

УДК 541.138

ГЛЮКОЗООКСИДАЗНИЙ СЕНСОР НА МЕТАЛО-ПОЛІМЕРНІЙ ПЛАТФОРМІ

І. Демидчук, Я. Ковалишин

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна*

Синтезовано та досліджено композити на основі поліаніліну, карбонових нанотрубок та дрібнодисперсної платини. Синтезовані композити використано як платформи при конструюванні амперометричних глюкозооксидазних біосенсорів. Досліджено амперометричний відклик сенсорів на додані кількості глюкози, визначено чутливість та лінійний діапазон відклику біосенсорів, кінетичні параметри ферментативної реакції.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, поліанілін, карбонові нанотрубки, наночастинки платини.

Для конструювання амперометричних біосенсорів використовують ферменти, під час взаємодії яких з субстратом утворюється гідроген пероксид. За кількістю утвореного гідроген пероксиду судять про кількість субстрату. Наприклад, для визначення глюкози розроблено біосенсори на основі глюкозооксидази. Одним із продуктів реакції окиснення глюкози глюкозооксидазою є гідроген пероксид. Потенціал окиснення гідроген пероксиду є досить високим. За такого потенціалу можливе окиснення наявних у досліджуваних зразках домішок. Тому перспективним є аналіз процесу електрохімічного відновлення гідроген пероксиду. Значний прогрес у створенні біосенсорів став можливим завдяки використанню в них так званих медіаторів або переносників електронів. Огляд літературних даних [1–6] дає змогу зробити висновок про перспективність використання електроактивних полімерів та нанокompозитів на їхній основі як біосенсорних платформ. Ці матеріали відіграють роль медіатора в процесах електронного перенесення між електродом і ферментом завдяки здатності до оборотного окиснення-відновлення. Значний інтерес становлять карбонові нанотрубки, які забезпечують добрий електричний контакт між ферментом і електродом. Висока провідність, велика питома поверхня, придатність до модифікації бічних стінок, біосумісність робить їх ідеальними матеріалами в конструюванні електрохімічних сенсорів.

Ми використовували анілін $C_6H_5NH_2$ х.ч. виробництва Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Для приготування розчинів застосовували: гідрогенфосфат натрію $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ ч.д.а., дигідрогенфосфат калію $KH_2PO_4 \times 2 H_2O$ ч.д.а.; D-глюкозу ч.д.а., хлоридну кислоту х.ч., H_2O_2 х.ч.

Платиновий електрод модифікували плівками композитів на основі поліаніліну (рАн), одержаних методом електрохімічного синтезу із водного середовища. Досліджували електрохімічне відновлення гідроген пероксиду на модифікованих електродах у 50 мМ фосфатному буферному розчині з $pH = 7,0$. У цьому разі потенціал робочого електрода підтримували на рівні +0,10 В щодо насиченого аргентум-хлоридного електрода порівняння і порціями додавали розчин H_2O_2 , фіксуючи значення

струму. Модифіковані електроди використали як платформи для виготовлення глюкозооксидазних біосенсорів. Фермент іммобілізували на поверхні шляхом накрапування 5 мкл буферного розчину ($\text{pH} = 7,0$) з концентрацією глюкозооксидази 25 мг/мл, який висушували за кімнатної температури в атмосфері аргону. Для запобігання вимиванню глюкозооксидази поверх неї наносили нафіонову мембрану (шляхом накрапування і наступного висушування 10 мкл 1 % спиртового розчину). Хроноамперометричні дослідження глюкозооксидазних біосенсорів виконували в 50 мМ фосфатному буферному розчині з $\text{pH} = 7,0$. До буферного розчину, який був в електрохімічній комірці, порціями додавали розчин глюкози. Перемішували за допомогою магнітної мішалки. Потенціал робочого електрода становив +0,10 В відносно насиченого аргентум-хлоридного електрода порівняння. Кінетичні параметри (константу Міхаеліса та максимальну силу струму) відповідної ферментативної реакції обчислили з графіка Лайнуівера–Берка.

