансной спектроскопии позволяет определить кинетику формирования отклика. Амперометрический вариант сенсора для определения катехола был успешно реализован в работе [23]. Сенсорный электрод был создан электрохимическим осаждением сополимера анилина и *o*-аминофенола на платиновую фольгу. Соплимерный слой проявляет электрокаталитический эффект в окислении катехола. При постоянном потенциале 0.55 В сополимер легко окисляется до свободных радикалов:



которые тут же восстанавливают катехол в растворе с регенерацией исходного сополимера:



В дальнейшем свободные радикалы гидрохи-

нона электрохимически окисляются до хинона:



Эта реакция также происходит на модифицированном сополимером платиновом электроде и ее скорость зависит от концентрации катехола в растворе. Влияние концентрации катехола на величину тока окисления показано на рис. 8.

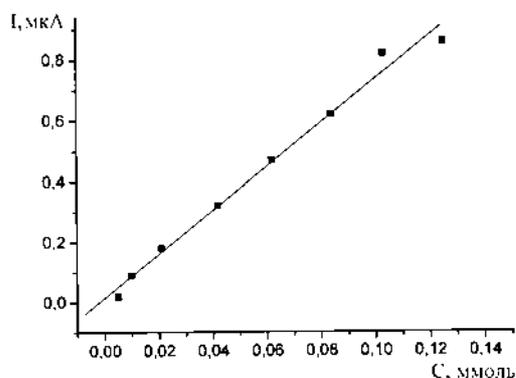
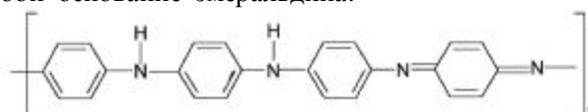


Рис. 8. Зависимость отклика тока от концентрации катехола в растворе (в интервале 5—120 мкМ).

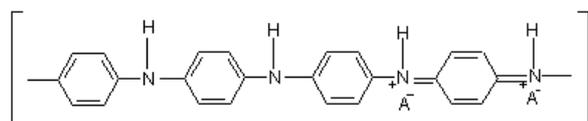
Прямая линия наблюдалась в концентрационном диапазоне 5—80 мкМ с коэффициентом корреляции 0.997. Следовательно, сенсор можно использовать для определения катехола в этих концентрационных пределах. Сенсор можно применять также для определения фенола, резорцина и гидрохинона более чем 120 раз без заметных изменений величины тока отклика, что свидетельствует о высокой операционной стабильности сенсорного электрода.

**2.4. Наноструктурированные платформы из электропроводных полимеров.** Несмотря на то, что электрохимически осажденные слои электропроводных полимеров толщиной порядка нанометров относятся к нанообъектам, их физико-химические свойства не всегда удовлетворяют требованиям к конструктивным материалам для молекулярной электроники. Физико-химические свойства ЭП определяются их структурой, которая, в свою очередь, зависит от типа полимерных цепей, способа их укладки, ориентации и плотности упаковки. Регулирование морфологии ЭП осуществляется на стадии матричного или тэмплейтного синтеза, когда матрицы действуют как своеобразные структурные директрисы. В качестве структурных "менеджеров" в синтезе наноструктурированных ЭП используют "мягкие" тэмплейты, такие, как сурфактанты, неорганические кислоты, сложные органические допанты, которые благоприятствуют

процессам самосборки; "жесткие" тэмплейты, подобные цеолитам, пористым оксидам алюминия; полимерные мембраны, которые благодаря одномерным наноканалам промотируют рост нанотрубок или нановолокон. Нанотрубки, полученные из полианилина, допированного хлорной кислотой, отличались в значительной степени кристалличностью. Следствием упорядочения полимерных цепей было почти шестикратное увеличение электропроводности с 1.2 до 7.1 См/см [24]. Большинство сенсоров на полианилиновой платформе действуют по принципу обратимого перехода кислая/основная формы. Основная форма представляет собой основание эмеральдина:



а кислая — эмеральдиновую соль:



Электропроводной формой полианилина является эмеральдиновая соль, в которой протонизированные иминные атомы азота полимерной цепи индуцируют перенесение заряда. Проводимость полианилина увеличивается с ростом числа протонизированных центров (поляронов) и уменьшается при переходе в эмеральдиновое основание. Примечательно, что полианилиновая пленка чувствительна как к кислотам, так и к основаниям, поскольку в обоих случаях в их присутствии электропроводность пленки увеличивается.

При этом чувствительность и скорость формирования отклика возрастают в случае изготовления активного слоя из полианилиновой композитной пленки с регулируемой волокнистой структурой [25]. На рис. 9 приведены величины электрического отклика полианилиновой наноструктурированной пленки в сравнении с полианилиновой пленкой, нанесенной из раствора в N-метилпирролидиноне. Чувствительность сенсора характеризовалась отношением  $I_{\text{газ}}/I_{\text{N}_2}$ , в котором  $I_{\text{газ}}$  представляет величину тока при экспонировании определяемым газом, а  $I_{\text{N}_2}$  — в атмосфере азота. Для ЭП-материалов с хорошо собранной геометрией характерна еще одна особенность. Оказалось, что чувствительность сенсора зависит от диаметра полианилиновых волокон (рис. 10) [26].

Меньшее время отклика для более тонких нановолокон, очевидно, связано с большей скоростью диффузии молекул из газовой фазы. Кроме

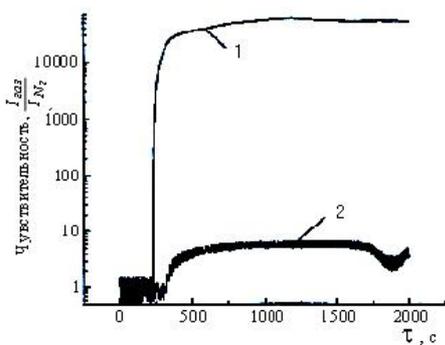


Рис. 9. Чувствительность полианилиновой пленки с регулируемой нановолокнистой структурой (1) и пленки, нанесенной из раствора полианилина в N-метилпирролидиноне (2) при экспонировании триметиламином ( $5.14 \cdot 10^{-7}$  М/мл)

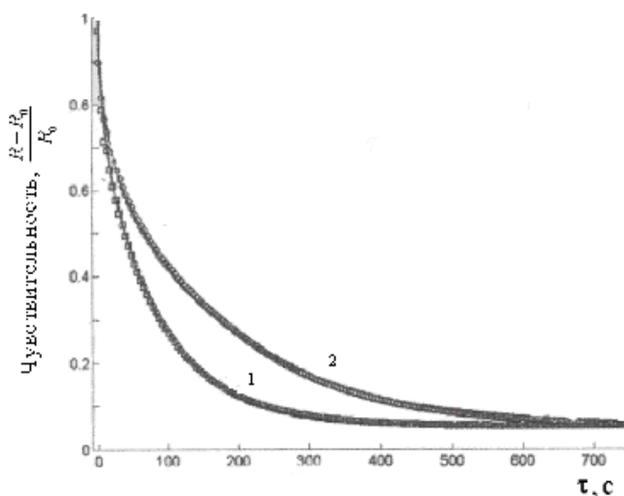


Рис. 10. Динамика проводимости сенсорного слоя с различным диаметром полианилиновых волокон при экспонировании аммиаком: 1 – 335; 2 – 490 нм.

того, следствием упорядоченной структуры является улучшение механической устойчивости и образование бифилярной структуры со многими контактами, что обеспечивает более высокую электропроводимость и чувствительность сенсорного устройства.

Говоря о наноструктурированных материалах, нельзя не упомянуть об углеродных нанотрубках, которые со времени их открытия в 1991 г. стали объектом интенсивного изучения благодаря их уникальным свойствам и потенциальным прикладным возможностям в нанотехнологиях. Высокие проводимость и удельная поверхность, легкость модификации боковых стенок и биосовместимость делают их идеальными материалами для конструирования электрохимических сенсоров. При

этом наблюдалось увеличение электропроводности на три порядка при экспонировании чувствительного слоя из одностенных углеродных нанотрубок диоксидом азота и падение электропроводности на два порядка в присутствии паров аммиака [21]. Заметим, что коммерческие сенсоры на металлооксидных полупроводниках для определения этих газов работают при температуре  $\approx 600$  °С, тогда как рабочая температура сенсора на основе углеродных нанотрубок — 20 °С. Если пленку из углеродных нанотрубок (УНТ) модифицировать частицами палладия, она становится чувствительной к водороду. Модифицированная пленка чувствительна также к кислороду, поскольку ее сопротивление прохождению электрического тока скачкообразно увеличивается на 10—16 % [27].

Установлено, что ответственными в появлении электрохимического отклика являются дефекты на поверхности одностенных УНТ, образование которых происходит под действием УФ-облучения при 120 °С или озонирования. При этом на поверхности УНТ образуются карбоксилированные центры, по месту которых происходит взаимодействие с частицами аналита. Схематически процесс связывания карбоксилированных центров с частицами ацетона показан на рис. 11. Взаимодействие адсорбированных частиц аналита с активным слоем УНТ сопровождается изменением адсорбционной емкости и электропроводности, величины которых пропорциональны содержанию частиц аналита. Сенсоры с модифицированным окислителем УНТ чувствительны к метанолу, воде, гексану, толуолу, хлороформу и др.

Модифицировать УНТ можно конго красным. Благодаря большому числу функциональных групп в молекуле конго красного УНТ становятся растворимыми в воде. Полагают, что модифи-

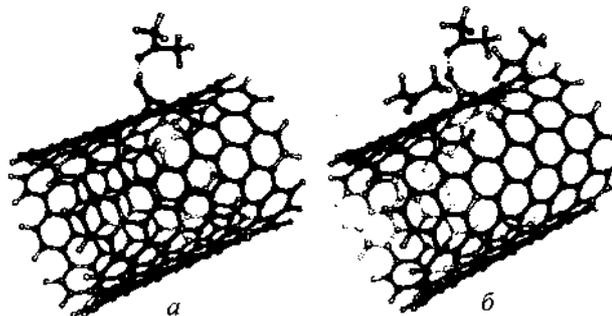


Рис. 11. Связывание молекул ацетона с карбоксикислотными дефектами на боковых стенках УНТ (а) и образование кластеров ацетона вокруг дефектов в результате межмолекулярного связывания (б).

кация нанотрубок происходит под действием сил межмолекулярного взаимодействия. Из водорастворимых УНТ получена пленка на стеклографитовом электроде, чувствительная к допамину, аскорбиновой и ириновой кислотам [28]. Амперометрический отклик сенсора показан на рис. 12. Линейная зависимость тока отклика от концентрации допамина свидетельствует о перспективности водорастворимых УНТ в качестве материала в хемосенсорике.

Модификация УНТ электропроводными полимерами открывает возможность создания твердотельного pH-сенсора.

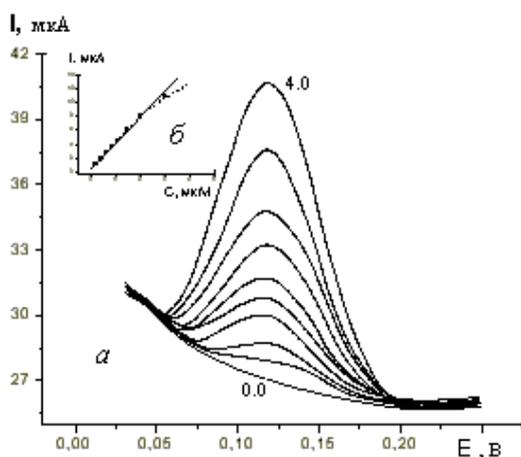


Рис. 12. *a* — Дифференциальные импульсные вольтамперограммы модифицированного конго красным стеклографитового электрода при различных количествах допамина: 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.5, 2.0, 3.0 и 4.0 мкМ; *б* — калибровочная кривая амперометрического сенсора.

