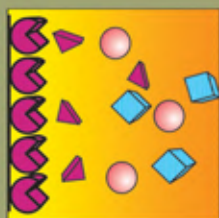


Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко

# **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ ДЛЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В ХИМИИ, БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**



М Е Т О Д Ы   В   Х И М И И

Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко

# **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ ДЛЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В ХИМИИ, БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**

4-е издание, электронное



Москва  
Лаборатория знаний  
2020

УДК 543  
ББК 24.4  
Б90

*Серия основана в 2003 г.*

**Рецензенты:**

кафедра аналитической химии Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова и доктор химических наук, профессор Х. З. Брайнина

**Будников Г. К.**

**Б90** Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко. — 4-е изд., электрон. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 419 с. — (Методы в химии). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-723-3

В научном издании изложены теоретические основы создания и механизмы функционирования вольтамперометрических химических сенсоров и биосенсоров на основе модифицированных электродов в решении задач химии, биологии и медицины, контроля объектов окружающей среды. Большое внимание уделено новым направлениям в конструировании и применении модифицированных электродов — использованию наночастиц и ионных жидкостей, биоматериалов, электропроводящих полимеров, самоорганизующихся, мультисенсорных систем типа «электронный язык», детектированию веществ в потоке.

Для специалистов, работающих в области аналитической химии и аналитического приборостроения, а также для преподавателей, студентов и аспирантов химических, биологических и медицинских специальностей.

**УДК 543**

**ББК 24.4**

**Деривативное издание на основе печатного аналога:** Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 416 с. : ил. — (Методы в химии). — ISBN 978-5-9963-0199-7.

# Содержание

<b>Предисловие</b> .....	5
<b>Обозначения и сокращения</b> .....	8
<b>Введение</b> .....	10
<b>Глава 1. Методы модифицирования электродов</b> .....	19
1.1. Объемное модифицирование электродов .....	21
1.1.1. Угольно-пастовые электроды .....	24
1.1.2. Импрегнированные и композитные электроды .....	43
1.2. Поверхностное модифицирование электродов .....	45
1.2.1. Физическая адсорбция модификатора на поверхности электрода .....	45
1.2.2. Иммобилизация модификатора с образованием ковалентных связей .....	52
1.2.3. Включение модификатора в полимерную пленку .....	62
1.2.4. Модифицирование неорганическими материалами .....	88
1.2.5. Физические методы модифицирования электродов .....	98
1.2.6. Иммобилизация биокomпонентов .....	104
<b>Глава 2. Формирование сигнала-отклика на модифицированных электродах</b> .....	125
2.1. Общая характеристика модифицированных электродов .....	125
2.2. Электрокатализ на модифицированных электродах .....	134
2.3. Концентрирование на поверхности и в объеме электрода .....	154
2.4. Модифицированные электроды в энантиомерном анализе .....	169
2.5. Электроды, модифицированные наночастицами и ионными жидкостями .....	187
2.6. Ультрамикроэлектроды .....	206
2.7. Мультиэлектродные системы .....	213
<b>Глава 3. Амперометрические биосенсоры</b> .....	226
3.1. Общие принципы функционирования биосенсоров .....	227
3.2. Ферментные биосенсоры .....	238
3.2.1. Ферментные биосенсоры в медицине .....	253
3.2.2. Ферментные биосенсоры в эколого-аналитическом контроле .....	260
3.3. ДНК-сенсоры .....	268
3.3.1. Гибридизационные взаимодействия .....	270
3.3.2. Определение низкомолекулярных соединений .....	283
3.3.3. ДНК-повреждающие факторы и действие антиоксидантов .....	288

3.4. Иммуносенсоры .....	293
3.5. Микробные сенсоры .....	308
3.6. Тканевые сенсоры .....	314
<b>Глава 4. Модифицированные электроды в электрохимическом анализе .....</b>	<b>319</b>
4.1. Определение неорганических ионов .....	319
4.2. Определение органических соединений .....	330
4.3. Определение биологически активных веществ .....	336
4.4. Модифицированные электроды в проточных методах анализа .....	345
4.4.1. Модифицированные электроды в высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	350
4.4.2. Модифицированные электроды как детекторы в проточно-инжекционном анализе .....	359
4.4.3. Биосенсоры в проточном анализе .....	362
4.4.4. Модифицированные электроды в капиллярном зонном электрофорезе .....	368
4.5. Микрофлюидные системы с электрохимическими детекторами .....	374
4.6. Детекторы газов .....	381
4.7. Об информационных ресурсах Интернета .....	387
4.7.1. Сайты научного Интернета .....	389
4.7.2. Проблемы развития web-ресурсов .....	397
<b>Литература .....</b>	<b>400</b>

# Предисловие

Интерес к модифицированным электродам связан с потребностями ряда областей науки и практики в химических сенсорах – портативных устройствах для определения веществ без предварительной пробоподготовки анализируемых объектов. Многие сенсоры созданы на основе модифицированных электродов. Поэтому тематика научных исследований и разработок, связанных с модифицированием поверхности электрода для придания электроду специфических свойств, которые проявляли бы себя при обнаружении (распознавании) и количественном определении различных веществ, очень актуальна.

В 1994 г. в издательстве «Наука» вышла в свет монография Г. К. Будникова, В. Н. Майстренко, Ю. И. Муринова «Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрoэлектродами». Еще на стадии подготовки рукописи к публикации обнаружилось, что практическое применение модифицированных электродов и технология их изготовления вызывают повышенный интерес в мировой научной литературе. Прошедшее десятилетие это подтвердило. К сожалению, книга была издана сравнительно небольшим тиражом, поэтому в некоторых лабораториях ее можно увидеть лишь в виде ксерокопий.

Повышенное внимание к модифицированным электродам связано не только с их применением в вольтамперометрическом анализе. Перспективным оказалось использование модифицированных электродов как преобразователей биохимического отклика в биосенсорах, число которых непрерывно растет, а также в детекторах (датчиках), работающих в потоке жидкости, в частности в высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярном зонном электрофорезе.

Кроме того, во многих случаях прямое электрохимическое детектирование на «голом», т. е. не модифицированном, электроде происходит лишь при высоких катодных (анодных) потенциалах. При этом наблюдается заметное влияние так называемых «химических шумов» – совокупности токов разряда примесей и емкостных составляющих. Снижение потенциала отклика в результате модифицирования поверхности электрода позволяет существенно улучшить характеристики последнего. Модифицированием электродной поверхности токопроводящими полимерными пленками, а также пленками на основе неорганических материалов, которые содержат «пришитые» реагенты, имеющие специфические функ-

циональные группы (активные окислительно-восстановительные центры), можно создать настолько благоприятные условия, что аналитический сигнал будет не только специфичным, но и высокочувствительным. За прошедшее десятилетие созданы различные аналитические системы на основе модифицированных электродов, которые в электрохимическом анализе получили название электрохимических сенсоров или детекторов (датчиков).

Несмотря на то что в литературе появились обзоры и монографии, а также учебные пособия, в которых заметное место уделено электрохимическим сенсорам на основе модифицированных электродов, большинство из них скорее предназначены для студенческих аудиторий, в которых реализуется программа подготовки бакалавров. В связи с этим прежде всего следует упомянуть книги Р. В. Каттралла (Химические сенсоры: Пер. с англ. – М.: Научный мир, 2000. – 143 с.) и Б. Эггинса (Химические и биохимические сенсоры: Пер. с англ. – М.: Техносфера, 2005. – 336 с.). В книге Р. В. Каттралла интерес представляет предисловие редактора перевода О. М. Петрухина, в котором рассмотрены вопросы терминологии и постановка задачи. При желании можно обратиться также к его вступительной статье в Российском химическом журнале (2008, Т. 52, № 2).

В книге Б. Эггинса достаточно доступно излагаются проблемы сенсорики и биосенсорики и дано общее представление о механизмах отклика, поэтому она является хорошим пособием для студентов университетов. Однако природа отклика и управление селективностью в ней практически не рассматриваются. Кроме того, исследователи и сотрудники лабораторий могут получить много полезной информации из книги под ред. Ф. Шольца (Электроаналитические методы. Теория и практика: Пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 326 с.) и книги Г. Хенце (Полярография и вольтамперометрия: Пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 240 с.).

Следует заметить, что модифицирование поверхности (и не только электродной) для придания ей новых свойств – по своей сути задача получения нового материала. Новые модифицированные электроды, перспективные для массового изготовления как сенсоры, являются продуктом наукоемких исследований и технологий. И если их применение на практике сравнительно несложно, то для изготовления таких электродов требуется достаточно высокая квалификация персонала. Как и в любой другой области знаний, здесь необходимо обобщение сведений, опубликованных в литературе.

Методы модифицирования поверхности электрода, при которых на нее воздействуют любым способом (физическим или химическим) для придания ей специфических свойств, используются и при создании топливных элементов. Некоторые идеи при разра-

ботке методов модифицирования электродов для вольтамперометрии, основанных на каталитическом отклике, близки к уже реализованным в технологиях производства электрохимических преобразователей энергии химических реакций. При этом возникает необходимость контроля морфологии поверхности с применением современных физических методов – сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии. Не менее важен выбор материала подложки и состава модифицирующих слоев, в том числе на принципах самоорганизации.

Название книги отражает наш непреходящий интерес к тематике, связанной с модифицированными электродами и их применением в вольтамперометрии. Мы постарались систематизировать обширную литературу по этой проблеме и выявить основные тенденции в исследованиях и разработках.

В заключение считаем своим приятным долгом выразить глубокую признательность рецензентам – коллективу кафедры аналитической химии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова во главе с академиком Ю. А. Золотовым и доктору химических наук, профессору Х. З. Брайниной, чьи обстоятельные замечания и советы облегчили работу над рукописью и способствовали ее улучшению. Мы благодарны также профессорам А. А. Карякину, Э. П. Медянцевой, Н. Ю. Стожко, Т. Н. Шеховцовой, доценту Л. Г. Шайдаровой за ценные советы и замечания.

Надеемся, что книга будет полезной и интересной тем, кто работает в сфере электроаналитической химии, создателям новой аппаратуры для химии, биологии, медицины и контроля состояния окружающей среды, а также студентам и преподавателям.