Полімеризацію аніліну (Ан) за наявності багатостінних карбонових нанотрубок (КНТ) виконували з водного розчину, у якому масове співвідношення Ан:КНТ становило 20:1. Відповідна циклічна вольтамперограма (ЦВА) зображена на рис. 1.

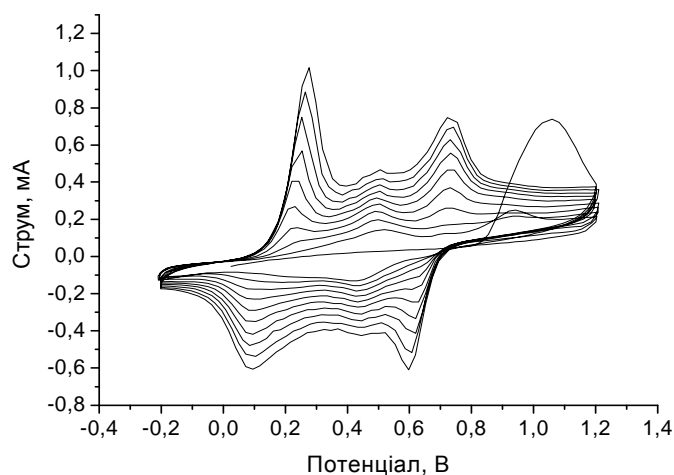


Рис. 1. ЦВА платинового електрода у 0,20 М розчині Ан в 0,50 М НСІ, який містить 0,93 мг/мл КНТ. Швидкість розгортки потенціалу – 50 мВ/с. Кількість циклів – 10

Амперометричний відклик модифікованого композитом рАн-КНТ електрода на додані кількості H_2O_2 показано на рис. 2. На основі композитного електрода виготовили глюкозооксидазний біосенсор. Відклик біосенсора на додані кількості глюкози показано на рис. 3.

Також дослідили властивості композитів поліаніліну з дрібнодисперсною платиною (дисп. Pt). Електрохімічне осадження дисп. Pt на модифікованих поліаніліном електродах виконували згідно з методикою [7], скануванням потенціалу в межах від 0,00 до +0,90 В у 0,15 М розчині H_2PtCl_6 (рис. 4).

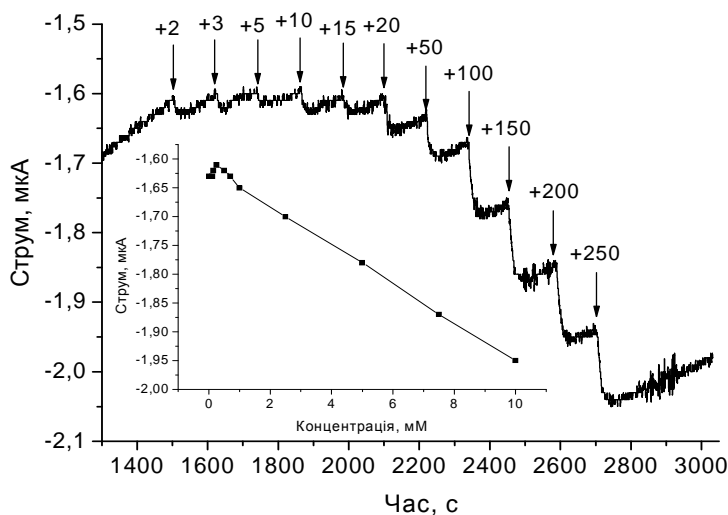


Рис. 2. Амперометричний відклик платинового електрода, модифікованого композитом рАн-КНТ. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 1,26 М розчину H_2O_2 . Потенціал робочого електрода – +0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації H_2O_2