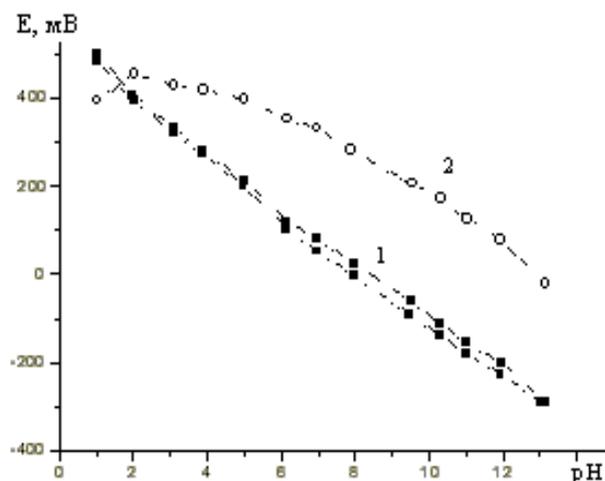


Рис. 13. Зависимость потенциала разомкнутой цепи ( $E$ ) потенциометрического сенсора с модифицированными полианилином (1) и немодифицированными УНТ (2) при различных значениях pH раствора.

Коммерческие pH-метры на основе проточной мембраны не всегда удобны в работе, что ограничивает возможности их использования. На рис. 13 показан отклик потенциала разомкнутой цепи в различных буферных растворах в пределах изменения pH от 1 до 13. Устройство демонстрировало достаточно хорошую линейность характеристик с незначительным гистерезисом.

**2.5. Глюкозный хемосенсор.** Наблюдение за уровнем глюкозы в крови теплокровных — один из важнейших диагностических приемов при лечении больных диабетом. Разработаны две группы методов определения глюкозы — прямые и непрямые. В основе непрямых методов лежит использование ферментных электродов (см. раздел "Биосенсорика"). Здесь будет идти речь об безферментных электрохимических сенсорах, амперометрический отклик которых формируется вследствие прямого окисления глюкозы на электродной поверхности. Электродными материалами могут быть платина, золото, медь, никель или углерод. Хотя металлические электроды легко изготовить миниатюрными и различной формы, однако имеются проблемы, связанные с их окислением. Окисление глюкозы требует достаточно высоких анодных потенциалов, при которых возможно коррозионное разрушение металлических электродов и деградация компонентов раствора. Продукты окисления могут оставаться на электродной поверхности, обуславливая уменьшение активности. Они образуют пассивную пленку, что препятствует дальнейшему окислению — детектированию глюкозы вследствие потерь активности электрода и невозможности токового отклика. Несмотря на это, прямые амперометрические хемосенсоры достаточно распространены благодаря простоте технологии изготовления и используемого инструментария. Пропорциональное увеличение токового отклика при увеличении количества глюкозы в анализе наблюдалось на алмазном электроде, допированном бором [29]. На рис. 14 приведены циклические вольтамперограммы, на которых анодный пик тока соответствует окислению глюкозы при потенциале  $\sim 650$  мВ относительно насыщенного хлорсеребряного электрода. Интересно отметить, что анодный пик тока проявляется при обратном сканировании потенциала, а это свидетельствует о сильной адсорбции глюкозы и, как следствие, о многостадийности процесса. Вначале происходит окисление молекул воды с образованием адсорбированных гидроксильных радикалов:



где  $M_{ад}$  означает адсорбированную на электродной поверхности молекулу глюкозы.

Гидроксильные радикалы подвергаются последующим преобразованиям с образованием оксидов MO, принимают участие в окислении органических веществ R и выделении кислорода:

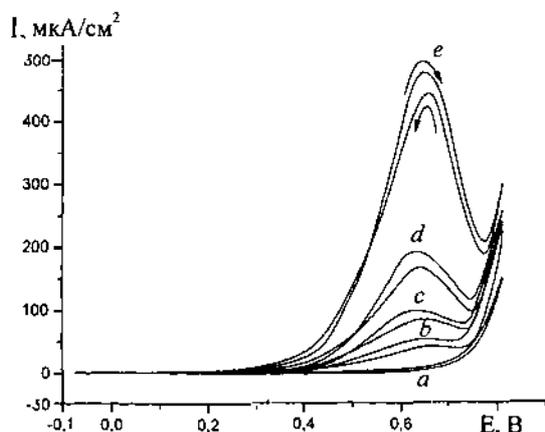
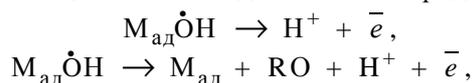
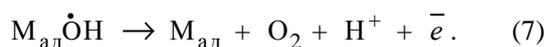


Рис. 14. Циклические вольтамперограммы алмазного допированного бором электрода в присутствии различных количеств глюкозы: 0.0 (a); 0.5 (b); 1.0 (c); 2.0 (d) и 5.0 мМ (e) в 1.0 М водном растворе NaOH. Скорость развертки потенциала 20 мВ/с.



Низкомолекулярные карбогидраты, к которым принадлежит глюкоза, не только сами сильно адсорбируются на поверхности электрода, но и продукты их окисления также пребывают в адсорбированном состоянии.

Прямой метод имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет определять глюкозу в физиологических жидкостях, электроды сохраняют активность в течение длительного времени, а их регенерация осуществляется простой промывкой водой. Однако высокий потенциал окисления глюкозы является серьезным недостатком сенсорной системы на алмазных электродах. Снизить потенциал окисления глюкозы можно на электродах с каталитическими свойствами. Каталитический эффект электродов из благородных металлов (Au, Pd, Pt) незначительный, но в мелкодисперсном состоянии их каталитические свойства увеличиваются многократно. Изготовление электрохимического преобразователя с инкорпорированными наноразмерными частицами золота сводилось к обработке поликристаллического золотого электрода 3-меркаптопропилметоксисилоном (MPTS) с последующей инкорпорацией нанодисперсных частиц золота и закреплением их гидроксил-амином (рис. 15) [30].

Обработка наноразмерных частиц золота

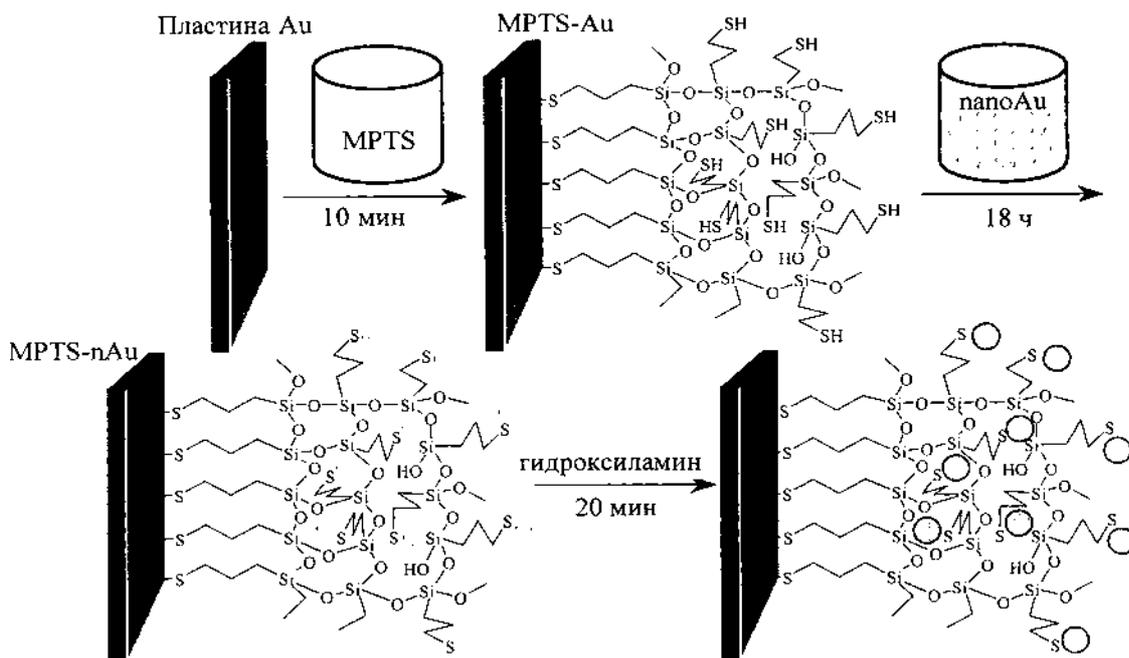


Рис.15. Схематическое изображение последовательности стадий изготовления модифицированного наночастицами золота электрохимического преобразователя.

гидроксиламином в трехмерной силикатной сетке позволила увеличить размеры наночастичек с 14 до 33 нм и получить поверхностные гидроксиды со свойствами посредников окисления глюкозы. Следствием этого было смещение потенциала окисления в катодную область на 0.3 В по сравнению с золотым макроэлектродом. На рис. 16 приведены циклические вольтамперограммы модифицированного золотого электрода в присутствии глюкозы, он обеспечивал линейный амперометрический отклик в широких границах концентраций глюкозы (0—8 мМ). Кроме того, сенсор пригоден для одновременного определения глюкозы и аскорбиновой кислоты, поскольку на вольтамперограммах наблюдаются индивидуальные пики тока. Величина токового отклика сенсора остается практически неизменной на протяжении 24 ч и уменьшается приблизительно на 10 % через 5 дней хранения сенсора в фосфатном буфере при комнатной температуре.

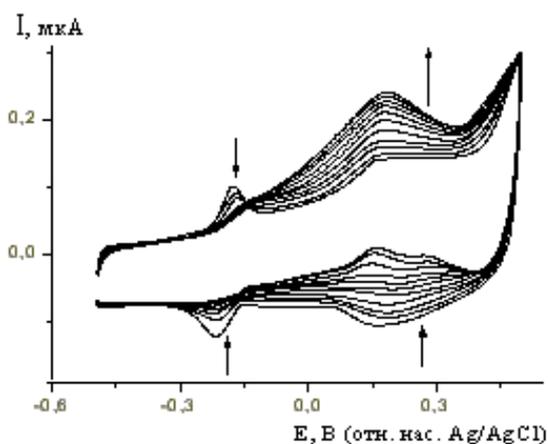


Рис. 16. Циклические вольтамперограммы модифицированного наночастицами золота электрода при ступенчатом введении глюкозы с шагом 5.0 мкМ. Скорость сканирования потенциала 10 мВ/с.

Безэнзимное определение глюкозы проводилось на золотом электроде, предварительно покрытом монослоем тиолированного  $\alpha$ -циклодекстрина ( $\alpha$ -CD), структура которого показана на рис. 17. Количество адсорбированного на поверхности Au-электрода  $\alpha$ -CD рассчитывалось по данным уменьшения резонансной частоты кварцевого микробалансового анализатора и составляло  $9.5 \cdot 10^{13}$  молекул/см<sup>2</sup>. Самособранный слой  $\alpha$ -CD представлял собой совокупность микроэлектродов, каждый из которых имел площадь 24 Å<sup>2</sup> и диаметр 5.5 Å. Ультрамикроэлектроды действовали как хозяева для гостевых молекул.