# Обозначения и сокращения

$A$	— площадь электрода
$C$	— концентрация вещества
$C_{\min}$	— предел обнаружения
$C_n$	— нижняя граница определяемых концентраций
$D$	— коэффициент диффузии
$E$	— потенциал электрода, редокс-потенциал
$E^\circ$	— стандартный потенциал
$i$	— ток
$i_d$	— диффузионный ток
$i_k$	— кинетический ток
$i_{\max}$	— максимальный ток
$i_p$	— максимальный ток пика
$j$	— плотность тока
$k$	— константа скорости
$k_s$	— константа скорости переноса электрона
$K$	— константа равновесия
$K_3$	— константа экстракции
$K_{ij}$	— коэффициент селективности
$K_M$	— константа Михаэлиса
$L$	— толщина слоя
$n$	— число переносимых электронов
$P$	— вероятность
$r_o$	— радиус сферического электрода
$S$	— стандартное отклонение
$S_r$	— относительное стандартное отклонение
$v$	— скорость сканирования потенциала
$t$	— время
$y_x$	— величина сигнала-отклика
АДФ	— аденозиндифосфат
АМФ	— аденозинмонофосфат
АТФ	— аденозинтрифосфат
БПК	— биологическое потребление кислорода
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
ГК	— главная компонента
ГОД	— глюкозооксидаза
ГЦМ	— гексацианометаллат
ГЦФ	— гексацианоферрат
ГЭ	— графитовый электрод
ДДС	— додецилсульфат
ДМГ	— диметилглиоксим
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВА	— инверсионная вольтамперометрия

ИЖ	– ионная жидкость
ИСЭ	– ион-селективный электрод
КЭФ	– капиллярный электрофорез
М	– металл
МВ	– метилвиологен
МГК	– метод главных компонент
МС	– метиленовый синий
НКЭ	– насыщенный каломельный электрод
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПАН	– пиридилазонафтол
ПВХ	– поливинилхлорид
ПДК	– предельная допустимая концентрация
ПИА	– проточно-инжекционный анализ
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РКЭ	– ртутный капающий электрод
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СМД	– сверхмалая доза
СЭ	– стеклоуглеродный электрод
ТГФ	– тетрагидрофуран
ТГЭ	– толсто пленочный графитовый электрод
УВ	– углеродное волокно
УМЭ	– ультрамикроэлектрод
УНТ	– углеродная нанотрубка
УПЭ	– угольно-пастовый электрод
УЭ	– углеродный электрод
ХМЭ	– химически модифицированный электрод
ХПК	– химическое потребление кислорода
ЦД	– циклодекстрин
ЦТАБ	– цетилтриметиламмония бромид
ЭМА	– электрохимические методы анализа
ЭХС	– электрохимический сенсор
A, A <sup>*</sup>	– компоненты обратимой редокс-системы
A <sup>-</sup>	– анион
FADH <sub>2</sub>	– флавинадениндинуклеотид
Fc	– ферроцен
I	– ингибитор
ITO	– электрод на основе оксидов индия и олова
K <sup>+</sup>	– катион
M	– медиатор переноса электрона
NADH	– никотинамидадениндинуклеотид
NADPH	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат
Ox	– окисленная форма вещества
P	– продукт реакции
PQQ	– пирролохинолинихион
Red	– восстановленная форма вещества
S	– субстрат
SAM	– самоорганизующийся монослой
SIMCA	– метод формального независимого моделирования аналогий классов

# Введение

В настоящее время в хорошо оснащенных аналитических лабораториях при решении эколого-аналитических и медико-биологических задач, сертификации материалов и изделий из них, для оценки качества пищевых продуктов наряду с другими аналитическими методами широкое применение находят электрохимические методы анализа (ЭМА). Преимущество этих методов в относительной простоте и невысокой стоимости анализа, они имеют высокую чувствительность, хорошую селективность и экспрессность, их можно автоматизировать, что позволяет управлять производственными процессами в реальном масштабе времени. Для ЭМА характерны необычайно широкие области применения – от определения ионов тяжелых металлов и следовых количеств токсичных органических веществ в воде до диагностики генетических заболеваний. Зачастую они не требуют высокой квалификации обслуживающего персонала, что существенно для многочисленных лабораторий мониторинга загрязнения окружающей среды, контроля качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Помимо прямого назначения электрохимические методы анализа применяются для детектирования веществ в потоке в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭФ), в проточном инъекционном анализе (ПИА). Кроме того, аналитический сигнал многих химических и биологических сенсоров – устройств, дающих прямую (без фиксированного объема пробы и ее подготовки) информацию о составе среды в непрерывном режиме и с малым временем отклика, – имеет электрохимическую природу, т. е. относится к области электрохимического анализа. Объединенные в единый блок и подключенные к компьютеру мультieleктродные системы («электронный язык», «электронный нос» и т. п.) позволяют получать информацию о природе и составе сложных смесей.

Электрохимические методы анализа переживают в последние годы своеобразное «возрождение», и это происходит не только по причине невысоких затрат на их реализацию и не только благодаря доступности соответствующих приборов. ЭМА позволяют получать данные как о содержании определяемых веществ, так и об их химической природе. Однако основная причина возврата к ЭМА связана с созданием и практическим применением химически модифицированных электродов (ХМЭ). На их основе созданы сенсоры, детекторы, датчики и другие приборы, с помощью которых

проводят определение множества различных соединений, прежде всего органических.

Понятия «химически модифицированный электрод» и «электрохимический сенсор» (ЭХС) часто являются синонимами, хотя само понятие «сенсор» трактуется неоднозначно. Поэтому до обсуждения конкретных вопросов модифицирования электродов и их практического применения дадим общий «портрет» этой междисциплинарной области электроаналитической химии, очертим ее границы, рассмотрим терминологию и основные понятия, классификацию электродов в зависимости от способов нанесения модифицирующих слоев и природы модификатора.

Как известно, многие химические вещества способны окисляться (восстанавливаться) на электроде или в растворе при определенном потенциале. Если в электрохимическую ячейку поместить два электрода с различной площадью поверхности (индикаторный и вспомогательный), то при потенциалах индикаторного электрода, соответствующих потенциалу окисления (восстановления) вещества в растворе, по величине тока электролиза можно судить о его природе и концентрации. Такую ячейку часто называют химическим сенсором с амперометрическим (вольтамперометрическим) откликом.

С развитием вольтамперометрии и ее аппаратных модификаций, отличающихся типом электрического воздействия на ячейку, стало ясно, что чувствительность, воспроизводимость и стабильность аналитического сигнала (отклика) во времени, а также другие его характеристики существенно зависят от чистоты поверхности электрода. Электроаналитики стремились достигнуть идеальной воспроизводимости поверхности от измерения к измерению. Такой поверхностью оказалась капля ртути, вытекающая из капилляра, – ртутный капающий электрод (РКЭ), воспроизводящий свою поверхность. Появление РКЭ способствовало быстрому развитию вольтамперометрии вообще и полярографии в частности, а также родственных методов. Литература по этим вопросам весьма обширна и относится преимущественно к середине и второй половине XX в.

Однако токсичность ртути и, как следствие, принятие ограничительных мер в большинстве стран мира (наряду с другими причинами) привели к заметному сокращению «ареала» полярографии. Вместе с тем, с развитием биологии, медицины, смежных с ними областей науки и повышением внимания к вопросам охраны окружающей среды возрос интерес к методам определения биологически активных и лекарственных веществ, продуктов жизнедеятельности организмов, ферментов и т. п. как в стационарных условиях, так и в потоке жидкости, в том числе в режимах *on line* и *in situ*. Для решения проблем, связанных с собственно электродами (а отсюда и электрохимическими сенсорами), исследователи обратили

внимание на поверхность электродов (сенсоров), материалы, из которых их можно изготовить, механические и другие свойства, влияющие на природу отклика, его изменчивость под влиянием различных факторов.

Оценивая развитие исследований по «электродной» тематике во второй половине XX в., можно выделить два подхода к созданию электродов. Первый из них достаточно подробно рассмотрен в литературе. В его основе – замена ртути на другой материал (углеродные материалы, благородные металлы, включая те, на поверхности которых образуются оксидные пленки, и т. п.). Воспроизводимость поверхности таких электродов, определяющая в конечном счете качество измерения, т. е. амперометрического отклика, достигается различными способами – от механического (химического с применением агрессивных реагентов) до электрохимического (автоматизированного по программе, задаваемой измерительной аппаратурой).

Новое поколение электродов, которые в основном появились в последней четверти XX в. и интенсивно изучаются в настоящее время, основано на модифицировании их поверхности. При модифицировании на поверхность электродного материала наносят химическое соединение (один или несколько слоев), полимерную пленку или формируют оксиды (композиты) из материала электрода, которые существенным образом изменяют его способность к вольтамперометрическому отклику в результате появления специфических свойств. При этом «универсальность» электрода (например, в случае РКЭ) заметно сужается либо сводится к минимуму. Однако специфичность или селективность отклика при этом возрастает, а в случае модифицирования с применением биоматериалов становится максимальной.

В принципе понятие ХМЭ сейчас относят к любому электроду, поверхность которого обработана таким образом (физическим способом, лазерным облучением или химической обработкой с применением реагентов, включая различные пленки), что характер электрохимического отклика меняется от универсального (измеряемого в широком диапазоне потенциалов) до специфического или селективного (в узкой области потенциалов). Количество описанных в литературе модифицированных электродов достаточно велико. Разработаны способы закрепления на различных поверхностях (подложках, матрицах и т. д.) более тысячи индивидуальных неорганических, органических и металлоорганических соединений, веществ и материалов неорганической (цеолиты, глины и т. п.) и биологической (ферменты, бактерии, ткани и др.) природы, перечень которых велик. Установлены важные закономерности, которыми следует руководствоваться при закреплении модификаторов (или биоматериалов) на электродной поверхности и вблизи электрода. Рассмотрены многочисленные области практического применения

модифицированных электродов в химических сенсорах и биосенсорах (если в модифицирующем слое использован биоматериал). В настоящее время модифицированные электроды и особенно биосенсоры получили широкое распространение, что является лучшим подтверждением успехов в области фундаментальных исследований, направленных на решение специальных проблем, в частности охраны окружающей среды и здоровья человека.

При закреплении на поверхности электродов тех или иных модификаторов не всегда можно предсказать изменение их свойств, особенно во времени. Ранее распространенное мнение, что свойства модифицированного электрода определяются свойствами исходного электрода и прикрепленного модификатора, т. е. иммобилизованного соединения, также не всегда справедливо. Зачастую наблюдается несовпадение селективности аналитического сигнала для иммобилизованных металлокомплексов и находящихся в растворе. Кроме того, любая поверхность имеет неоднородности (шероховатость). Если размеры дефектов сравнимы с удерживаемым соединением (адсорбатом), то оно может взаимодействовать с различными гранями поверхности; каждая грань определенной ориентации имеет различную поверхностную энергию и следовательно разную реакционную способность. В общем случае можно ожидать несколько амперометрических откликов (например, ряд пиков) при близких потенциалах, чаще всего сливающихся на практике. В отдельных случаях эти пики разрешимы, что затрудняет количественные измерения. Модифицирование электродной поверхности направлено на усреднение ее энергетического состояния, т. е. на получение «усредненного» амперометрического отклика.