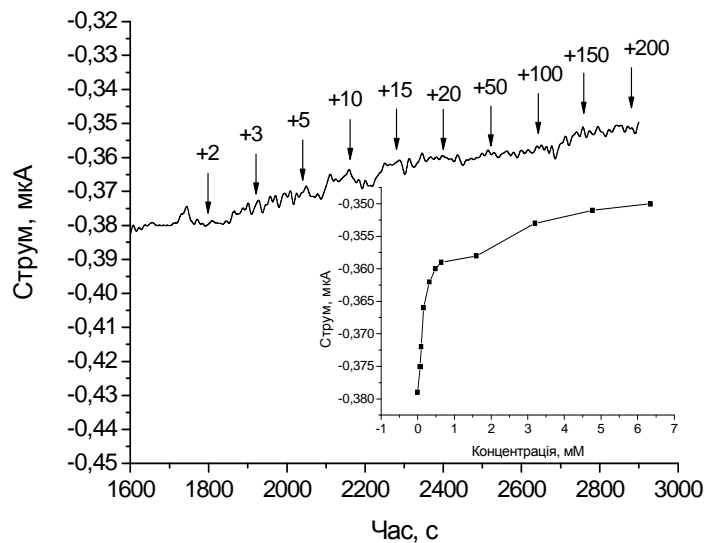


Рис. 3. Амперометричний відклик GOx-сенсора на композитній платформі рАн-КНТ. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – +0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

У цьому разі спостерігали зменшення струмів відновлення та практично незмінність струмів окиснення. На циклічній вольтамперограмі нема піків, які відповідають редокс-перетворенням поліаніліну. Очевидно, ці процеси блоковані окисненням водню (широкий максимум окиснення), який виділяється при потенціалах 0,0–0,1 В.

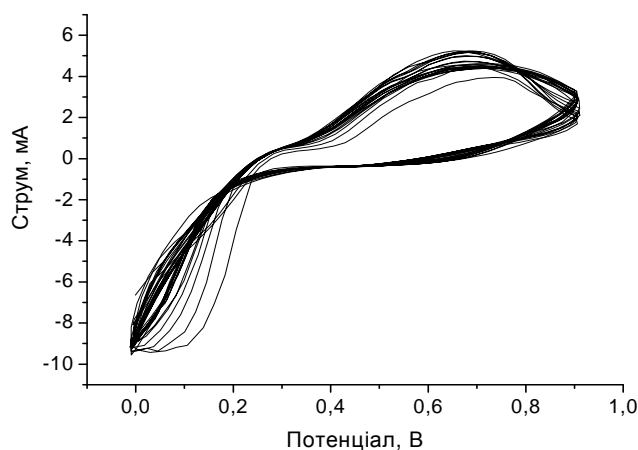


Рис. 4. ЦВА платинового електрода, покритого шаром рАн в 0,15 М розчині H_2PtCl_6 . Швидкість розгортки потенціалу – 50 мВ/с. Кількість циклів – 20

Досліджено відклик модифікованого композитом рАн-дисп. Pt електрода на додані кількості H_2O_2 (рис. 5) і відклик відповідного GOx-сенсора на додані кількості глюкози (рис. 6).

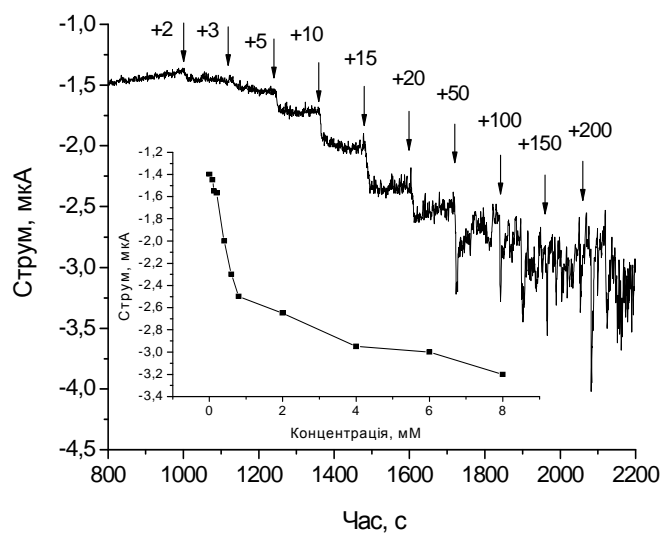


Рис. 5. Амперометричний відклик платинового електрода, модифікованого композитом рАн-дисп. Pt. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 1,01 М розчину H_2O_2 . Потенціал робочого електрода – +0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації H_2O_2