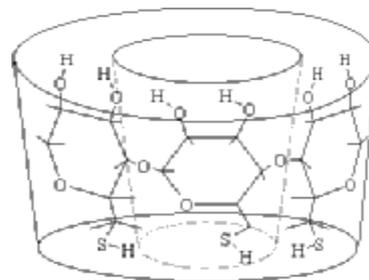


Рис. 17. Структура тиолированного  $\alpha$ -циклодекстрина на поверхности Au-электрода.

Количество глюкозы в анализируемом образце определяли следующим образом. Изначально электрод экспонировали водно-спиртовым раствором электроактивного ферроцена, а затем — раствором электрохимически неактивной в исследуемой области потенциалов глюкозы. Молекулы глюкозы образуют более устойчивый комплекс и они будут замещать электроактивные молекулы ферроцена. Ток окисления связан с концентрацией глюкозы Glu соотношением:

$$I_p = 2.9 (\pm 0.05) - 3.55 (\pm 0.13)[\text{Glu}], \quad (8)$$

где  $I_p$  — ток в миллиамперах; [Glu] — концентрация глюкозы в миллимолях.

Линейность между депрессией тока и концентрацией глюкозы в анализе наблюдается для концентраций глюкозы до 0.80 ммоль, при которых заполняются все щели в  $\alpha$ -CD, после чего величина тока не изменяется.

### 3. Биосенсорика

Введение в структуру чувствительного слоя биологически активных компонентов — энзимов, нуклеиновых кислот, дрожжевых культур, липосом, органелл, бактерий, антиген-антител, одноклеточных организмов и тканей высших организмов — позволяет получить сенсорное устройство, обозначенное как биосенсор. Хотя принципиальных отличий между хемо- и биосенсорами нет, биосенсоры отличаются большей разнообразностью, повышенной избирательностью и чувствительностью. Мягкие условия функционирования делают их незаменимыми при медико-биологической диагностике, анализе качества продуктов питания и охране окружающей среды. Среди большого разнообразия биосенсорных мод особое место принадлежит электрохимическим, что дало основание Королевскому научному обществу (Лондон) на Первой конференции по биосенсорике в 1986 г. определить биосенсор как "устройство для распознавания частиц аналита и определения их кон-

центрации по величине электрического сигнала при сочетании биологической распознавательной системы и электрохимического преобразователя".

Электрохимические сенсоры могут функционировать в потенцио- или амперометрическом режиме. Потенциометрическая разновидность биосенсоров базируется на измерении изменений потенциала разомкнутой цепи, состоящей из энзимного и электрода сравнения. Поскольку через систему не протекает электрический ток, потенциометрический сенсор не возмущается массопереносом. На границе электрод/раствор устанавливается состояние равновесия, которое можно охарактеризовать величиной ЭДС цепи:

$$E = \Phi_{RE} - \Phi_{EE}, \quad (9)$$

где индексы RE и EE относятся к потенциалу электрода сравнения и энзимного.

При достижении состояния равновесия ЭДС цепи пропорциональна концентрации частиц аналита, согласно уравнению Нернста:

$$E = K' - \frac{RT}{nF} \ln C_{ан}. \quad (10)$$

Константа  $K'$  включает потенциал электрода сравнения и стандартный потенциал энзимного электрода, а  $C_{ан}$  означает концентрацию определяемых частиц.

Несмотря на простоту конструкции и удобство работы с потенциометрическим сенсором, он характеризуется недостаточно высокой чувствительностью ( $10^{-6}$  М). В отличие от потенциометрических амперометрические сенсоры более универсальны и на два порядка чувствительнее, однако они более инертны. Инертность амперометрического сенсора обусловлена протеканием через систему электрического тока, в результате чего происходят сопровождаемые массопереносом окислительно-восстановительные реакции. Отклик сенсора контролируется скоростью энзимной реакции, если ее скорость меньше скорости диффузии. И, наоборот, если скорость взаимодействия между частицами субстрата и энзимом протекает быстро, то общая скорость процесса определяется скоростью диффузии. Скорость реакции в кинетическом режиме выражается соотношением:

$$I_S = \frac{I_{max}[S]}{K_M + [S]}, \quad (11)$$

где  $I_S$  — скорость энзимной реакции при концентрации субстрата  $[S]$ ;  $I_{max}$  — максимальная скорость энзимной реакции;  $K_M$  — константа Михаэлиса.

Уравнение (11) представляет собой электрохи-

мический эквивалент классического уравнения Михаэлиса–Ментен.

Для описания скорости энзимной реакции в диффузионной области можно воспользоваться уравнением Коттрелла:

$$I = nFAC_o \sqrt{D/\pi t}, \quad (12)$$

где  $n$  — число электронов;  $F$  — число Фарадея;  $A$  — геометрическая поверхность электрода;  $C_o$  — объемная концентрация электроактивного вещества;  $D$  — коэффициент диффузии;  $t$  — время.

**3.1. Энзимные электроды.** Основными компонентами биочувствительного слоя являются энзимы, которые катализируют процессы метаболизма в живых организмах. Поскольку энзимы давно использовались в процессах брожения, их часто называют ферментами. Эти два термина можно считать синонимами. По эффективности и избирательности энзимы несравненно лучше всех искусственно созданных каталитических систем. По химическому составу все энзимы можно разделить на простые — протеины и сложные — протеиды, которые содержат белок и активную сферу небелковой природы — кофакторы. Функцию кофакторов у протеидов выполняют некоторые витамины, фосфорные эфиры моносахаридов, металлсодержащие комплексы и ионы металлов. Коферменты являются переносчиками различных функциональных групп, атомов, электронов и протонов. Из шести групп, каждая из которых включает ряд ферментов, катализирующих определенный класс реакций, ограничимся рассмотрением оксидоредуктаз. Активными центрами в оксидоредуктазах являются флавинадениннуклеотиды (FAD), флавиномононуклеотиды (FMN), железопорфириновые комплексы (Hem). В табл. 2 приведены примеры оксидоредуктаз и свойственные им редокс-центры.

Примером энзима с активными железопорфириновыми комплексами является пероксидаза,

Т а б л и ц а 2

Оксидоредуктазы и их кофакторы (редокс-центры)

Энзим	Редокс-центр
L-аминокислотная оксидаза	FAD
Холестерол оксидаза	FAD
Глюкозо оксидаза	FAD
Лактат оксидаза	FMN
Гликолат оксидаза	Hem
Сульфит оксидаза	Mo
Пероксидаза	Hem

выделенная из хрена (Horseradish Peroxidaza — HRP). На рис. 18 представлены компьютерная модель и структура активного центра, а также изображение пленки HRP, выполненное с помощью атомной силовой микроскопии.

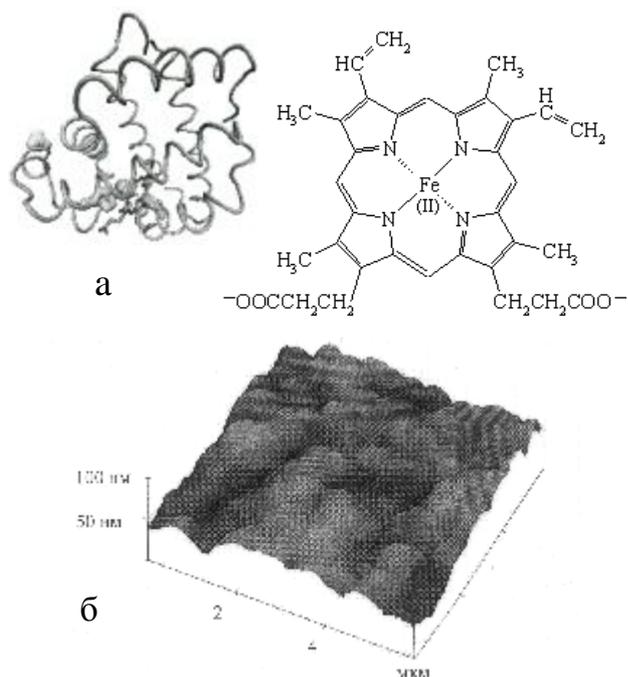
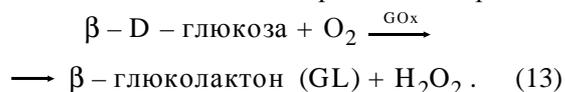
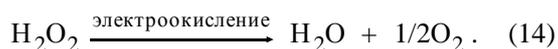


Рис. 18. Компьютерная модель и структура активного центра пероксидазы HRP (а); изображение пленки HRP, выполненное с помощью атомной силовой микроскопии (б).

В 1962 г. Кларк и Линс впервые создали чувствительный к кислороду ферментный электрод, что было началом бурного развития биосенсорики [31]. Принцип действия электрода состоял в окислении глюкозы в присутствии глюкозооксидазы с образованием глюколактона и перекиси водорода:

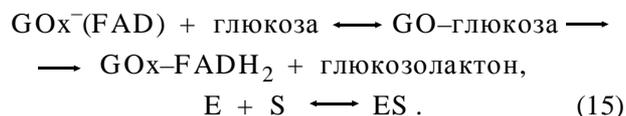


Концентрацию глюкозы можно определить по количеству поглощенного кислорода или выделенного пероксида водорода. Они оба электроактивны и их количество можно определить по величине тока восстановления или окисления. Количество поглощенного кислорода технически фиксировать трудно. Поэтому устанавливают количество пероксида водорода по величине тока его окисления:

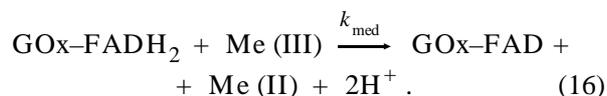


Затем с помощью калибровочного графика по величине тока отклика можно определить содержание глюкозы в анализе.

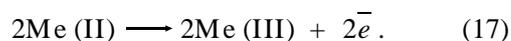
Активная окисленная форма глюкозооксидазы (FAD<sup>+</sup>) возвращается в каталитический цикл посредством окисления восстановленной формы (FADH<sub>2</sub>) молекулярным кислородом. Этот простой амперометрический биосенсор был предметом многочисленных исследований, о чем будет идти речь далее. Другая возможность в создании ферментных электродов сводится к введению в структуру сенсора специальных веществ-посредников (медиаторов — Me). Основная функция медиаторов — создание лучшего контакта ферментных редокс-центров с преобразователем и, как следствие, увеличение тока отклика. Чаще всего в качестве медиаторов используют ферроцен и его производные, ферроцианиды, комплексы осмия и рутения с полимерными и метилвиологеновыми лигандами, фталоцианиды, органические красители и др. Скорость опосредованного электронного переноса изучалась в работах [32—34]. Процессы, протекающие на стеклогуглеродном ферментном электроде, сводятся к следующему:



Образованная в ферментной реакции восстановленная форма глюкозооксидазы GOx-FADH<sub>2</sub> повторно окисляется двумя металлическими центрами Me (III) комплекса. Электроны из редокс-центров глюкозооксидазы передаются через протеин-медиаторную сеть электроду:



Регенерация медиатора в окисленном состоянии достигается электрохимическим окислением:



Если образование ферментного комплекса ES происходит быстро, то каталитический ток, который соответствует числу оборотов глюкозооксидазы, выражается соотношением:

$$I_{\text{cat}} = nFA C_m \cdot (k_{\text{med}} D_m C_E)^{1/2}, \quad (18)$$

где  $C_m$  и  $C_E$  — концентрации медиатора и фермента, отнесенные к единице поверхности;  $D_m$  — коэффициент диффузии редокс-медиатора.