Известно также, что не все вещества электрохимически активны в доступной области потенциалов. Электродные реакции некоторых соединений протекают с большим перенапряжением, при этом аналитический сигнал имеет искаженную форму и плохо воспроизводится из-за размытости вольтамперограмм (отсутствует пик). Для устранения этого явления применяют медиаторы, которые осуществляют транспорт электронов между электродом и определяемым веществом. Частицы медиатора представляют собой обратимую окислительно-восстановительную пару, компоненты которой участвуют в последующей гомогенной химической реакции с аналитом в растворе. Таким образом удается исключить или значительно уменьшить влияние гетерогенных факторов, о которых говорилось выше (ориентация вещества у поверхности электрода, воздействие поля последнего, шероховатость, чистота поверхности и т. д.), на скорость и полноту электролиза с участием аналита. Наблюдаемый прирост тока медиатора в присутствии аналита по сравнению с током в его отсутствие является источником информации о протекающей гомогенной реакции. Таким путем удается вовлечь аналит в электрохимическую реакцию при потен-

циях, соответствующих потенциалу редокс-пары переносчика, и понизить перенапряжение, характерное для электродной реакции аналита. Регенерация компонента редокс-пары обуславливает каталитический характер амперометрического отклика.

Использование явления гомогенного переноса электрона стимулировало поиск путей иммобилизации медиаторов на поверхности электродов с целью создания амперометрических сенсоров. Поскольку медиаторы стали использоваться в качестве «курьеров переноса заряда» между электродом и ферментами, то способы их иммобилизации вызывают повышенный интерес при создании нового поколения биосенсоров. В их конструкции электродная поверхность с иммобилизованным переносчиком функционирует как преобразователь сигнала, генерируемого биослоем. Функционально такие сенсоры сопоставимы с датчиками живых организмов – биорецепторами, преобразующими сигналы, поступающие из внешней среды, в электрические, которые легко измерить. С одной стороны, биосенсоры можно рассматривать как устройства, работающие на принципах биологического распознавания определяемых молекул или частиц, т. е. они относятся к биологическим (биохимическим) методам анализа. С другой стороны, биосенсоры – это электронные устройства, включающие в себя биочувствительный элемент, тесно связанный с физическим преобразователем либо интегрированный с ним, чаще всего с электродом.

Область биосенсоров пересекается со многими традиционными дисциплинами: биологией, биохимией, аналитической химией, энзимологией, физикой твердого тела, микроэлектроникой, информатикой. Как объект исследования биосенсоры рассматриваются в новой науке – биоэлектронике, само название которой предполагает взаимопроникновение идей биологии и электрохимического анализа. Интерес к биосенсорам обусловлен их потенциальными возможностями в контроле среды обитания и охране здоровья человека, что нашло отражение в характере научных исследований и разработок, да и методологии аналитической химии в целом. В ряде стран возникли научные коллективы и созданы соответствующие лаборатории по проблеме биосенсоров. Многообразие биосенсоров определяется различной природой биоматериала, типом физического преобразователя, способом регистрации электрического сигнала. Их конструкция, или дизайн (объемный, планарный и т. д.), тесно связана с назначением в использовании. Классификация биосенсоров также отражает области практического применения: субстратные, ингибиторные и т. д.

В последние годы наблюдается проникновение в электроаналитическую химию идей супрамолекулярной химии, в частности образование самоорганизующихся моно- и бислоев амфифильных молекул на поверхности электрода, что используется при создании селективных электрохимических сенсоров, в том числе биосенсо-

ров. Для них разработаны специальные мембраны, находящиеся в контакте с электродом-преобразователем и осуществляющие молекулярное распознавание посредством селективных рецепторов (синтетических или нативных), подобно тому, как это происходит в живых организмах. Связывание субстрата преобразуется в электрический сигнал за счет изменения физических или химических свойств активного слоя рецептора. Молекулярный дизайн (послойное нанесение активных слоев) и применение нанотехнологии при создании новых электродов и на их основе микроаналитических систем для целей медицинской диагностики рассматриваются как перспективный путь развития электрохимического анализа и расширения сферы его практического применения. Кроме того, саморганизирующиеся монослои на поверхности электродов с точно контролируемой толщиной и направленной ориентацией молекул предоставляют уникальную возможность для изучения процессов накопления определяемых компонентов и других факторов, влияющих на величину сигнала (отклика).

Вообще же, нанесение иммобилизованного слоя на поверхность электрода, особенно при создании биосенсоров, непростая задача. Соответствующие технологии разработаны на основе «ноу-хау». Порой заметную роль играет искусство экспериментатора, особенно в конструкциях типа *home made*. Тем не менее поиск новых путей создания биосенсоров, особенно для медико-биологических исследований, несомненно, перспективен. К тому же эта тематика социально значима. Можно полагать, что в ближайшее время биосенсоры станут основой автоматизированных систем аналитического контроля и диагностики состояния здоровья человека.

Заметим, что появлению новых биосенсоров способствовали работы по изучению способов модифицирования электродов различными модификаторами, которые проводились независимо и параллельно с биосенсорной тематикой. В настоящее время подобные исследования также проводятся, но уже с модификаторами следующего поколения, к которым, например, относятся синтетические рецепторы и ДНК. Модифицированные электроды на их основе дают специфический отклик на различные субстраты, в том числе и на биологически активные вещества. С позиций методологии модифицирования электроды-сенсоры на тот или иной аналит, независимо от механизма отклика распознающего слоя, объединяются одним понятием «химически модифицированные электроды».

Модифицирование поверхности электрода может быть достигнуто при воздействии на его токопроводящую часть различными способами с использованием химических реагентов или биослоев. Для их иммобилизации применяют такие приемы, как:



- необратимая адсорбция на поверхности электрода;
- химическое связывание с фиксацией модификатора (биоматериала) через различные группы (спейсеры, линкеры) с образованием ковалентных связей;
- включение в полимерную пленку;
- введение в объем композита или пасту из графитовых материалов, включая технологию изготовления печатных схем, различных компонентов-модификаторов;
- образование слоя с иммобилизованным модификатором с помощью золь-гель технологии;
- нанесение пленки полимера или другого материала, содержащего полости, позволяющие распознавать молекулу аналита по механизму гость-хозяин (молекулярные отпечатки).

Эти способы определяют классификацию химических сенсоров на основе модифицированных электродов. Уместно привести мнение О. М. Петрухина относительно размывания грани между наукой и техникой (при разработке инженерных решений) применительно к таким электродам, поскольку теоретические и экспериментальные исследования и технологии их изготовления прижились и встроились друг в друга. «Сейчас уже трудно провести грань между наукой и техникой, уже сложно оперировать понятиями «наука» и «техника» в прежнем, традиционном смысле слова. Становится все труднее провести четкую грань между чисто теоретически ориентированными фундаментальными исследованиями и прикладными исследованиями и разработками. Наука все в большей степени становится техникой, а техника все в большей степени основывается на естественнонаучных открытиях. Аналитическая химия не может быть исключением из этого общего потока развития».

В книге подробно рассмотрены способы модифицирования электродов, т. е. технологии изготовления, сопоставлены их преимущества и недостатки, аналитические и операционные характеристики, достигаемые при том или ином способе иммобилизации модифицирующего слоя на электроде, другие вопросы применения модифицированных электродов.

Большинство химических сенсоров и биосенсоров, изготовленных с помощью новых технологий, дают устойчивый отклик не только в стационарных условиях, но и в потоке. Практически все сенсоры, предназначенные для биомедицинских целей, могут работать в потоке, т. е. в условиях ВЭЖХ, ПИА, КЭФ. Детектирование в потоке жидкости также рассмотрено в книге.

В настоящее время в ряде областей аналитической химии, биологии и медицины ощущается потребность в миниатюрных сенсорах на основе микропреобразователей, созданных по технологии интегральных схем (микрочипов). Миниатюризация сенсоров в

сочетании с их высокой селективностью и чувствительностью, достигаемых за счет использования разнообразных биоматериалов, позволяет решать важные задачи биологии и медицины, в том числе даже задачи определения отдельных молекул (например, с помощью капиллярного электрофореза с амперометрическим детектором на основе модифицированных ультрамикрорезисторов). При условии удачных конструктивных решений потенциал таких сенсоров очень велик, однако их разработка и применение требуют высокой квалификации специалистов, а отсюда и их специальной подготовки. В образовательном процессе необходимо выработать соответствующий императив, чтобы приобщить к нему его участников. Не случайно сенсоры на основе модифицированных электродов включены в учебную литературу, т. е. эта тема переведена из сферы науки в сферу знаний. Поэтому интересно сопоставить использование некоторых терминов и понятий в литературе, пусть даже и не в строгих рамках.

Химические сенсоры (т. е. сенсоры химического состава, в отличие от сенсоров массы, скорости, расхода и т. п.) и соответствующая область химической сенсорики образуют раздел аналитической химии. Если химический сенсор дает отклик электрохимической природы, в частности, амперометрический, то он является объектом электрохимического анализа. В биосенсорах (область биосенсорики) отклик создается за счет «работы» биоматериала в биоустройстве. В общем случае амперометрический (вольтамперометрический) сенсор с модифицирующим слоем – это «безреагентная система». Такое понятие часто встречается в литературе, особенно в ранний период развития исследований в этой области. При более строгом подходе «безреагентную систему» следует отнести к устройствам, в которых реагент (модификатор) непосредственно интегрирован в сенсор (биосенсор) и не вносится в раствор при проведении измерений. В этом и состоит одно из преимуществ сенсоров вообще.

Набор сенсоров (даже не селективных) с помощью компьютерных программ позволяет решать сложные аналитические задачи. В этом случае повышение селективности достигается за счет интеллектуализации технических средств (нейронные сети, «электронный язык», «электронный нос»). Развитие современной аналитической химии достигло такого уровня, когда стало возможным ставить и решать задачи по оценке обобщенных показателей качества среды, продуктов питания и других объектов, жизненно важных для человека.

Завершая знакомство с терминами и понятиями сенсорики (биосенсорики), приведем определение химического сенсора, опубликованное на странице главного редактора Журнала аналитической химии. «Химический сенсор – это устройство для быстрого и, как правило, непрерывного, в режиме реального времени

(или с небольшим временем отклика) определения концентрации вещества (обычно одного) в той среде, где оно находится, особенно без отбора проб, причем методика определения «защита» в это устройство и не меняется, пробоподготовка чаще всего не требуется; в идеале, но не всегда, устройство портативно и может тиражироваться в относительно больших масштабах».