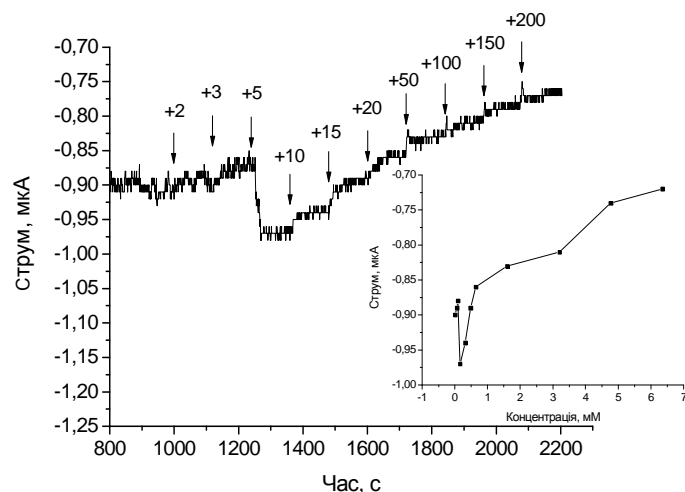


Рис. 6. Амперометричний відклик GOx-сенсора на основі композита рАн-дисп. Pt. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – +0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

У випадку, коли платиновий електрод модифікували композитом рАн-КНТ-дисп. Pt, струми відклику на додані кількості H_2O_2 є найбільшими (рис. 7).

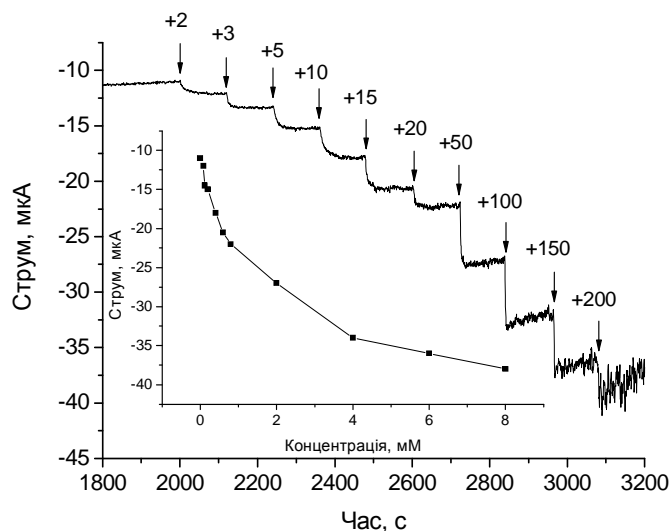


Рис. 7. Амперометричний відклик платинового електрода, модифікованого композитом рАн-КНТ-дисп. Pt. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 1,01 М розчину H_2O_2 . Потенціал робочого електрода – + 0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації H_2O_2

Було досліджено відклик GOx сенсора, сконструйованого на основі композита рАн-КНТ-дисп. Pt (рис. 8).

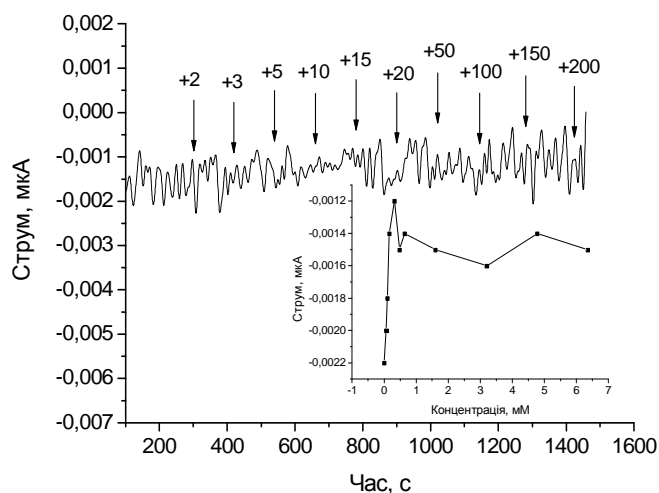


Рис. 8. Амперометричний відклик GOx-сенсора на основі композита рАн-КНТ-дисп. Рт. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – + 0,10 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

На підставі результатів виконаних досліджень з'ясовано, що хоча досліджувані композити виявляють електрохімічну активність у процесах відновлення H_2O_2 , після конструювання біосенсора ця активність зникає, очевидно, внаслідок взаємодії платформи з компонентами ферментної системи. Однак досліджувані системи не втрачають активності, якщо робочий потенціал дорівнює + 0,60 В. На рис. 9–11 зображено амперометричні відклики GOx-сенсорів на додані кількості глюкози при потенціалі робочого електрода +0,60 В.