При условии избытка иммобилизованного медиатора, то есть при такой концентрации ме-

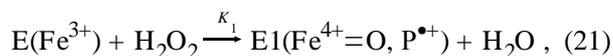
диатора, когда ток отклика достигает максимального значения ( $I_{\max}$ ), электрохимическая метаморфоза уравнения Михаэлиса–Ментен принимает вид:

$$\frac{1}{I_s} = \frac{K'_m}{(I_{\max} C_s)} + \frac{1}{I_{\max}}; \quad (19)$$

$$I_{\max} = (nFAk_{\text{кат}} \cdot C_E l) / 2, \quad (20)$$

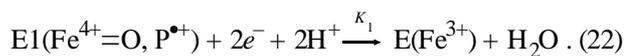
где  $l$  — толщина слоя энзима;  $C_E$  — концентрация энзима, ммоль.

**3.2. Прямой электронный перенос в системах энзим—электрод.** Проблема непосредственного контакта активных центров энзима с электродом весьма актуальна. Возможность прямого электронного переноса открывает путь к электрохимическому изучению структуры, механизма редокс-превращений ферментов, процессов метаболизма с их участием. Трудности обмена электронами между энзимом и электродом обусловлены несколькими факторами. Во-первых, при адсорбции на электродной поверхности частицы энзима подвергаются конформационным изменениям, вследствие чего энзим теряет электрохимическую и биологическую активность. Во-вторых, редокс-центры глубоко скрыты внутри электрохимически неактивных пептидных цепей. Вследствие недоступности активных центров для достижения электрохимической активности энзима необходимо использовать медиаторы. Исследования, проведенные в последнее время, касались изучения прямого электронного переноса маленьких редокс-протеинов типа цитохрома  $C$ , гемоглобина или миоглобина [35—37]. Тщательные исследования прямого электронного переноса были предприняты с большим энзимом пероксидазой, выделенным из хрена (HRP), который часто используется в амперометрических сенсорах для определения пероксида водорода. Кинетическая модель биоэлектрокаталитического восстановления  $H_2O_2$  пероксидазой аналогична двухстадийному энзимному каталитическому превращению. Первоначально  $H_2O_2$  окисляет HRP до соединения E1, которое представляет собой окисленную форму пероксидазы, в состав которой входит железо ( $Fe^{+4}=O$ ) и порфириновый катион-радикал ( $P^{\bullet+}$ ) [38]:

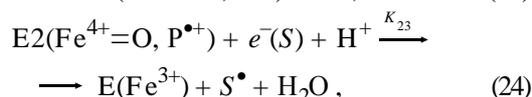
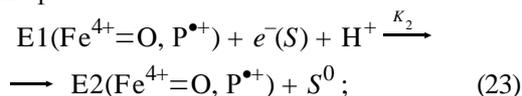


где  $E(Fe^{3+})$  — нативная форма пероксидазы.

В дальнейшем происходит прямое электровосстановление E1 на поверхности электрода до ферропероксидазы. При этом донором электронов выступает электрод:



Кроме того, восстановление E1, протекающее как двухстадийный процесс, возможно в гомогенной фазе:



здесь  $S$  означает отличный от электрода донор электронов.

Донор электронов  $S$  может быть одновременно и донором протонов, как это имеет место в случае фенолов, или же быть донором только электронов, как это наблюдается для иодидов. При анализе каталитической активности пероксидазы исходят из приведенной кинетической схемы, независимо от способа закрепления пероксидазы на поверхности электрода.

Явление переноса заряда в электрохимических сенсорных системах является ключевой проблемой, поскольку тип проводимости и организация электрического контакта между энзимом и электродом определяют чувствительность сенсорного устройства. По типу обмена зарядами биосенсоры можно разделить на три генерации. В электрохимических сенсорах первой генерации обмен электронами происходит посредством системы  $O_2/H_2O_2$ . Ко второй генерации принадлежат сенсоры, в которых перенос электронов осуществляется специально введенными электронными челноками — медиаторами. И, наконец, третья разновидность соответствует безмедиаторному электронному переносу при наличии прямого электрического контакта энзима с преобразователем. Разработка последнего типа сенсоров стала возможной благодаря использованию новейших достижений нанотехнологий и технологий молекулярного штампования.

**3.3. Имобилизация биологически активных компонентов на твердой поверхности.** Активный слой биосенсора образуется на твердотельном преобразователе, в связи с чем возникает проблема "биологизации" поверхности: каким образом нанести биологически активный компонент и как закрепить его на поверхности преобразователя. Существующие методы иммобилизации для удобства можно разделить на физические, при которых связывание частиц происходит под действием сил физической природы, и химические, когда свя-

зывание происходит за счет образования ковалентных связей. Независимо от типа иммобилизации при ее осуществлении должна быть максимально сохранена каталитическая активность энзима без денатурации. Физические методы иммобилизации энзимов осуществляют не непосредственно на поверхности электрода, а на промежуточных слоях, которые служат своеобразной матрицей чувствительного слоя сенсора. Материалы матриц чувствительного слоя и их доля в общем балансе по данным 303 публикаций представлены на диаграмме (рис. 19) [39]. Наиболее часто матрицей для вклинивания энзимов служит полипиррол, а из неэлектропроводных полимеров — сульфированный политетрафторэтилен (нафион). Преимуществом физической иммобили-

зации является простота, однако из-за слабо выраженной адсорбционной способности энзимов сенсор очень чувствителен к изменению pH, температуры, ионной силы, полярности и др. Поэтому получить этим методом энзимный электрод с точно заданным количеством адсорбированного энзима и, следовательно, фиксированной активностью трудно. Несмотря на это адсорбционный метод используют как пилотный или для изготовления устройств, не требующих длительной стабильности, например, сенсоров однократного использования.

### 3.3.1. Адсорбционная иммобилизация энзимов.

Вклинивание энзимов в структуру чувствительного слоя проще всего осуществить спонтанной адсорбцией непосредственно на поверхности преобразователя. Так была иммобилизована пероксидаза на поверхности золота [38] и дегидрогеназа на поверхности углеродного электрода [40], а также гем, который является аналогом естественной пероксидазы HRP на поверхности электропроводного стекла (ITO) [41]. Однако достичь стабильности и воспроизводимости характеристик энзимного электрода этим методом трудно и для улучшения свойств сенсора используют сшивающие агенты наподобие

глутарового альдегида, модифицируют сам энзим или проводят совместную с другими компонентами адсорбционную процедуру. Комбинированный метод иммобилизации пероксидазы использовали в работе [42]. Процесс изготовления энзимного платинового электрода включал обработку платины спиртовым раствором нафиона с последующим взаимодействием с цистеином. К цистеиновому слою прививались наночастицы золота, на которых затем адсорбировалась пероксидаза. Последовательность стадий показана на рис. 20. Электрод был тестирован шестью различными субстратами — глюкозой, этанолом, уксусной кислотой, алкандиеновыми кислотами, 2-лизином, 2-лейцином — и

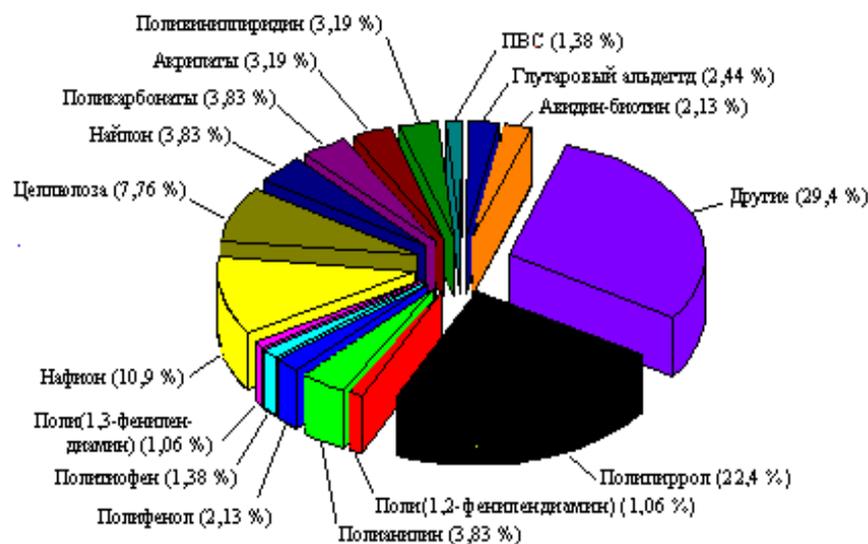


Рис. 19. Материалы для вклинивания энзимов.

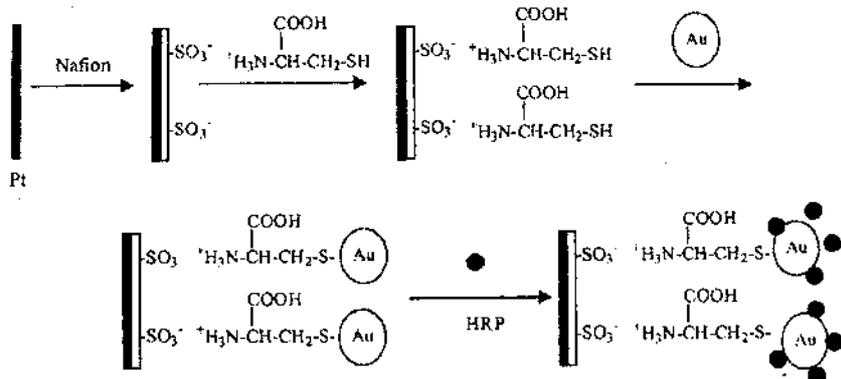


Рис. 20. Процесс иммобилизации пероксидазы (HRP) на платиновом электроде.

показал по отношению к ним высокую чувствительность и селективность.

Другой подход к созданию энзимных электродов базируется на липидных двухслойных мембранах. Вещества, содержащие достаточно длинные алкильные цепи типа тетраалкиламмониевых солей, диэфиров фосфорной кислоты, диглицератов, в водной среде образуют везикулы. Адсорбированные на поверхности электрода липиды формируют многослойную пленку, в которую при контакте с раствором энзима инкорпорируют частички энзима, что в итоге приводит к образованию энзимного электрода.

Перенесение липидной мембраны на поверхность электрода приводит к увеличению механической прочности по сравнению со свободной везикулярной структурой. Липидная мембрана на твердотельных носителях легко поддается модификации введением в ее структуру металлических микро- и наноразмерных частиц, фуллеренов, полимерных компонентов. С другой стороны, двухслойные липидные мембраны представляют собой прообраз клеточных мембран живых организмов. Поэтому они так хорошо совмещаются с естественной средой, с функцией "хозяина" для протеинов, рецепторов, фрагментов тканей и даже целых клеток без денатурации и с определенной ориентацией. Этими свойствами липосомных мембран воспользовались авторы при конструировании амперометрического сенсора для определения количества гомолитических бактерий [43].