Остановимся также на понятиях «наночастица», «нанокompозит», «нанотехнология», объединяемые термином «нанохимия», поскольку они имеют отношение к модифицированным электродам. Развитие исследований в этом направлении идет быстрыми темпами, однако соответствующие понятия и определения в науке еще не устоялись. Как и любая другая наука, нанохимия имеет свои цели, объекты и методы исследования. Под наночастицами мы подразумеваем объекты, размеры которых лежат в пределах от 1 до 100 нм, преимущественно 1–10 нм. С позиций химической термодинамики промежуточное положение наночастиц между макроскопическими образованиями (фазами) и атомами либо простыми молекулами обуславливает их специфику. Уменьшение размера модифицирующих частиц приводит к увеличению поверхности электрода и соответственно поверхностной энергии, что влияет на чувствительность и селективность определений.

Говоря о перспективах нанохимии в создании электродов и сенсоров, в том числе с самоорганизующимися наноструктурами на поверхности, включая микрочипы и т. п., следует обратить внимание на то, что термин «нано» как междисциплинарная область химии включает в себя и электроаналитическую химию (углеродные нанотрубки, фуллерены, другие наноматериалы для электродов, ультрадисперсные порошки, пирографит, стеклоуглерод и др.). Ультрамалые размеры некоторых электродов-сенсоров, например, ансамбль нанополос как полисенсор, тоже попадают в поле зрения нанохимиков. Это отражается на частоте появления журнальных публикаций, пока что в основном международных. Хотя применение наночастиц в электрохимическом анализе не всегда оправданно и зачастую искусственно, во многих случаях они позволяют повысить возможности конкретных методов.

Следует заметить, что среди терминов, имеющих отношение к этому направлению, встречаются не только термины, которые кажутся известными и понятными, но и те, которые могут трактоваться по-разному химиками, физиками, биологами, материаловедами и др. Это проблема имеет общий характер.

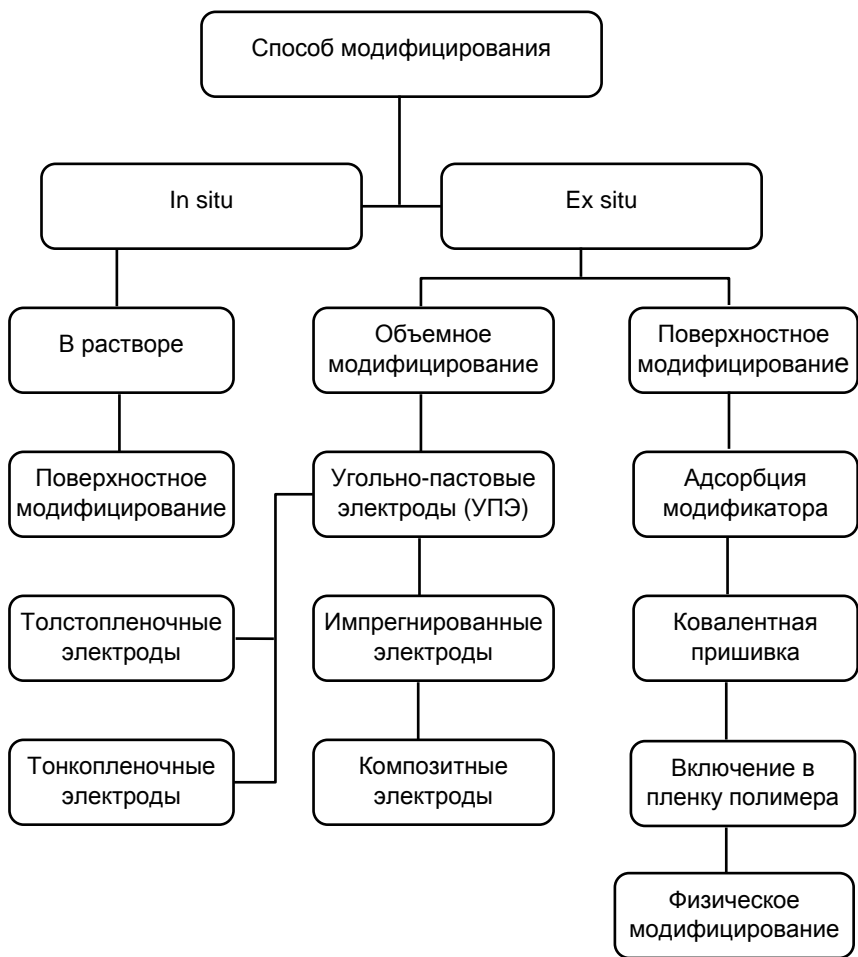
# Глава 1

## Методы модифицирования электродов

Сигнал-отклик сенсора в электрохимической системе формируется на границе раздела фаз электрод/раствор и зависит от состояния поверхности электрода, которая определяется природой материала, его однородностью, присутствием модифицирующих веществ и т. п. Поэтому от правильного выбора индикаторного электрода во многом зависит успех измерений, включая величину сигнала-отклика и возможность достижения заданных метрологических характеристик. В связи с этим материалу электродов, способам их химического и физического модифицирования, методам регенерации и расширения рабочей области потенциалов уделяется большое внимание. Требования, предъявляемые к электродам, весьма высокие; прежде всего они должны обеспечить протекание электрохимической реакции с высокой скоростью при малых перенапряжениях, быть инертными к воздействию среды и селективными по отношению к определяемым веществам. На рис. 1.1 представлены основные способы модифицирования электродов, реализованные на практике.

При модифицировании электродов *in situ* растворимый модификатор вводят в анализируемый раствор. Особенно широко этот способ применяется в инверсионной вольтамперометрии (ИВА). В качестве модификаторов используются металлы (ртуть, кадмий, медь, висмут и др.), облегчающие осаждение амальгамообразующих и электроположительных элементов, водорастворимые органические вещества: лиганды, биологически активные соединения, полимеры. Иногда используются сочетания модификаторов: металла и лиганда, полимера и металла, полимера и лиганда и др.

Другой путь модифицирования электродов *in situ* – введение в раствор органических молекул, способных к самоорганизации на поверхности электрода. Они образуют упорядоченные монослои, которые изменяют транспорт частиц деполяризатора к электроду не только за счет различий в зарядах и размерах, но и за счет гидрофобного эффекта. Так, например,  $\omega$ -карбоновые кислоты образуют на ртутной поверхности пленки Ленгмюра–Блодже, состоящие из плотноупакованных молекул, располагающихся ортогонально к поверхности электрода. Самоорганизация часто применяется при модифицировании золотых электродов. В этом случае модификаторами выступают длинноцепочечные гидрофобные мо-



**Рис. 1.1.** Основные способы модифицирования электродов

лекулы с концевыми тиольными группами, образующими с электродом связь  $\text{Au-S}$ . Регулярность строения обеспечивается гидрофобными взаимодействиями углеводородных радикалов.

В большинстве случаев закрепление модификатора на поверхности электрода осуществляется путем адсорбции. Преимущество способов модифицирования *in situ* в том, что они не требуют пришивки молекул модификатора к электроду; достаточно очистить поверхность перед модифицированием от продуктов электрохимической реакции. Однако время жизни таких электродов относительно невелико, поскольку перед каждым измерением необходимо проводить модифицирование заново.

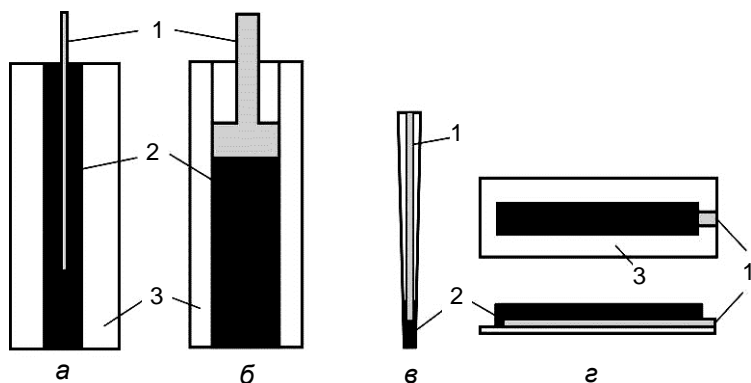
Как альтернатива способам модифицирования *in situ* разработаны и широко применяются способы предварительной иммобилизации модификаторов (*ex situ*) на электродах из различных материалов. В качестве последних применяются металлы, стеклоуглерод, пирографит, углесталл, импрегнированный графит, угольная паста, композитные материалы, углеродные волокна, нити, сетки и др. Совокупность их свойств позволяет создавать электроды с заданными параметрами чувствительности и селективности.

Предварительное модифицирование разделяет процессы приготовления модифицирующего слоя (электрода) и собственно измерения аналитического сигнала. С одной стороны, это позволяет стандартизовать продукт модифицирования (электрод) перед измерением, например, в лаборатории при подготовке к полевому эксперименту. Кроме того, иммобилизация модификатора *ex situ* сокращает процедуру измерения и позволяет избежать грубых ошибок вследствие человеческого фактора. С другой стороны, предварительное модифицирование предъявляет более высокие требования к стабильности модифицирующего покрытия. Многие методы *in situ* в целом подобны предварительному модифицированию электрода, поэтому имеет смысл рассмотреть более подробно общие подходы к модифицированию электродов.

## 1.1. ОБЪЕМНОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОДОВ

Внедрение модифицирующего вещества непосредственно в материал рабочего (индикаторного) электрода – интуитивно наиболее простой и понятный способ модифицирования, обеспечивающий постоянство состава электродного вещества, а также контакт модификатора с анализируемым раствором и электропроводящей основой. Несмотря на то, что объемное модифицирование не имеет принципиальных ограничений по материалу электрода, в основном применение нашли электроды на основе графитовых материалов.

Объемное модифицирование металлических электродов подразумевает получение и использование различных сплавов – гомогенных или с включениями интерметаллических соединений. Такие электроды известны достаточно давно и находят применение для вольтамперометрических измерений в коррозионно-активных средах или для снижения перенапряжения восстановления ионов водорода и металлов. С точки зрения методологии изготовления и применения подобные электроды скорее относятся к традиционным металлическим электродам. Поэтому далее в книге они не рассматриваются. Более интересен другой тип модифицированных металлических электродов – электроды из порошков металлов. Как правило, речь идет о наноразмерных дисперсных фазах благородных металлов – платины, золота, иридия, родия, рутения и др. Эти металлы имеют высокую электрокаталитическую активность и



**Рис. 1.2.** Конструкции угольно-пастовых электродов

1 – токосъемник; 2 – угольная паста; 3 – изолирующая оболочка

химически устойчивы. Для достижения приемлемых показателей электропроводности наночастицы металлов обычно диспергируют в углеродную матрицу или наносят на поверхность электродов из графитовых материалов либо других металлов. В этом случае металлические порошки играют роль модификаторов основного электродного вещества.