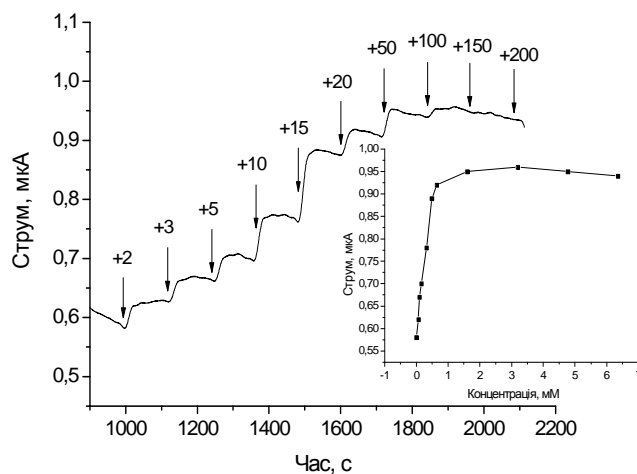


Рис. 9. Амперометричний відклик GOx-сенсора на композитній платформі рАн-КНТ. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – +0,60 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

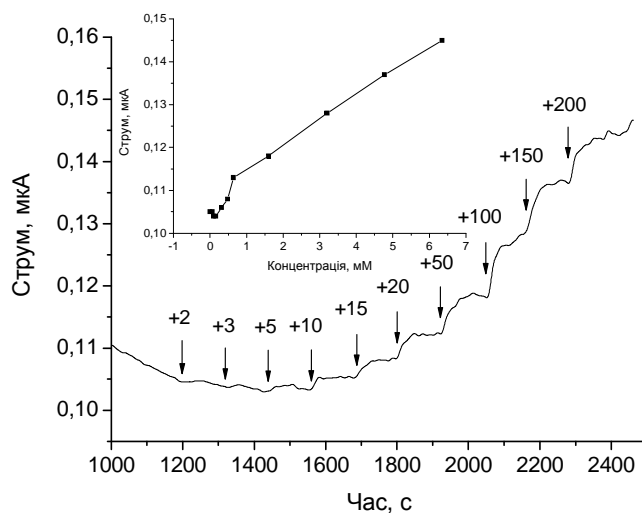


Рис. 10. Амперометричний відклик GOx-сенсора на основі композита рАн-дисп. Рт. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – +0,60 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

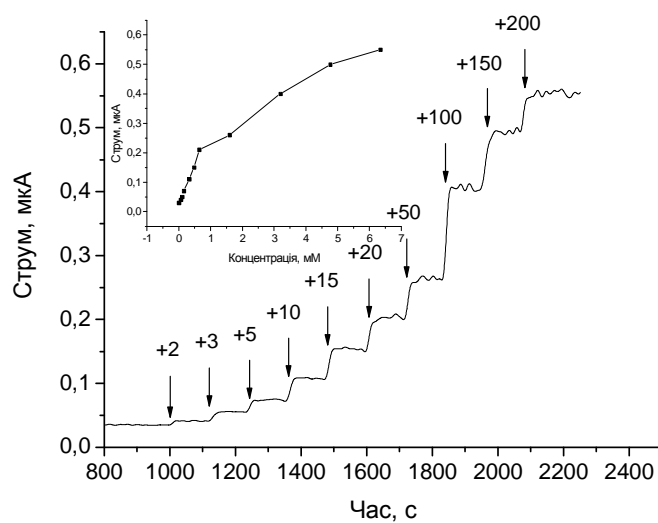


Рис. 11. Амперометричний відклик GOx-сенсора на основі композита рАн-КНТ-дисп. Рт. Числами над стрілками позначено об'єм (мкл) доданого 0,80 М розчину глюкози. Потенціал робочого електрода – +0,60 В. На вставці – залежність струму відклику від концентрації глюкози

Чутливість біосенсорів та кінетичні параметри ферментативної реакції окиснення глюкози наведено в таблиці.