### 3.3.2. Послойная иммобилизация энзимов.

Закрепить энзим на поверхности трансдюсера можно путем альтернативного нанесения слоя с противоположно заряженными ионогенными группами. Метод сборки "слой за слоем", в основе которого лежит электростатическая альтернативная адсорбция противоположно заряженных ионов, был открыт Дечером и Гонгом в 1991 г. [44]. Благодаря универсальности и простоте метод послойной инкорпорации пригоден для широкого ассортимента материалов, в том числе включающих протеины, наночастицы, красители и ДНК. Поверхность металла сначала модифицируют меркаптокислотами. Чаще всего для этого используют меркаптоундекановую [45] или 3-меркапто-1-пропансульфоновую кислоту [46]. В буферных растворах слой хемосорбированного меркаптосоединения заряжается отрицательно. Следующий положительно заряженный слой формируют электростатической адсорбцией поликатионогенных частиц, например, полиалиламин гидрохлоридом. Отрицательный заряд на частицах энзима обусловлен

карбоксильными группами. Последовательность стадий послойной иммобилизации протеинов на поверхности золотого электрода показана на рис. 21. Введение в структуру чувствительного слоя наноструктурированных объектов кардинальным

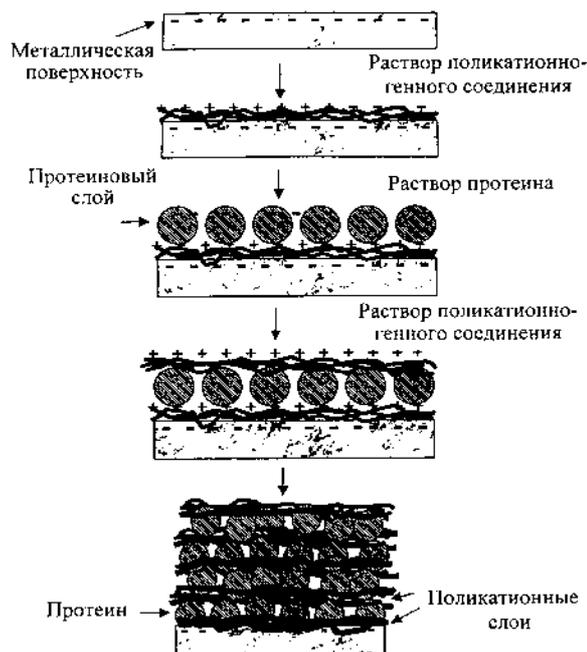


Рис. 21. Последовательность стадий закрепления протеина на поверхности электрохимического трансдюсера послойным методом.

образом меняет свойства энзимного электрода. Например, если глюкозооксидазу модифицировать одностенными углеродными нанотрубками, то окислительный пик тока увеличивается в 1.4—4 раза. Собранный послойным методом цитохромный электрод, в котором альтернативными слоями были полидиалилдиметил аммоний хлорид и наноразмерные частицы цеолита, обеспечивал стабильный амперометрический отклик при окислении  $H_2O_2$  в течение пяти месяцев [47].

**3.4. Ковалентное связывание.** Большой преградой в использовании адсорбционного метода связывания энзимов с трансдюсером является слабость взаимодействия компонентов и, как следствие, недостаточная стабильность сенсорного устройства. Чтобы обойти эти препятствия, был предложен новый подход ковалентного соединения энзимных молекул. Прямая иммобилизация глюкозооксидазы на индий-оловооксидном электроде (ИТО) возможна благодаря образованию эфирной связи между поверхностными ОН-группами ИТО и карбоксильными группами на поверхности про-

теина. Методом кристаллического кварц-микробаланса был подтвержден факт прямой иммобилизации глюкозооксидазы со степенью покрытия, равной  $4.8 \cdot 10^{-12}$  моль/см<sup>2</sup> [48]. По мнению авторов, хорошо воспроизводимое образование монослоя глюкозооксидазы на поверхности ИТО жестким связыванием молекул энзима к поверхности электрода позволяет измерять содержание глюкозы в анализируемой пробе с высокой точностью и воспроизводимостью.

В связи с ограниченностью электродных материалов с функциональными группами для химического связывания вместо прямого проводят опосредствованное связывание. Так, глюкозооксидазу к золотому электроду, который был преобразователем в глюкозном сенсоре, прививали с помощью 1,6-гексадиола [49]. Включение в архитектуру сенсора золотых наночастиц увеличивало ток отклика и обеспечивало стабильную работу в течение двух месяцев вследствие хорошей биосовместимости наночастичек золота, сильного ковалентного взаимодействия между частицами золота и дитиолом, а также между золотом и дополнительно введенным цистамином, цистамином и глюкозооксидазой. Прививка глюкозопероксидазы HRP реализована на синтетическом нанокристаллическом алмазном электроде с использованием сшивающего агента 2,2,2-трифтор-N-9-децил ацетамида [50]. Импедансной спектроскопией было установлено, что модифицированный электрод представляет собой двухслойную структуру, схематическое изображение которой приведено на рис. 22.

Степень покрытия электрода пероксидазой (Г), определенная по количеству электричества, израсходованного в катодном процессе, равнялась  $2 \cdot 10^{-10}$  моль/см<sup>2</sup>. При условии, что покрытие однородно, объем гидратированной части энзима составляет  $35 \times 60 \times 75 \text{ \AA}^3$ . Близость гем-групп пе-

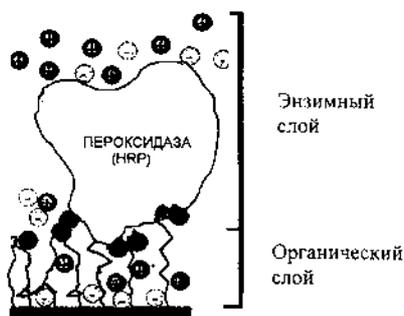


Рис. 22. Схематическое изображение двухслойной структуры модифицированной поверхности нанокристаллического алмаза.

роксидазы к поверхности наноструктурированного алмаза делает возможным прямой электронный перенос между ними, вследствие чего на вольт-амперограмме появляются два разделенных одноэлектронных пика тока при 0.05 и 0.29 В, которые отнесены к катодному и анодному процессам соответственно. Модифицированный алмазный электрод — характерный пример биосенсора третьего поколения для определения перекиси водорода.

**3.5. Иммобилизация энзимов в гелеобразные структуры.** Водорастворимые полимеры наподобие поливинилового спирта, полиакриламида, полиакриловой и полиметакриловой кислот, поливинилпирролидона, желатина, агар-агара, а также многочисленные гель-золевые системы, синтезированные из алкоксидов металлов, образуют трехмерные пространственные структуры. Для них свойственно высокое сродство к биологическим компонентам, благодаря чему они представляют собой идеальные матрицы для инкорпорации биологически активных компонентов. Перспективны так называемые гибридные органо-минеральные материалы, которые сочетают в себе свойства, присущие неорганическим (высокая кристалличность, твердость, механическая прочность, проводимость и магнитная восприимчивость) и органическим (гибкость, пластичность, легкость переработки и изготовления деталей литьем под давлением, штампованием) компонентам. Более того, во многих случаях наблюдается синергизм свойств. Энзимы, инкорпорированные в гель-золевые матрицы, часто проявляют более высокую активность, селективность и линейность отклика в широком диапазоне изменения концентрации аналита по сравнению с привитым с помощью глутарового альдегида. Гель-золевые структуры легко модифицируются введением различных реагентов. Электрокаталитическая активность окисления  $\text{H}_2\text{O}_2$ , который образуется на энзимном электроде при окислении глюкозы глюкозооксидазой, существенно выше в присутствии наноразмерных частиц платины. Наблюдаемый синергизм проявляется в резком уменьшении перенапряжения окисления перекиси водорода, что повышает чувствительность сенсора при анализе на содержание глюкозы в присутствии аскорбиновой, уриновой кислот и ацетаминофена, находящихся в физиологических растворах [51]. Интересные данные были получены с функционализированным аминокислотами полисахаридом читосаном. Карбоксильные группы читосана взаимодействуют с аминокислотными группами, содержащимися в белковой оболочке энзима, а образующийся комплекс стабилизируется электростатическим

взаимодействием (рис. 23). С другой стороны, в процессе переноса электронов участвуют каналы проводимости из наночастиц золота, которые сокращают расстояние между электродом и активными центрами энзима.

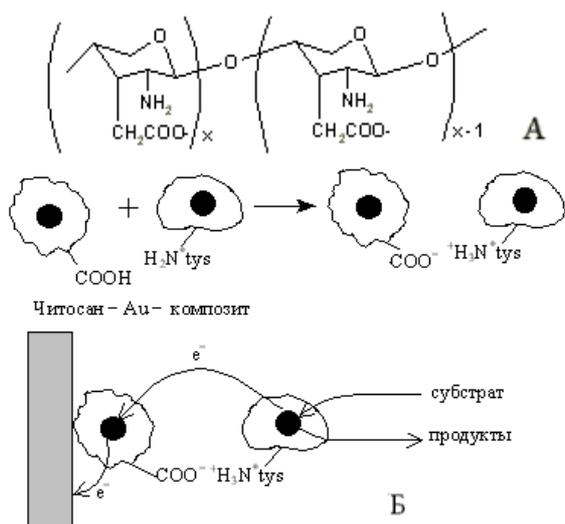


Рис. 23. Структурная формула модифицированного хитосана (А), схематическое изображение электростатического связывания хитосан—Au нанокompозита с глюкозопероксидазой и электронного переноса от редокс-центров HRP к электроду (Б).

Интегрированием вольт-амперной кривой определены общее количество перенесенных зарядов в анодном процессе окисления гема HRP ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + e^-$ ) и поверхностная концентрация протеина:

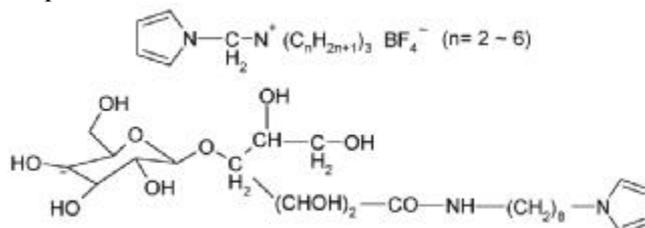
$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}, \quad (25)$$

где  $Q$  — количество перенесенного электричества в кулонах;  $n$  — число электронов;  $A$  — геометрическая площадь электрода.

Рассчитанное по уравнению (25) количество пероксидазы было равным  $3.91 \cdot 10^{-9}$  моль/см<sup>2</sup>, что составляло 21.17 % от общего количества осажденного на электроде энзима. Отсутствие монослойного покрытия указывает на трехмерную структуру нанокompозиции золь-гелевой матрицы.