Среди объемных углеродсодержащих электродов наибольшее распространение получили угольно-пастовые электроды (УПЭ). В простейшем случае УПЭ повторяет форму традиционного монолитного электрода – металлического или графитового стержня. Это цилиндр из угольной пасты, заключенный в полую оболочку изолирующего материала – стеклянную или пластиковую трубку (рис. 1.2, а). Она играет роль резервуара пасты и определяет геометрические размеры электрода – площадь торца цилиндра. Для таких электродов характерно достаточно большое отношение объема углеродной пасты к площади рабочей поверхности электрода. Реально в переносе заряда участвует лишь незначительная часть электродного вещества, контактирующая с анализируемым раствором. Подобная конструкция электродов имеет как свои достоинства, так и недостатки. К первым относится относительная простота изготовления. Смешение достаточно больших (до нескольких граммов) количеств компонентов позволяет добиться однородности пасты даже при ручном смешивании, при этом для регенерации активной поверхности электрода достаточно удалить тонкий поверхностный слой, например шлифуя поверхность УПЭ на шкурке или бумаге. Большой объем электрода позволяет повторять эту процедуру десятки раз, получая стабильный и воспроизводимый отклик. Механическое обновление поверхности можно проводить срезанием тонкого слоя пасты, выступающего из изолирующей трубки, острым ножом. Такой способ часто используется для элек-

тродов небольшого диаметра или для пластичных паст, не допускающих механической шлифовки.

Другой вариант конструкции УПЭ – устройство, напоминающее шприц, в котором токосъемник одновременно служит поршнем (рис. 1.2, б). При его перемещении из изолирующей трубки выдавливается небольшой объем пасты, который затем удаляется. Ход поршня можно регулировать аппаратурно, если шток соединен с электродом резьбой.

Шлифовка поверхности нужна не только для обновления поверхностного слоя. Благодаря этой процедуре достигается определенная шероховатость поверхности, что обеспечивает воспроизводимость отношения истинной и геометрической площади поверхности электрода и сигнала-отклика. В некоторых случаях шлифовка сопровождается частичным плавлением наполнителя, который заполняет поры, снижая тем самым пористость электрода, а значит, и нежелательные процессы попадания в него электролита. При этом уменьшается ток заряжения и улучшается форма пиков на вольтамперограммах. Кроме того, шлифовка способствует частичному окислению активных поверхностных групп графитовых материалов и наполнителей. Частички металлов могут окисляться с образованием оксидов.

Влияние указанных факторов на характеристики вольтамперограмм зависит от природы фарадеевских процессов и особенностей системы модификатор – определяемое вещество. Если регистрируются анодные токи, частичное окисление поверхностного слоя благоприятно влияет на соотношение сигнал/шум и селективность отклика в присутствии электроактивных примесей. В случае катодных процессов окисление поверхностного слоя может привести к значительному увеличению фоновому току и росту перенапряжения. Кроме того, окисление поверхностных компонентов пасты может подавлять каталитические токи независимо от их природы и снижать эффективность действия электрокаталитических добавок. Отмеченные недостатки устраняют подбором условий предварительной подготовки электрода перед проведением измерений. Она включает его кондиционирование при определенном потенциале, вымачивание в растворе модификатора, обработку органическими растворителями и т. д.

Изготовление *объемного макроэлектрода* сопряжено со значительным расходом модификатора. Один из способов избежать этого, особенно на стадии подбора оптимального состава углеродной пасты, – использование электрода, представляющего собой стеклоуглеродный стержень в изолирующей оболочке, в торце которого сделано небольшое углубление конусообразной или полусферической формы. Углубление заполняют углеродной пастой, объем которой составляет несколько десятков микролитров. После измерения пасту удаляют из углубления, после чего его заполняют новой



порцией пасты. Хотя работать с таким электродом сложнее, чем с обычным макроэлектродом, его применение оправданно при использовании дорогостоящих или неустойчивых модификаторов, например в биосенсорах на основе антител, ферментов, нуклеиновых кислот и др.

*Объемный микроэлектрод* – это стеклянный или пластмассовый капилляр, кончик которого заполнен модифицированным электропроводящим материалом, удерживаемым внутри электрода капиллярными силами (рис. 1.2, в). Токоосъемник представляет собой тонкую металлическую проволоку, которую вводят в пасту с противоположного конца капилляра. Такие электроды применяются для определения содержания электрохимически активных компонентов в биологических тканях или внутриклеточной жидкости живых организмов. Обычно объемные микроэлектроды изготавливают вручную, их характеристики в значительной степени определяются размерами и геометрией среза капилляра. Обновление поверхности графитовой пасты не предусматривается. При переходе от макро- к микроэлектродам следует помнить, что вследствие особенностей изготовления микроэлектроды характеризуются большим разбросом характеристик и худшим отношением сигнал/шум при том же составе углеродной пасты.

### 1.1.1. Угольно-пастовые электроды

В зависимости от особенностей конструкции и физико-химических характеристик различают *угольно-пастовые, композитные и импрегнированные* электроды. Углеродные пасты – достаточно вязкие составы, обладающие текучестью, поэтому их помещают в стеклянную или пластиковую трубку. Обычно их изготавливают из мелкодисперсного угольного порошка и вязкой жидкости, не смешивающейся с водой. С этой целью применяют парафиновое и вазелиновое масло, силиконовые смазки, диоктилфталат,  $\alpha$ -бромнафталин, трикрезилфосфат и т. п. В качестве модификаторов используются вещества с комплексообразующими свойствами, хелаты металлов, ионообменники, неорганические и полимерные сорбенты, а также различные классы органических соединений: алифатические и ароматические гидроксикарбоновые кислоты, аминок-, азо- и тиосоединения, хинолины. Селективность определений с такими электродами достигается не только подбором модификатора, но и регулированием pH и варьированием состава пасты. Предел обнаружения многих неорганических и органических веществ на УПЭ достигает  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/л.

Наряду с объемной конструкцией УПЭ могут иметь планарный (пленочный) тип исполнения. *Пленочный электрод* представляет собой токоосъемник, покрытый тонким слоем проводящей пасты, содержащей модификатор (рис. 1.2, г). Такой электрод характе-

ризуется высоким отношением площади рабочей поверхности к объему пасты. Чтобы поверхностный слой не растекался, для его формирования применяют более вязкие пасты, нежели для объемных угольно-пастовых электродов, или же отверждающиеся составы. Поскольку повышение вязкости, как правило, сопровождается снижением электропроводности, пленочные электроды характеризуются несколько худшими электрическими свойствами. Основным способ избежать значительных омических потерь – уменьшение толщины поверхностного слоя и увеличение его электропроводности за счет включения в состав пасты медиаторов электронного переноса или компонентов со смешанной электронно-ионной проводимостью.

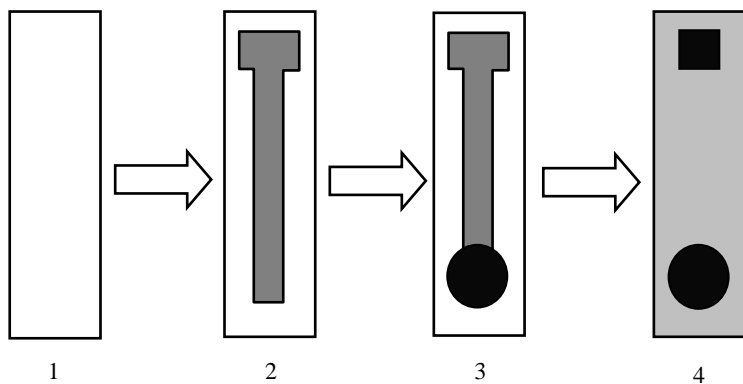
При толщине электропроводящего слоя не более 10 мкм электроды называются тонкопленочными. Толстопленочные электроды имеют толщину электропроводящего слоя до нескольких миллиметров, но чаще – 100 мкм. В массовом производстве пленочные электроды дешевле объемных УПЭ, поскольку масса модификатора и графитового компонента в них составляет десятые доли грамма, причем практически все это количество участвует в химических (комплексобразование, осаждение, окислительно-восстановительные превращения) или электрохимических (электрокаталитических) реакциях с участием определяемого вещества. Строгое соблюдение технологических условий массового производства позволяет устранить основной недостаток УПЭ – проблемы унификации характеристик отдельных электродов, обусловленные сложностями гомогенизации и стандартизации малых объемов проводящих составов. Пленочные электроды выгодно отличаются от объемных макроэлектродов разнообразием геометрии рабочей поверхности и широкими возможностями миниатюризации. Отдельные пленочные электроды можно комбинировать, размещая на одной подложке рабочий (модифицированный) и вспомогательный электроды. Известны и более сложные устройства, в том числе рассчитанные на измерение сигнала в микрообъемах, буквально в одной капле, замыкающей электролитический контакт между электродами. В некоторых случаях в них входят дополнительные электроды для пробоподготовки, например для окисления мешающих органических соединений или получения тонкой пленки ртути в условиях инверсионной вольтамперометрии.

Существуют различные подходы к изготовлению пленочных электродов. Это технологии трафаретной и струйной печати, фотолитография, вакуумное напыление и травление. Модифицирование может проводиться как на стадии изготовления электрода, так и при его последующей обработке. В этом случае речь идет о поверхностном нанесении необходимых компонентов, что подробно рассмотрено в последующих главах.

*Трафаретная печать* (шелкография) – способ нанесения поверхностных модифицирующих слоев толщиной в десятки микрометров путем продавливания соответствующих составов через специальные трафареты, накладываемые на непроводящую основу. В качестве подложек служат пленки из поликарбонатов (низкотемпературные процессы), кремниевые и керамические пластинки (высокотемпературные процессы). Трафареты повторяют контур поверхностного слоя и бывают двух видов – прорезные и сетчатые. Прорезные трафареты представляют собой лист полированной фольги, в котором сделаны отверстия соответствующей формы. Их применяют для нанесения модифицирующих составов, имеющих низкую текучесть и сохраняющих геометрию отверстия после удаления трафарета на стадии отверждения.