Кінетичні параметри ферментативної реакції окиснення глюкози на композитах

Композит	Лінійний діапазон відклику, мМ	Чутливість, мА/М	I_{\max} , мкА	$K_M \times 10^5$, М
pAn-KHT	0–0,64	0,512	0,88	2,70
pAn-дисп. Pt	0–0,64	0,013	0,11	0,37
pAn-KHT-дисп. Pt	0–0,64	0,267	0,25	32,29

Уведення у композит наночастинок Pt призводить до погіршення характеристик досліджуваних сенсорів, що можна пояснити деградацією pAn під час осадження наночастинок Pt та негативною дією дрібнодисперсної Pt на компоненти ферментної системи, яка, очевидно, виявляється в каталізі процесів їхнього окиснення та деструкції.

Композит pAn-KHT є найефективнішою платформою у досліджуваних сенсорних системах, а також перспективною основою для подальшої розробки та модифікації сенсорних платформ.

1. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. М.: Техносфера, 2005.
2. *Dodevska T., Horozova E., Dimcheva N.* Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide on modified graphite electrodes: application to the development of glucose biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 386. N 5. P. 1413–1418.
3. *Lin Y., Liu K., Yu P. et al.* A facile electrochemical method for simultaneous and on-line measurements of glucose and lactate in brain microdialysate with prussian blue as the electrocatalyst for reduction of hydrogen peroxide // *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. N 24. P. 9577–9583.
4. *Ivama V.M., Serrano S.H.P.* Rhodium-Prussian Blue modified carbon paste electrode (Rh-PBMCPE) for amperometric detection of hydrogen peroxide // *J. Braz. Chem. Soc.* 2003. Vol. 14. N 4. P. 551–555.
5. *Wang J.* Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review // *Electroanalysis.* 2005. Vol. 17. N 1. P. 7–14.
6. *Sharma A.K., Kim J., Lee Y.* An efficient synthesis of polypyrrole/carbon fiber composite nano-thin films // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2009. Vol. 4. P. 1560–1567.
7. *Yu-Chen Tsai, Yu-Huei Hong.* Electrochemical deposition of platinum nanoparticles in multiwalled carbon nanotube – Nafion composite for methanol electrooxidation / *Yu-Chen Tsai, Yu-Huei Hong* // *J. Solid State Electrochem.* 2008. Vol. 12. P. 1293–1299.

GLUCOSE OXIDASE SENSOR BASED ON METAL-POLYMER PLATFORM**I. Demydchuk, Ya. Kovalyshyn***Ivan Franko National University of Lviv,
Kyryla & Mefodia Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine*

It is synthesized and investigated properties of mediated composites based on polyaniline, carbon nanotubes and platinum dispersed. The synthesized composites are used as a platform for designing amperometric glucose oxidase biosensors. It is investigated amperometric sensor response of glucose added, defined sensitivity and linear range of withdrawal of biosensors, the corresponding kinetic parameters of enzymic reaction.

Key words: amperometric biosensor, polyaniline, carbon nanotubes, nanoparticles of platinum.

**ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫЙ СЕНСОР
НА МЕТАЛ-ПОЛИМЕРНОЙ ПЛАТФОРМЕ****И. Демидчук, Я. Ковальшин***Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Кирилла и Мефодия, 6, 79005 Львов, Украина*

Синтезировано и исследовано медиаторные свойства композитов на основе полианилина, карбоновых нанотрубок и мелкодисперсной платины. Синтезированные композиты использовано в качестве платформ при конструировании амперометрических глюкозо-оксидазных биосенсоров. Испытано амперометрический отклик сенсоров на доданные количества глюкозы, определено чувствительность и линейный диапазон отклика биосенсоров, кинетические параметры соответствующей ферментативной реакции.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, полианилин, карбоновые нанотрубки, наночастицы платины.

Стаття надійшла до редколегії 19.10.2011

Прийнята до друку 21.12.2011