**3.6. Захват и закрепление биомолекул электрохимически образованными полимерными пленками.** Электрохимическое возбуждение реакций полиприсоединения благодаря своей простоте незаменимо при получении тонких полимерных слоев на электропроводных поверхностях. Большинство электрохимически осажденных полимерных пленок для иммобилизации биомолекул

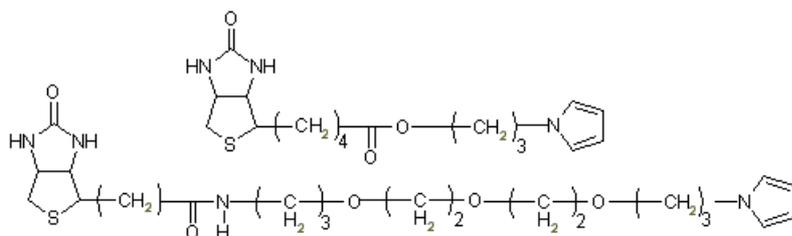
состоят из электропроводных полимеров, среди которых самым распространенным является полипиррол. Достаточно сказать, что лишь в журнале *Electrochimica Acta* с 1990 по 2005 год опубликовано 300 статей, посвященных полипиррольным биоаналитическим сенсорам [52]. Благодаря тому, что синтез полипиррола протекает в близкой к нейтральной среде, инкорпорация энзимов возможна посредством захвата их макромолекул растущими полипиррольными цепями или сополимеризацией при наличии в биомолекулах электроактивных групп. Иными словами, фермент здесь выступает в качестве допанта [53]. Однако иммобилизация биомолекул электрохимическим вклиниванием в структуру полимерной пленки требует высоких концентраций мономера и энзима. Точно определить количество инкорпорированного биоматериала невозможно. Это усложняет кинетический анализ и оптимизацию многослойных энзимных электродов. Чтобы обойти эти трудности, был предложен иной подход к иммобилизации, который сводился к совместной адсорбции на поверхности электрода энзима и мономера перед электрополимеризацией. Увеличение адсорбционной способности можно достичь введением в молекулярную структуру мономера полярных групп. Структура амфифильных производных пиррола приведена ниже:



Электрополимеризация адсорбированных мономерных частиц в водном растворе обеспечивала необратимое вклинивание биомолекул в полимерную матрицу. Эффективность инкорпорированной глюкозооксидазы в полимерную сеть амфифильного полипиррола составляла  $19-33 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  в отличие от  $2-3 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  для обычных полипиррольных или полианилиновых пленок. Двухстадийная технология иммобилизации энзимов в электропроводные полимерные матрицы оказалась весьма полезной в создании двух-, а в последнее время и трехэнзимных электрохимических сенсоров, чувствительность которых линейно увеличивается в зависимости от количества инкорпорированного энзима.

Были синтезированы биотиновые производные пиррола, что дало импульс развитию нового

подхода к иммобилизации ферментов, получившего название авидин-биотиновой технологии [54]. В качестве исходных соединений для получения полимерной матрицы обычно используют биотиновые производные пиррола:



По месту биотиновых функциональных групп в полимерной пленке прививают молекулы авидина, представляющего собой низкомолекулярный яичный белок. Вследствие этого образуются биотин-авидиновые мостики. Взаимодействие биотинилированного фермента с несвязанными центрами авидина в конечном итоге приводит к ферментному электроду (рис. 24).

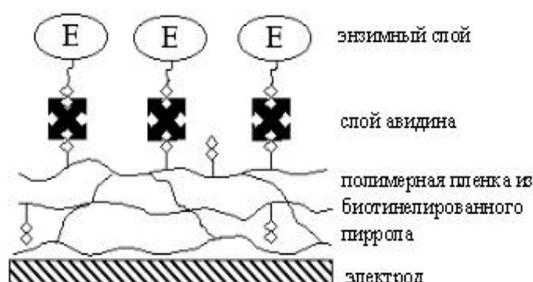


Рис. 24. Схема иммобилизации биотинилированной глюкозооксидазы на электрополимеризованной пленке авидин-биотиновыми мостиками.

Авидин-биотиновая технология позволяет формировать мультислойные структуры. При этом, как и в случае адсорбционного метода, чувствительность глюкозного сенсора линейно возрастает с увеличением числа слоев ферментного электрода.

**3.7. Метод молекулярного импринта.** По аналогии с биологическими рецепторами молекулярно-специфический распознавательный чувствительный слой биосенсорного устройства можно создать методом молекулярного штампирования или молекулярного импринта. Если к исходной полимеризационной смеси, содержащей мономер и сшивающий бифункциональный агент, добавить органические молекулы заданной структуры (тэмплейт) и запolyмеризовать, то тэмплейтные молекулы будут „замурованными“ в образованной после завершения полимеризации полимерной мат-

рице. После обработки органическим растворителем и экстракции тэмплейтных молекул в полимерной матрице образуются пустоты, которые по размерам и форме будут соответствовать молекулам тэмплейта. Функциональные группы мономерных звеньев ориентированы и занимают позиции вокруг щели в соответствии с химической структурой молекулы тэмплейта. При контакте чувствительного слоя с раствором аналита в штампы полимерной матрицы проникают лишь те частицы, которые по размерам и форме близки к размерам щелей. Частицы аналита

удерживаются в пустотах химическим связыванием или за счет действия сил сорбционного взаимодействия. Нековалентные импринтные матрицы в синтетических распознавательных материалах получили большое распространение в биосенсорике, поскольку вследствие обратимости связывания в комплексе "хозяин—гость" достигаются большие скорости регенерации активного слоя и уменьшение времени формирования отклика. Преимущества нековалентного связывания были продемонстрированы на примере системы, в которой в качестве функционального мономера использовали 4-винилпиридин, тэмплейта — полифункциональный фенол (кверцетин) и сшивающего агента — этиленгликоль диметакрилат [55]. Молекулярно-импринтная полимерная система (МИПС), которая работала по принципу конкурентной сорбции частиц аналита, тщательно исследовалась с целью выяснения молекулярного механизма распознавания. На основании данных ЯМР- и ИК-спектроскопии было показано, что распознавательная функция МИПС определяется молекулярным взаимодействием мономер—тэмплейт и стабильностью препolyмеризационного комплекса. Молекулярное распознавание МИПС-систем, состоящих из электропроводных полимеров, проводится мониторингом электрохимических сигналов. Для этого используют перекисленный полипиррол, в цепях которого содержатся гидроксильные или карбонильные функциональные группы. Перекисленный полипиррол одинаково пригоден для импринта как малых, так и больших молекул. При этом полипиррольные цепи способны обеспечить прямой электрический контакт активных центров протеина, которые глубоко скрыты в макромолекулярных цепях, и исключить необходимость медиаторов.

Далее рассмотрим некоторые типы сенсоров по их функциональному назначению.

## 4. Биосенсоры.

**4.1. Глюкозный биосенсор.** Более сорока лет внимание исследователей устремлено на разработку глюкозных биосенсоров для быстрого, точного и непрерывного мониторинга за уровнем глюкозы в жидких биологических выделениях больных сахарным диабетом. Интенсивная терапия и тщательный контроль уровня глюкозы в крови — ключевой элемент предотвращения развития осложнений. Определение глюкозы возможно двумя путями — прямым и косвенным. Принцип прямого определения количества глюкозы в анализах с помощью электрохимического окисления рассмотрен в разделе 2.5. Идея катализируемого энзимами определения глюкозы по количеству поглощенного кислорода принадлежит Кларку и Лиону [31]. Однако системы определения, опирающиеся на использование кислорода как физиологического акцептора, имеют недостаток, поскольку здесь не исключены ошибки вследствие флуктуаций потоков кислорода и глюкозы. Чтобы полностью элиминировать потребление кислорода в реакциях, катализируемых глюкозооксидазой, в систему вводили посредники с функцией переносчиков электронов от активных центров энзима к электроду. Концепция опосредованного электронного переноса была предложена впервые Альбери с сотрудниками [56], которые установили теоретическую зависимость потенциала от скорости электрокаталитического электронного обмена. Опосредованный электронный обмен зависит от типа медиатора, потенциала рабочего электрода и величины тока поляризации. В качестве иллюстрации рассмотрим два примера глюкоз-

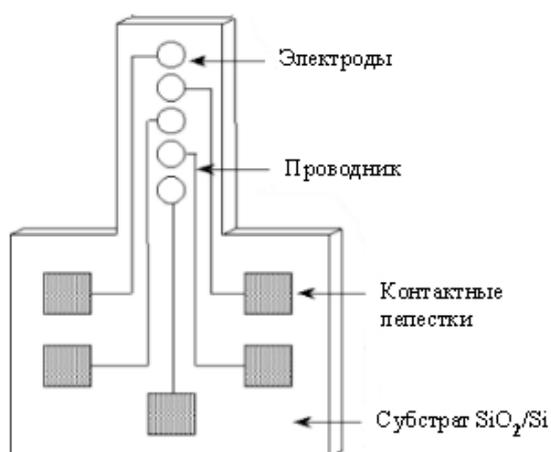


Рис. 25. Схема конструкции пятиэлектродной сборки сенсора для определения глюкозы, лактата и пировиноградной кислоты.

ных биосенсоров. Первый сконструирован на основе гель-золевой органоминеральной платформы, биосовместимой с биологическим материалом и обеспечивающей сохранение биокаталитических свойств глюкозооксидазы на протяжении относительно большого промежутка времени. Энзимный сенсор характеризовался временем отклика 15—20 с, чувствительностью 56 мкА/см<sup>2</sup>·ммоль и максимальной границей концентрации глюкозы — 300 ммоль [57]. Преимущества наноструктурированных чувствительных материалов были продемонстрированы при создании сенсора, пригодного для определения глюкозы, лактата и пировиноградной кислоты. С целью повышения надежности сенсора была изготовлена пятиэлектродная матрица, схематически представленная на рис. 25 [58].

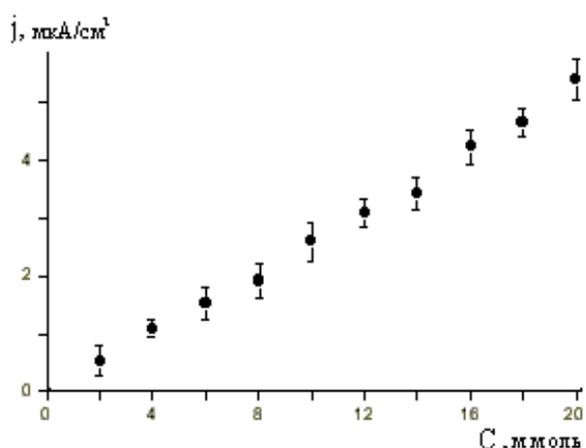
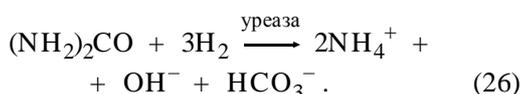


Рис. 26. Амперометрический отклик пятиэлектродного сенсора в зависимости от концентрации глюкозы.

Общий отклик пятиэлектродного глюкозного сенсора показан на рис. 26. Эффективная работа сенсора обеспечивалась опосредованным электронным переносом от энзима через редокс-полимер до электрода. Для шага изменения концентрации 2 ммоль время отклика было меньше 20 с. Такой относительно быстрый отклик являлся следствием малой толщины многослойной пленки.