Сетчатые трафареты – полимерные или металлические сетки с размером ячеек порядка десятков микрометров. Их натягивают на рамы для сохранения постоянства геометрии отверстий. Сетку заполняют специальными фотоотверждаемыми составами или полимерами. Далее на нее накладывают негатив трафарета, выполненный из прозрачного материала, и подвергают УФ-облучению. Затем сетку промывают органическими растворителями, удаляя неотвержденные участки. Готовый трафарет накладывают на подложку, наносят слой пасты и разравнивают его, продавливая сквозь отверстия трафарета специальным ножом – ракелем. При этом обеспечивается полное заполнение отверстий трафарета и постоянство толщины слоя. После снятия трафарета за счет остаточной текучести состав заполняет тонкие перемычки, оставшиеся от нитей сетки, в результате формируется единое сплошное покрытие соответствующего участка подложки.

Обычно для изготовления пленочного электрода требуется последовательное нанесение от двух до четырех слоев. В качестве примера на рис. 1.3 и 1.4 показаны основные технологические стадии формирования единичного планарного электрода (рис. 1.3) и группы электродов (рис. 1.4), типичные для изготовления печатных электродов с помощью трафаретной печати. Сначала на подложку наносят электропроводящую основу – токосъемник. Чаще всего он представляет собой слой дисперсного серебра, иногда – золотые дорожки. Последние могут быть изготовлены отдельно методом вакуумного напыления или химического (электрохимического) осаждения/травления. Токопроводящий слой предназначен для уменьшения общего электрического сопротивления пленочного электрода, поскольку применяемые углеродные составы механически непрочны и имеют недостаточную электропроводность. Далее наносят слой базового углеродного материала – пасты, содержащей отверждаемые компоненты. Его задача – предотвращение контакта токосъемника с модификатором и электролитом. Это необходимо, поскольку дисперсное серебро химически и электрохимически ак-



**Рис. 1.3.** Технологические стадии формирования планарного электрода  
1 – подложка из ПВХ; 2 – серебряный токосъемник; 3 – печать электрода (угольная паста с модификатором); 4 – нанесение изолирующего слоя

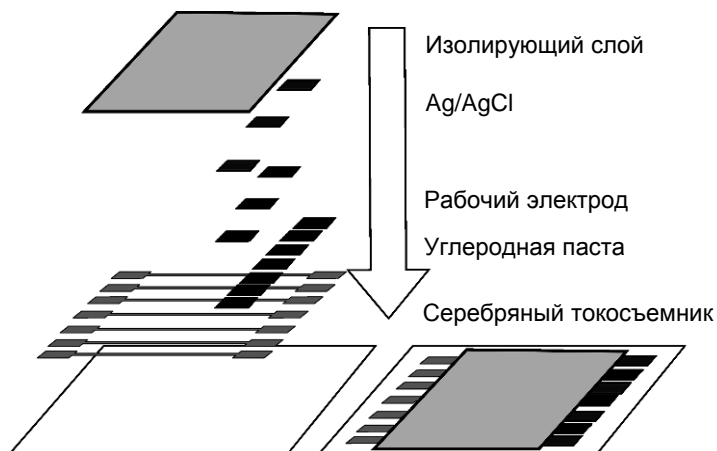
тивно и может давать на вольтамперограммах пики анодного растворения или окисляться.

Базовый графитовый слой может содержать модификаторы, однако их лучше вносить с отдельным слоем пасты, наносимым поверх базового слоя после его отверждения. Это позволяет избежать контакта модификатора с серебром и снизить его расход, т. е. себестоимость электрода.

Если в качестве модификатора использовать дисперсию серебра и хлорида серебра, то получится так называемый *псевдоэлектрод сравнения*. Не обладая в полной мере постоянством потенциала и обратимостью редокс-процесса, такой электрод, тем не менее, вполне может заменить в большинстве случаев классический хлоридсеребряный электрод. Следует помнить, что потенциал псевдоэлектрода смещен относительно потенциала стандартного хлоридсеребряного электрода сравнения, при этом разность потенциалов может составлять от 200 до 300 мВ. В завершение электрод покрывают слоем термостойкого лака или специальной краской, которые капсулируют многослойное покрытие и препятствуют подтеканию электролита и его контакту с токосъемником.

При нанесении многослойных покрытий для каждого слоя используют свой трафарет. Между нанесением слоев электрод сушат при определенной температуре для удаления органических растворителей или термоотверждения. В большинстве случаев температура составляет 100–200 °С. Отдельные трафареты совмещают с точностью до десятков микрометров, что обеспечивает требуемое наложение слоев и позволяет формировать электроды с достаточно сложной геометрией.

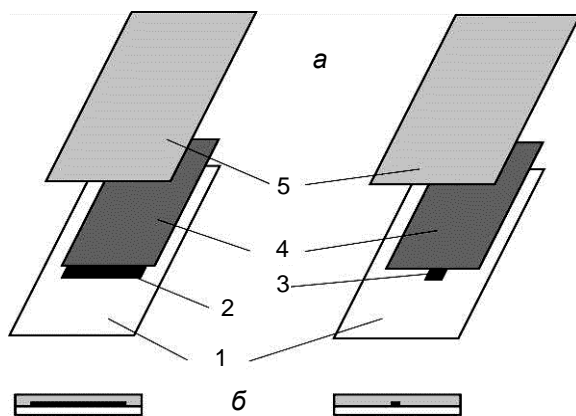
Вариантом трафаретной печати является технология, по которой рабочие элементы электрода формируют отдельно от подложки –



**Рис. 1.4.** Изготовление пленочных электродов методом трафаретной печати

на пластине из нержавеющей стали с накладными прорезными трафаретами. После этого их переносят на пластиковую подложку с помощью силиконовой подушечки, подобно печати с использованием клише. Таким способом можно получить очень тонкие (до 5 мкм) слои. Кроме того, данная технология позволяет использовать подложки, не совместимые с трафаретной печатью, – вплоть до бумаги и термически неустойчивых полимерных материалов.

*Струйная печать* отличается от трафаретной печати использованием для нанесения на подложку более жидких составов – так называемых графитсодержащих «чернил», которые с помощью специальной насадки набрызгивают на подложку. После высыхания они образуют сплошную пленку требуемой геометрии. Как и в обычных струйных принтерах, «пятна» получают, поляризуя капли чернил электростатическим полем. Технология обеспечивает достаточно точное воспроизведение геометрии слоев, но имеет ограничения по составу чернил. В силу меньшей вязкости чернила в процессе высыхания растекаются с образованием трещин, пор и свободных участков. Кроме того, из-за меньшей вязкости и плотности чернил сложнее получить однородные дисперсии нерастворимых компонентов – сажи, модификаторов и пластификаторов. Данный способ позволяет получать сверхтонкие покрытия, а также работать с высокопористыми материалами, малоприспособными для трафаретной печати. Например, одноразовые электроды можно печатать даже на специально подготовленной бумаге. Струйную печать в основном применяют для формирования тонкопленочных электродов с однослойным покрытием, модифицирование которых производится поверхностным способом.



**Рис. 1.5.** Последовательность нанесения слоев (а) и поперечный срез (б) тонкопленочного электрода, полученного ламинированием  
1 – пластиковая подложка; 2 – слой углеродной пасты; 3 – металлическая проволока или углеродное волокно; 4 – медная фольга (токосъемник); 5 – ламинирующая пленка

Интересным приемом является сочетание различных способов формирования поверхностных проводящих слоев и ламинирования. Нанесение термоусадочной пленки, плотно прижимаемой при нагревании к проводящему слою, позволяет надежно изолировать токосъемник от раствора и одновременно обеспечивает унифицированную геометрию и характеристики электрода. Для получения проводящей поверхности достаточно срезать край «сэндвича», состоящего из подложки, проводящего слоя и поверхностной термопленки, либо вырезать в нем сквозное отверстие (рис. 1.5).

Методы фотолитографии и травления применяются в основном для получения пленочных электродов, предназначенных для последующего поверхностного модифицирования. В них поверхностные проводящие слои получают путем избирательного растворения или осаждения сверхтонких пленок металлов, образующихся при восстановлении соответствующих солей или вакуумном напылении с использованием шаблонов, полученных методами фотополимеризации и отверждения, аналогичными применяемым в трафаретной печати. Методы травления используются также для получения электродов сложной геометрии, совмещенных с микрореакторами и микроканалами в микрочипах, формируемых на поверхности кремниевых материалов.

Независимо от конструкции УПЭ содержат ряд обязательных компонентов.

**Токосъемник.** Как правило, это электрод первого рода с высокой коррозионной устойчивостью и химической инертностью, что особенно важно при регистрации анодных токов при высоких

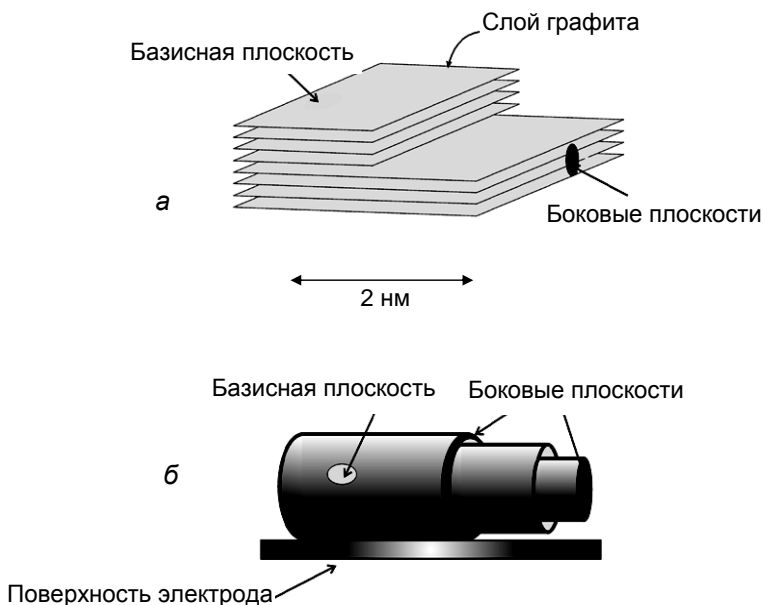
потенциалах. Хотя токосъемник изолирован от окружающей среды слоем электропроводящей пасты и специальными изолирующими материалами, реакции окисления токосъемника могут влиять на потенциал электрода и регистрируемые токи. Например, в случае меди образование оксидной пленки может привести к потере электрического контакта и выходу электрода из строя даже в том случае, когда токосъемник покрыт слоем эпоксидной смолы.

В случае объемных УПЭ в качестве токосъемника лучше всего использовать платину, отличающуюся высокой обратимостью редокс-потенциала и инертностью к большинству агрессивных сред. По экономическим причинам вместо нее применяют серебро, нержавеющую сталь, стеклоуглерод и графит. Требования к материалу токосъемника снижаются, если модифицированный электрод предназначен для регистрации только катодных процессов. Но и в этом случае материал токосъемника может участвовать в образовании смешанного потенциала, если из-за механического повреждения изолирующего слоя или недостатков конструкции устанавливается контакт между токосъемником и раствором.

В некоторых конструкциях УПЭ в качестве токосъемника служит электрод из углеродного материала, в торце которого имеется выемка для нанесения угольной пасты. Преимуществом такого электрода является то, что даже при прямом контакте между стержнем и анализируемым раствором окислительно-восстановительная реакция на границе раздела фаз электрод/раствор не меняется.

В пленочных УПЭ в качестве токосъемников используются проволоки из благородных металлов, углеродные волокна, а также тонкие пленки серебра, золота, платины, наносимые на полимерную или керамическую основу. Нанесение проводящих дорожек проводят с помощью технологий, применяемых в микроэлектронной промышленности (фотолитография, химическое и электрохимическое травление и др.), методом трафаретной печати или спеканием порошков.

**Электропроводящий материал.** В качестве электропроводящих материалов для изготовления УПЭ чаще всего применяются различные углеродсодержащие материалы с содержанием углерода не менее 99 %, в том числе используемые в качестве электродов в спектральных методах анализа, в металлургии и электронике. Это могут быть (в порядке увеличения стоимости) аморфный углерод (сажа), кристаллический и искусственный графит, дисперсный стеклоуглерод, углеродное волокно, углеродная вата, супрамолекулярные структуры (нанотрубки и фуллерены), допированный алмаз и др. Они различаются по степени дисперсности, особенностям получения и строения, наличию поверхностных функциональных групп. Количество и состав этих групп зависит от технологии получения углеродных материалов и их предварительной обработки.

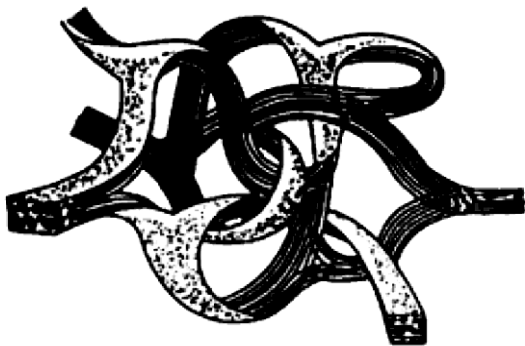


**Рис. 1.6.** Структуры графита (а) и углеродных нанотрубок (б)

Обычно углеродные материалы содержат хиноидные, карбоксильные и фенольные группы, образующиеся в результате неполного окисления поверхностных ароматических фрагментов. Обработка олеумом позволяет получать сульфированные углеродные материалы с поверхностными сульфогруппами.

*Кристаллический графит* – природный материал, представляющий собой жирное на ощупь вещество черного или темно-серого цвета. Структура кристаллического графита состоит из гексагональных полиароматических слоев, уложенных параллельно с промежутками между слоями  $3,35 \text{ \AA}$  (*базисные плоскости*). Это расстояние превышает длину углерод-углеродных связей, что позволяет полиароматическим слоям относительно легко смещаться относительно друг друга. Дефекты поверхности проявляются в виде ступеней (рис. 1.6, а), обнажающих края графитовых слоев, которые называются *боковыми* (краевыми) *плоскостями*. Базисные и боковые плоскости имеют различные электрохимические свойства. Кинетика электродных процессов на боковых плоскостях графитовых электродов более быстрая по сравнению с электродными процессами на базисных плоскостях. Заметим, что инертный при нормальных условиях кристаллический графит окисляется кислородом воздуха при температуре выше  $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , а при  $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$  он сгорает в присутствии  $\text{O}_2$ .





**Рис. 1.7.** Структура стеклоуглерода

*Искусственный графит* получают нагреванием смеси кокса или каменного угля с пеком, иногда в присутствии элементов, образующих карбиды, с последующим медленным охлаждением полученной массы либо при термическом разложении образующихся карбидов. В кристаллической решетке этого типа графита встречаются вздутия, искривления углеродных слоев и дефекты строения, микрополости диаметром до 3 мкм и краевые дислокационные петли размером 0,1–1 мкм. Объем пор может достигать 80–85 % от объема всего материала. Для электродов на основе искусственного графита характерны большие токи заряжения и диффузия раствора электролита в поры. Для уменьшения проникновения электролита в поры графитовых электродов их импрегнируют воском или инертными полимерами (полиэтилен низкого давления, полиэтиленгликоль), глинами, крахмалом и др.

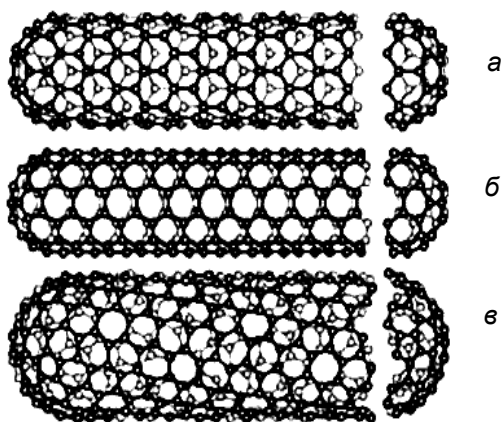
*Стеклоуглерод* получают карбонизацией термореактивных полимеров в вакууме или инертной атмосфере. Он имеет структуру, представляющую собой тесное переплетение углеродных лент (рис. 1.7), что определяет его большую твердость, изотропность свойств, малую пористость и непроницаемость для жидкостей и газов. По коррозионной стойкости стеклоуглерод не уступает платине, но в отличие от нее имеет гидрофобные свойства, что обуславливает особенности некоторых электрохимических процессов, например выделения водорода. Область рабочих потенциалов стеклоуглеродных электродов достаточно широка и близка к области платинового электрода. Для стеклоуглерода характерны низкие адсорбционная активность и ток заряжения, он медленно окисляется, устойчив в присутствии веществ, отравляющих металлические электроды. Недостаток стеклоуглерода – его хрупкость. В электрохимии и электрохимическом анализе обычно применяют пластины и стержни из стеклоуглерода. Они же применяются в качестве токосъемников модифицированных электродов.

Дисперсный стеклоуглерод в виде сферических частиц диаметром от десятков до сотен микрометров включают в состав поверхностных электропроводящих слоев. Такие частицы сохраняют все достоинства стеклоуглерода, хорошо сочетаются с модифицирующими добавками, в том числе с гидрофобными, и обеспечивают хороший контакт между компонентами углеродной пасты. Это позволяет снизить сопротивление электрода и повысить эффективность модификаторов в электрохимических и сопряженных с ними химических реакциях.

Относительно недавно в качестве электропроводящего материала стали применять *искусственный алмаз*, допированный бором. Алмаз с включениями бора представляет собой вещество, в котором примерно один атом углерода из тысячи заменен на атом бора, благодаря чему такой материал обладает проводимостью. Электрохимические свойства искусственных монокристаллических алмазов изучены недостаточно в силу их труднодоступности и плохой проводимости. Появление допированных бором поликристаллических алмазных соединений принципиально изменило положение. Сейчас указанные вещества широко применяются для изготовления электродов при определении преимущественно органических соединений, в том числе в объектах сложного состава. Допированные бором алмазные электроды имеют высокую механическую, химическую и электрохимическую устойчивость, низкую сорбционную активность к компонентам матрицы, а также высокую воспроизводимость сигнала даже без специальной подготовки пробы. Следует заметить, что токи, регистрируемые на электродах из алмаза, допированного бором, как правило, ниже, чем токи на стеклоуглеродных электродах той же площади рабочей поверхности.

Термин *пористый углерод* объединяет несколько углеродных материалов, особенность которых – большой внутренний объем пор. Они различаются по степени открытости пор, газонаполнению и поглощающей способности при контакте с жидкостями. Их применяют для получения импрегнированных электродов, поскольку при соответствующей обработке (так называемое открытие пор в результате частичного окисления, механической и плазменной обработки, вакуумирования, промывки органическими растворителями) они способны поглощать значительные объемы растворов модификаторов. Интерес к этим материалам растет в связи с энергетической неоднородностью их поверхности, что позволяет использовать материалы из пористого углерода наряду с фуллеренами и углеродными нанотрубками в качестве медиаторов электронного переноса и компонентов электрокаталитических систем.

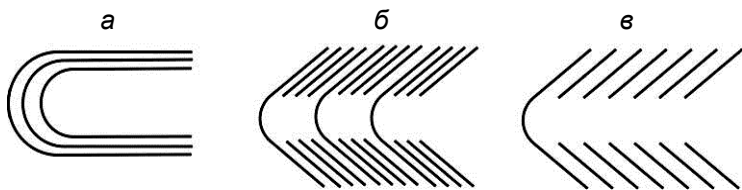
*Углеродные нанотрубки* представляют собой структуры, состоящие из слоев графита, свернутых в трубку (рис. 1.6, б). Трубки бывают открытыми (с доступным внутренним пространством) и за-



**Рис. 1.8.** Схематическое изображение одностенных углеродных нанотрубок с конформациями зигзаг (а), кресло (б) и спираль (в)

крытыми. В последнем случае на концах трубок находятся фуллереноподобные «крышки». Нанотрубки получают путем осаждения частиц графита на специальных поликристаллических материалах, выполняющих функции шаблона и задающих структуру нанотрубок. Для этого используют коронарный разряд в высоком вакууме, а источником углерода могут выступать как органические соединения, так и, например, оксид углерода. Углеродные нанотрубки могут состоять из одного слоя или нескольких слоев, вложенных друг в друга. Соответственно их называют одно- и многостенными трубками. Одностенные трубки имеют диаметр от 0,4 до 2,5 нм; наиболее устойчивому энергетическому состоянию отвечает диаметр 1,4 нм. Длина трубок составляет от нескольких микрометров до десятых долей миллиметра. Одностенные трубки отличаются по взаимному расположению гексагонов углерода – скрученности. В соответствии с этим параметром выделяют три наиболее устойчивые конформации – зигзаг, кресло и спираль (рис. 1.8).