**4.2. Карбамидный биосенсор.** Метаболические функции живых организмов хорошо патернизируются изменением концентрации карбамида в крови и моче. Поэтому определение карбамида часто используется в клинических лабораториях, но поскольку карбамид выпускается промышленностью, то и в заводских. Принцип действия карбамидного сенсора сводится к каталитическому превращению мочевины в присутствии естественного фермента уреазы:



Мониторинг каталитически конвертированных продуктов осуществляется потенциометрически, кулонометрически или амперометрически. Предложена методика изготовления карбамидного сенсора иммобилизацией уреазы в поли(N-винилкарбазольной) пленке Ленгмюра–Блодже. Уреаза катализирует разложение мочевины, и возникающий вследствие этого потенциометрический отклик измеряется анализатором аммонийных ионов. Изменение активности чувствительного слоя в зависимости от концентрации карбамида показано на рис. 27 [59]. Линейность калибровочного графика наблюдается на двух участках концентраций мочевины 0.5–10 и 10–68 ммоль. Карбамидный электрод можно использовать 10 раз. Стабильность сенсора изменяется приблизительно на 5 % при его хранении в течение 5 недель. Более чувствительный и менее инертный уреазный сенсор создан на полианилиновой платформе. Чувствительный слой формировали электрохимической полимеризацией стабилизированной додецилсульфатом эмульсии ани-

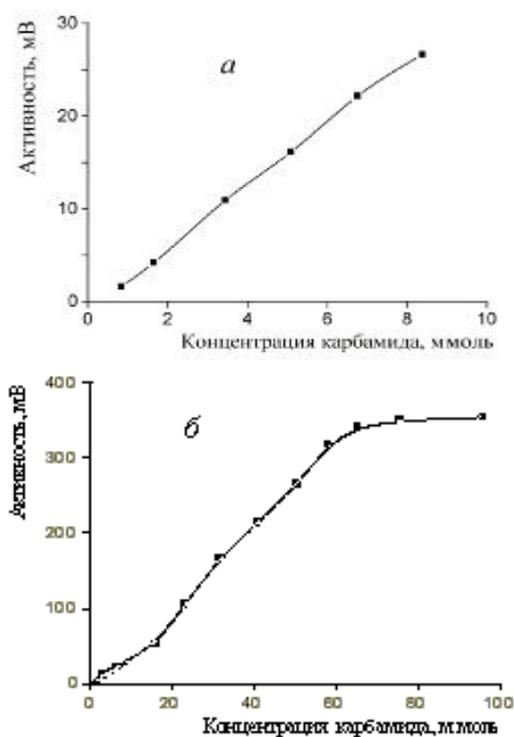
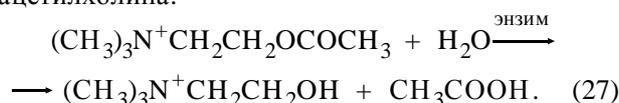


Рис. 27. Потенциометрический отклик уреазного сенсора при изменении концентрации мочевины от 0 до 10 (а) и от 0 до 93 ммоль (б).

лина в присутствии поликарбонатной мембранной матрицы [60]. Синтезированный в данных условиях полианилин сохраняет электропроводность вплоть до рН 7, тогда как обычный теряет электропроводность при значениях рН, превышающих 3. Разработан исключительно чувствительный иммуносенсор на основе полианилин-протеиновых композитных матриц. Использование уреазы, сопряженной с антителом, и мочевины как субстрата позволило определить амперометрически иммуноглобин кроликов в пределах от 50 до 200 нг/мл с нижней границей 10 нг/мл.

**4.4. Поллютантные биосенсорные системы.** Помимо загрязнителей техногенного происхождения, серьезные нарушения равновесия в окружающей среде вызывают широко применяемые в сельском хозяйстве средства защиты и стимуляторы роста растений. В последнее время повышенный интерес вызывают органофосфатные и карбонатные пестициды с широкой гаммой биологической активности и относительно низкой устойчивостью по сравнению с применяемыми ранее хлорорганическими. Среди биоаналитических методов их определения получили распространение методы, основанные на ингибировании холинэстераз [61]. Покрытый слоем полианилина стеклоглеродный электрод служил платформой для иммобилизации бутирилхолинэстеразы при помощи сшивания глутаровым альдегидом. Модифицированная полианилином поверхность электрода обеспечивала стабильный потенциометрический отклик в присутствии пестицидов. Холинэстеразный сенсор давал надежные результаты при определении пестицидов в сливных водах. Потенциометрический отклик холинэстеразного сенсора формировался в результате биокаталитического гидролиза ацетилхолина:



Все апробированные пестициды необратимо ингибировали реакцию (27), вследствие чего изменялся потенциал электрода. По величине изменения потенциала определяли концентрацию пестицида.

К наиболее распространенным поллютантам относятся полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), содержащие два и более конденсированных ароматических кольца. ПАУ образуются главным образом в процессах неполного сгорания, распространяясь в атмосфере. Они происходят в основном от нефти или угля, которые

используются в промышленных процессах при сжигании, в двигателях внутреннего сгорания, обогревателях и т.п. Канцерогенный и мутагенный потенциалы ПАУ и их одновременное присутствие в окружении обусловили включение 16 ПАУ в перечень главных загрязнителей питьевой воды. Тот факт, что большинство ПАУ похожи по молекулярной структуре (отсутствие боковых функциональных групп), делает невозможным продуцирование специфических антител лишь для одного соединения. Поэтому в иммуносенсорных системах часто используют одно антитело для определения общей концентрации ПАУ или одного соединения (бензпирена) в качестве репрезентативного маркера. Использование в одном сенсоре нескольких антител позволяет формировать различные сигналы для различных антител и получать больше информации о составе смеси ПАУ. Амперометрический иммуносенсор реализован с использованием углеродного электрода, изготовленного печатным способом [62]. Электрод покрывался конъюгатом альбумина, выделенного из сыворотки печени и фенантрена. Амперометрическое определение осуществляли с помощью меченого щелочным фосфатом конъюгата. Связанный фермент специфически конвертировал субстрат в определяемый компонент. К числу наиболее опасных поллютантов относится 2,4-динитрофенол. Токсикологические исследования на животных показали, что летальная доза его составляет от 14 до 43 мг/кг. Вредное действие динитрофенола, как полагают, обусловлено влиянием на метаболизм на клеточном уровне, главным образом, при ингибировании процессов в митохондриях печени. Для определения 2,4-динитрофенола был предложен иммуногенный флуоресцентный сенсор, который базировался на анализе взаимодействия антитела с антигеном в растворе [63]. Более эффективное иммуносенсорное устройство основано на гомогенной электрохимически генерированной люминесценции [64]. Использовалась модельная система — меченый люминолом дигоксин и альбумин, выделенный из сыворотки печени, в качестве переносчика протеина. Предложены две сенсорные формы: одна — для прямого детектирования антитела антидигоксин, другая — для сравнительного иммуноанализа при определении дигоксина. На рис. 28 показана зависимость интенсивности ЭХЛ от количества добавленного антитела.

Метод ЭХЛ-детектирования намного чувствительнее электрохимического, а калибровочная кривая сохраняет линейность в широких границах концентрации антитела.

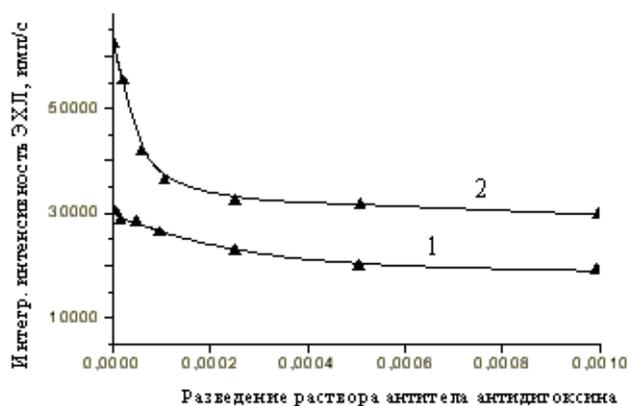


Рис. 28. Зависимость интенсивности ЭХЛ от степени разведения антидигоксина при различных концентрациях конъюгата люминол—альбумин—дигоксин:  $2,5 \cdot 10^{-7}$  (1) и  $5,0 \cdot 10^{-7}$  моль (2).

**4.6. Биосенсорные устройства для анализа воды и продуктов питания.** Определение патогенных организмов в воде и продуктах питания — важнейшая проблема их сохранения. Отметим, что 40 % от общего числа 50 миллионов человек ежегодно умирает от инфекционных болезней. Существующие методы определения бактериальных патогенов весьма трудоемки, долговременны, а интерпретация результатов достаточно сложная. Для этих целей в последнее время были предложены генносенсорные устройства, получившие название генных зондов. Большинство ген-зондовых систем фокусируется на определении специфических последовательностей ДНК или РНК с использованием цепной реакции полимеризации для усиления сигнала. Обычно предпочитают молекулярные мишени из РНК. Модельным организмом для разработки РНК-биосенсоров часто выбирают бактерии *Escherichia coli*, естественными колониями которой являются кишечные тракты человека и теплокровных животных. Биосенсорная система на основе иммобилизованных в агар-агаровой матрице биолуминесцентных лент *Escherichia coli* была эффективной при определении токсичности перекиси водорода, фенола и митамидина С в воде [65]. Биолуминесцентный метод можно организовать без специальной культивации бактерий. Биолуминесцентный реагент для измерения аденозинтрифосфат (АТФ), дифосфат (ADP) и монофосфат (AMP) нуклеотидов получали добавлением пировиноградной киназы (энзим) к люциферазе из светлячков. Киназа катализировала процесс образования АТФ из ADP и AMP и сложного эфира пировиноградной кислоты и фосфоэнола. После этого добавляли аде-

нозин фосфат деаминазу для гашения люминесценции, вызванной распадом АТФ, АДФ и АМР. Суммарная интенсивность биолюминесценции в присутствии АТФ в 43 раза превышает интенсивность в типичных биолюминесцентных системах [66].

Биосенсорные системы широко применяются для мониторинга тропических фруктов и соков из них на всех стадиях производства, хранения и транспортировки. Созревание и зрелость фруктов обычно характеризуют изменением цвета, аромата и текстуры. Индикаторами качества фруктов и соков являются D-глюкоза, фруктоза, сахароза, лимонная, яблочная и аскорбиновая кислоты. Обычно эти компоненты определяют по количеству образовавшейся в энзимной реакции перекиси водорода.

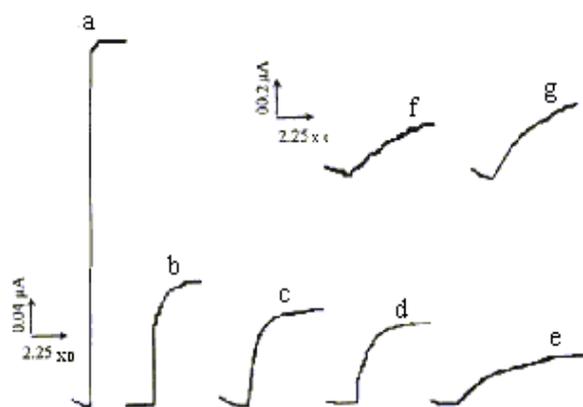


Рис. 29. Токовые отклики композитного графит-тефлонового алкогольоксидазо-пероксидазо-ферроценового электрода в присутствии  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л метанола (a), этанола (b), пропанола (c), пентанола (e) и  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л изопропанола (f) и изобутанола (g). pH 7.4.

Во многих отраслях производства продуктов питания необходим контроль за технологическими процессами и маркирование качества продукции. Например, содержание алкоголя является важным показателем качества продуктов питания и напитков, а также используется в клинической диагностике. Для достижения устойчивости, надежности, многократного использования биосенсорных систем и безотказного мониторинга спиртов была предпринята попытка изготовления графит-тефлоновых электродов путем совместной инкорпорации глюкозооксидазы, пероксидазы и ферроцена [67]. Конструировать биосенсор с инкорпорированными в композитные тефлон-графитовые таблетки энзимов и медиатора легко и экономически выгодно. Активность электрода вос-

становливают простым полированием. На рис. 29 приведены токовые отклики композитного электрода в присутствии алифатических спиртов. Для нормальных спиртов величина отклика уменьшается в ряду: метанол > этанол > пропанол > бутанол > пентанол. Отклик для изоалкоголей значительно ниже по сравнению со спиртами нормальной строения. Контроль за содержанием в алкогольных напитках метанола необходим вследствие его высокой токсичности. Было найдено, что содержание метанола в некоторых видах ликеров может составлять 3.5 г/л, поэтому потребление этих напитков сопряжено с большим риском для здоровья.

### 5. Итоги и перспективы.

Как видим, современная сенсорика развивается по двум направлениям: хемосенсорика и биосенсорика. Хемосенсорика базируется на тонкопленочных технологиях, которые были разработаны для нужд микроэлектроники. Технические приемы вакуумного напыления, литографии, получения печатных схем, а в последнее время и нанотехнологии были успешно акцептированы хемосенсорикой и практически реализованы для создания хемосенсоров. Биосенсорика развивается независимо с учетом достижений биотехнологии. К настоящему времени разработаны физико-химические основы формирования отклика чувствительного слоя при экспонировании частицами аналита, электронные системы обработки сигналов преобразователя и предложены математические модели работы сенсорных устройств. Благодаря высокой чувствительности, короткому времени формирования отклика, возможности реактивации активного слоя, хемо- и биосенсорика широко применяется для мониторинга технологических процессов, экологических загрязнений окружающей среды, качества продуктов питания. Значение биосенсорики для медико-биологической диагностики и систем транспорта лекарственных препаратов в живых организмах трудно переоценить. Особое место в сенсорике занимают электрохимические сенсоры, изготовление которых стало доступным в любой химической лаборатории.

Свидетельством важности сенсорики являются специальные периодические издания, например, *Sensors and Actuators*, *Biosensors and Bioelectronics*. Статьи по проблемам сенсорики печатаются во всех ведущих изданиях мира.

Дальнейшее развитие этого перспективного направления будет идти по пути поиска новых синтетических и естественных материалов и модифицирования существующих для изготовле-

ния активных компонентов сенсорных устройств. Преимущественно будут использоваться матрицы из электропроводящих полимеров. Удельный вес наноструктурированных материалов будет постоянно возрастать. Предпочтительными будут двух- и трехэнзимные безмедиа-торные системы. С целью увеличения надежности, точности и селективности измерений индивидуальные сенсоры объединяют в сборки — чипы и биочипы. Тенденция развития сенсорики будет охватывать создание мультисенсорных интегрированных систем с высоким уровнем автоматизации аналитических определений.

**РЕЗЮМЕ.** Розглянуто типи сенсорних пристроїв і фізико-хімічні засади формування електрохімічного відклику хімічно і біологічно активних поверхневих шарів. Описано матеріали, що застосовуються для виготовлення чутливих шарів, методи закріплення біологічно активних компонентів. Особливу увагу приділено наноструктурованим матеріалам у хемо- та біосенсоріці. Зроблено огляд найважливіших галузей застосування, відмічено досягнення і перспективи розвитку сенсорики.

**SUMMARY.** The article considers types of sensing devices and physicochemical principles of the formation of the electrochemical response of chemically and biologically active surface layers. Materials used for the fabrication of sensitive layers and methods for the fixation of bioactive components are described. Particular emphasis is given to nanostructured materials in chemo- and biosensors. The most important applications are reviewed, achievements and prospects for the development of sensorics are pointed out.

1. Neri G., Banarita A., Galragno S. et al. // Sensors and Actuators. -2002. -**B 82**. -P. 40.
2. Tai W.-P., Oh J.-H. // Ibid. -2002. -**B 85**. -P. 154.
3. More P.S., Khollam Y.B., Deshpande S.B. et al. // Mat. Let. -2003. -**58**. -P. 205.
4. Pamaki J., Maekqwa T., Miura N., Yamezoc N. // Sensors and Actuators. -1995. -**B 26-27**. -P. 49.
5. Zhang G., Liu W. // Ibid. -2000. -**B 69**. -P. 175.
6. Arshar K., Twomey K. // Sensors. -2002. -**2**. -P. 205.
7. Zhang J., Chen F., Su R. et al. // Ibid. -2002. -**2**. -P. 366.
8. Zhang J., Tejedor M.J., Anderson M.A. et al. // Ibid. -2002. -**2**. -P. 331.
9. Galastis K., Li Y. X., Wlodarski W., Comini E. et al. // Sensors and Actuators. -2002. -**B 83**. -P. 276.
10. Dutta A., Kaabuuathong N., Grilli M.L., Di Bartolomeo E. // J. Electrochem. Soc. -2003. -**150**. -P. H33.
11. Kar S., Pal B.N., Chandhuri S., Chakravorty D. // J. Phys. Chem. -2006. -**110**. -P. 4605.
12. Lin Y., Koep E., Lin M. // Chem. Mat. -2005. -**7**. -P. 3997.

13. Yoo J., Martin Van Assche F., Wachsmann E.D. // J. Electrochem. Soc. -2006. -**153**. -P. H115.
14. Ishihara T., Fuknyama M., Dutta H. et al. // Ibid. -2003. -**150**. -P. H241.
15. Li Y., Yang M.J., Camaioni N., Casalbore-Miceli G. // Sensors and Actuators. -2001. -**B 77**. -P. 625.
16. Klook J.P., Mourzina Y.G., Schbert J., Schoning M.J. // Sensors. -2002. -**2**. -P. 356.
17. Dickert F.L., Sikorski R. // Mat. Sci. Engin. C. -1999. -**10**. -P. 39.
18. Gong F.-Ch., Zhang X.-B., Guo C.-Ch. et al. // Sensors. -2003. -**3**. -P. 91.
19. Oshita Sh., Matsumoto A. // Chem. Eur. J. -2006. -**12**. -P. 2139.
20. Kamata K., Kawai T., Iyoda T. // Langmuir. -2001. -**17**. -P. 155.
21. Dai L., Soundarrajan P., Kim T. // Pure Appl. Chem. -2002. -**74**. -P. 1753.
22. Pandey P.C. // Sensors and Actuators. -1999. -**B 54**. -P. 210.
23. Mu Sh. // Biosensors and Bioelectronics. -2006. -**21**. -P. 1237.
24. Chen F., Tang W., Li Ch. et al. // Chem. Eur.J. -2006. -**12**. -P. 3082.
25. Ma X., Li G., Wang M. et al. // Ibid. -2006. -**12**. -P. 3254.
26. Liu H., Kameoka J., Czaplewski D.A., Craighead H.G. // Nanolett. -2004. -**4**. -P. 671.
27. Robinson J.A., Snow E.S., Badescu S.C. et al. // Ibid. -2006. -**6**. -P. 1747.
28. Hu Ch., Chen X., Hu Sh. // J. Electroanal. Chem. -2006. -**586**. -P. 77.
29. Le J., Park S.-M. // Anal. Chim. Acta. -2005. -**545**. -P. 27.
30. Jena B.K., Rai C.R. // Chem. Eur. J. -2006. -**12**. -P. 2702.
31. Clark L.C., Lyons C. // Ann. NY Acad. Sci. -1962. -**102**. -P. 29.
32. Calvente J.J., Narvaez A., Dominguez E., Andrey R. // J. Phys. Chem. -2003. -**107**. -P. 6629.
33. Calvo E.J., Wolosiuk A. // Chem. Phys. Chem. -2005. -**6**. -P. 43.
34. Warren S., McCormac T., Dempsey E. // Biochemistry. -2005. -**67**. -P. 23.
35. Lojou E., Binco P. // J. Electroanal. Chem. -2000. -**485**. -P. 71.
36. Gu H., Yu A., Chen H. // Ibid. -2001. -**516**. -P. 119.
37. Wang Q., Lu G., Yang B. // Langmuir. -2004. -**20**. -P. 1342.
38. Ferapontova E., Gorton L. // Bioelectrochemistry. -2002. -**55**. -P. 83.
39. <http://orion1.paisley.ac.uk>.
40. Razumiene J., Vilkauauskyte A., Gureviciene V. et al. // Electrochem. Acta. -2006. -**51**. -P. 5150.
41. Komori K., Takada K., Tatsuma T. // J. Electroanal. Chem. -2005. -**585**. -P. 89.
42. Liu X., Yuan R., Chai Y. et al. // Sensors and Actuators. -2006. -**B 115**. -P. 109.
43. Kim H.J., Bennetto H.P., Halablab M.A. et al. // Ibid. -**B 2006**. -**119**. -P. 143.
44. Decher G., Hong J.D. // Ber. Bunsen Ges Phys. Chem.

- 1991. -**95**. -P. 1430.
45. Wang Y., Joshi P.P., Hobbs K.L. et al. // *Langmuir*. -2006. -**22**. -P. 9776.
  46. Zhao W., Xu J.-J., Shi Ch-G., Chen H.-Y. // *Ibid.* -2005. -**21**. -P. 9630.
  47. Yu T., Zhang Y., Yu Ch. et al. // *Chem. Eur. J.* -2006. -**12**. -P. 1187.
  48. Fang A., Hg H.T., Li S.F.Y. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2003. -**19**. -P. 43.
  49. Suxia Zhang, Nu Wang, Huijun Yu et al. // *Bioelectrochemistry*. -2005. -**67**. -P. 15.
  50. Rubio-Retama J., Hernando J., Lopez-Ruiz B. et al. // *Langmuir*. -2006. -**22**. -P. 5837.
  51. Yang M., Yang Y., Liu Y. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2006. -**21**. -P. 1125.
  52. Ramanaricius A., Ramanaviciene A., Mailnauskas A. // *Electrochem. Acta*. -2006. -**51**. -P. 6025.
  53. Yang Y., Shaolin M. // *J. Electroanal. Chem.* -1997. -**432**. -P. 71.
  54. Cosnier S., Le Pellec A. // *Electrochem. Acta*. -1999. -**44**. -P. 1833.
  55. O'Mohony J., Molinelli A., Nolan K. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2006. -**21**. -P. 1383.
  56. Albery W.J., Bartlett P.N., Craston D.H. // *J. Electroanal. Chem.* -1985. -**194**. -P. 223.
  57. Pandey P.C., Upadhyay S., Shukla N.R., Shanma S. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2003. -**18**. -P. 1257.
  58. Revzin A.F., Sirkar K., Simonian A., Pishko M.V. // *Sensors and Actuators*. -2003. -**B8**. -P. 359.
  59. Singhal R., Cambhir A., Pandey M.K. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2002. -**17**. -P. 697.
  60. Kanungo M., Kumai A., Contractor A.Os. // *J. Electroanal. Chem.* -2000. -**528**. -P. 75.
  61. Trojanovich M., Hitchman M.L. // *Chem. Anal.* -1995. -**40**. -P. 609.
  62. Fahrnich K.A., Pravda M., Guilbault G.G. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2003. -**18**. -P. 73.
  63. Carter R.M., Blake R.C., Nguger T.D., Bostanian C.A. // *Ibid.* -2003. -**18**. -P. 69.
  64. Qi H., Zhang Ch. // *Anal. Chem. Acta*. -2004. -**501**. -P. 31.
  65. Kim B.Ch., Gu M.B. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2003. -**18**. -P. 1015.
  66. Sakabiara T., Murukami S., Ionei K. // *Anal. Biochem.* -2003. -**312**. -P. 48.
  67. Gusman-Vazgness de Prada A., Pena N., Revigo A.J., Pingarron J.M. // *Biosensors and Bioelectronics*. -2003. -**18**. -P. 1279.

Львовский национальный университет им. Ивана Франко  
Институт общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского  
НАН Украины, Киев

Поступила 22.05.2007