Многостенные нанотрубки разнообразнее по строению и линейным размерам. Часто они имеют дефекты поверхностных слоев, образующих боковые и базисные плоскости, аналогично графиту. Многостенные трубки отличаются также взаимным расположением слоев. Различают нанотрубки с полостями, «елочным» и «бамбуковым» расположением отдельных слоев (рис. 1.9). Расстояние между слоями в многостенных трубках составляет 3,4 Å, что несколько больше, чем в традиционном графите. «Елочную» структуру (в англоязычной литературе – «селедочный скелет») можно рассматривать как частный случай расположения внутренних слоев графита с произвольным углом  $0^\circ < \varphi < 180^\circ$  между отдельными слоями; если  $\varphi = 0^\circ$ , нанотрубка состоит из параллельных концент-



**Рис. 1.9.** Многостенные нанотрубки с полостью (а), с «бамбуковой» (б) и «елочной» (в) структурой

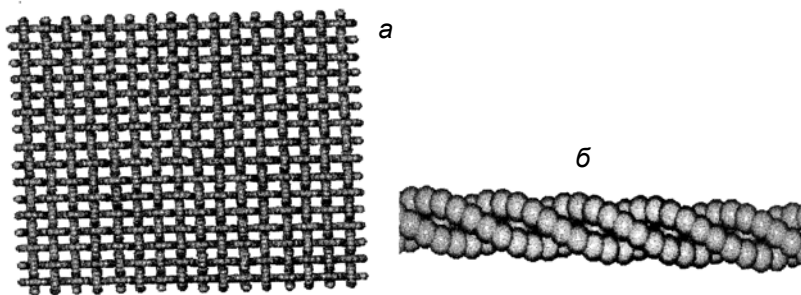
рических слоев (рис.1.9, а), если же  $\varphi = 180^\circ$ , то структура отвечает графиту с открытыми боковыми гранями смещенных слоев (рис. 1.6, а).

Линейные размеры, извилистость и морфология поверхности углеродных нанотрубок могут изменяться в процессах их обработки (окисление, солублизация, образование комплексов с полиионными и полимерными компонентами), а также при переносе из суспензий на поверхность электрода.

Как правило, нанотрубки содержат не менее 95 % углерода и загрязнены оксидами металлов, применяемыми в качестве катализаторов (шаблонов) при синтезе нанотрубок. Перед использованием нанотрубки обрабатывают концентрированными кислотами для удаления примесей металлов и частичного окисления концевых фрагментов. Последнее необходимо для их солублизации. Кроме того, окисление уменьшает число слоев в многостенных нанотрубках и среднюю длину одностенных. Аналогично фуллерену нанотрубки имеют высокую электрокаталитическую активность и химическую инертность, что позволяет использовать их в химических и биохимических сенсорах. При наличии боковых плоскостей каталитические свойства нанотрубок усиливаются, причем скорость электродных реакций на боковых плоскостях гораздо выше, чем на базисных. Активные центры на боковых плоскостях, образующиеся на концах и вдоль оси нанотрубки (в местах, где слои графита прерываются), обеспечивают более быстрый перенос электрона по сравнению с немодифицированными графитовыми электродами. Подтверждение роли боковых плоскостей в электрокаталитических реакциях получено в экспериментах с использованием высокоупорядоченного пирографита.

Из-за высокой стоимости, малых масштабов производства и сложности получения углеродные нанотрубки практически не применяются в качестве основного электропроводящего материала, а используются только для модифицирования электродов, в том числе в сочетании с другими модификаторами. Известны пленочные электроды, в которых нанотрубки вводят в углеродную пасту.

Значительно реже в качестве модифицирующих компонентов применяются «косы», «шнурки» и «коврики» из нитевидных моле-



**Рис. 1.10.** Структуры «ковриков» (а) и «шнурков» (б) из нитевидных молекул углерода

кул углерода (рис. 1.10). В природе такие структуры известны давно – это спиральные макромолекулы амилозы, ДНК и т. п.

Из материалов, не содержащих аллотропных модификаций углерода, применяют смеси оксидов металлов, электропроводящие полимеры (полианилин, политиофен, полипиррол), ионные жидкости и «загущенные» полимерные электролиты. Электрическое сопротивление таких паст превышает сопротивление паст из углеродных материалов. Их применение обусловлено необходимостью снижения себестоимости электродов (замена благородных металлов) либо повышения селективности сигнала. Например, некоторые органические вещества можно определять после их химического взаимодействия с оксидами поверхностного слоя электрода. Металлооксидные слои формируют химически (окислением металлов или гидролизом и прокаливанием их солей) либо электрохимически (анодное окисление металлов). Они могут играть роль модификатора, участвуя в комплексообразовании с органическими лигандами или в переносе электрона. Для поверхностного модифицирования электродов применяют и «органические полупроводники» – органические соединения, осуществляющие перенос электрона через границу раздела фаз. К ним относятся электропроводящие полимеры (полианилин, полипиррол) и некоторые низкомолекулярные соединения (тетратиафульвален, тетрацианохинодиметан).

**Дополнительные компоненты.** Их число может быть весьма значительно, а причины включения в состав электродного вещества различны. Основные виды дополнительных компонентов, как и примеры их использования, приведены в табл. 1.1. Рассмотрим некоторые из них более подробно.

Поскольку углеродные материалы и модификаторы имеют высокую сыпучесть и низкую пленкообразующую способность в состав углеродной пасты добавляют *связующие компоненты* и *пластификаторы* (инертные наполнители). Они обеспечивают вязкость и эластичность покрытия, необходимые для функционирования

**Таблица 1.1. Компоненты углеродных паст**

Компонент	Назначение	Примеры
Электропроводящий материал	Обеспечение электрического контакта между модификатором и токосъемником	Дисперсные фазы металлов, органические полупроводники (полианилин, полипиррол), углеродные материалы (нанотрубки, графит и др.)
Связующее	Соединение компонентов паст, прежде всего углеродных материалов	Глина, эпоксидные смолы, парафин, воск, полисилоксаны
Пластификатор	Достижение необходимых реологических характеристик и пластичности паст	Воск, полиэтилен низкого давления, силиконовое масло, нуйол, дибутилфталат, минеральное масло
Стабилизатор	Повышение химической устойчивости модифицирующих добавок	Силикагели, ксерогели, цеолиты, крахмал
Медиатор электронного переноса	Снижение рабочего потенциала электрода, увеличение величины сигнала отклика и селективности	Оксиды переходных металлов, ферроцен, фталоцианины, феноптиазины, порфирины, дисперсные фазы металлов
Комплексообразователь	Повышение поверхностной концентрации определяемых компонентов	Нафийон, производные нитрилотриуксусной кислоты, диметилглиоксим, ароматические спирты и амины, антители
Реагент	Осуществление или ускорение химических реакций с участием определяемых соединений (аналита)	Ферменты, бром, иод, дисперсные фазы металлов, меркаптаны
Сорбент	Повышение селективности и увеличение поверхностной концентрации определяемых соединений	Политетрафторэтилен, силикаты, цеолиты, глины, полистиролсульфонат, хроматографические фазы, ДНК

ния электрода и его последующей эксплуатации. Соотношение между ними определяется как компромисс между требованиями по электропроводности (количество углеродного компонента должно быть по возможности максимальным) и стабильностью пасты, которая возрастает с увеличением доли связующего. Обычно массовая доля инертных наполнителей составляет 30–70 %.

В качестве пластификаторов применяют парафин, воск, силиконовое масло, полиэтилен низкого давления, реже высокомолекулярные полиэтиленгликоли, эпоксидные смолы, политетрафтор-

этилен и производные целлюлозы. Могут использоваться природные и синтетические гели – глины, агар, гидратированные силикагели, продукты поликонденсации органических эфиров, полисилоксаны и др. Заметим, что гидрогели неустойчивы при высушивании электродов. Вместо них могут применяться ксерогели – высокопористые продукты контролируемого высушивания гидрогелей.

При выборе инертных наполнителей следует руководствоваться критериями их химической и электрохимической инертности, низкой набухаемости и постоянства физико-химических характеристик при колебаниях температуры, воздействии органических растворителей, воды, макрокомпонентов пробы и изменении pH. Кроме того, имеет значение совместимость наполнителей и модификаторов. Если модификатор вводят в пасту в виде раствора в органическом растворителе, предпочтительно использовать гидрофобные растворители, поскольку при этом повышается однородность распределения модификатора в пасте после удаления растворителя. Гидрофобные компоненты уменьшают также капиллярный эффект и способность электродов поглощать растворы электролитов, что нежелательно при их эксплуатации в водной среде. Введение в пасту полярных сорбентов способствует поглощению модификаторов, увеличивая емкость электрода.

Помимо обеспечения требуемых механических характеристик инертные наполнители могут выполнять и другие функции. Например, обработка поверхности воском или введение воска в состав пасты снижает газонаполнение пористых углеродных материалов и повышает соотношение сигнал/шум. Инертные наполнители могут также играть роль носителя модификатора, удерживаемого на поверхности частиц силами сорбции. С этой целью применяют хроматографические фазы, отличающиеся высокой сорбционной активностью и однородностью гранулометрического состава. Кроме того, инертные наполнители могут стабилизировать неустойчивые модификаторы, в том числе на стадии отверждения электродов, которая протекает в экстремальных условиях (повышенная температура, присутствие химически активных отвердителей, воздействие ультрафиолета и др.).

**Модификатор** – вещество, позволяющее получить сигнал-отклик определяемого соединения или желательное изменение сигнала относительно немодифицированного электрода (повышение селективности и чувствительности, маскирование макрокомпонентов пробы и др.). Присутствие модификатора в пасте обусловлено предназначением электрода и требуемыми аналитическими и электрохимическими характеристиками. Его содержание в пасте обычно составляет несколько массовых процентов.

По механизму действия модификаторы классифицируются следующим образом.

*Медиаторы электронного переноса* – вещества, обеспечивающие либо снижение рабочего потенциала, либо увеличение регистрируемого тока, либо то и другое вместе. В некоторых случаях медиаторы электронного переноса позволяют также решать задачи повышения селективности отклика, катализируя редокс-превращения определяемых соединений, но не влияя на реакционную способность мешающих компонентов пробы. Иногда говорят, что модификаторы этой группы осуществляют электрокатализ превращения определяемого вещества. В целом механизмы электрокатализа не обязательно сводятся к медиаторному переносу электрона. Однако в практике электрохимического анализа такое различие несущественно.

*Комплексообразователи* – вещества, образующие комплексные соединения с определяемыми компонентами, что повышает поверхностную концентрацию последних и тем самым способствует увеличению тока их восстановления (окисления). Особенно часто комплексообразователи используются в различных вариантах инверсионной вольтамперометрии. Поскольку потенциалы восстановления (окисления) комплексов отличаются от соответствующих потенциалов свободных соединений, комплексообразование является одним из эффективных приемов разделения сигналов соединений, дающих отклик на немодифицированных электродах в близкой области потенциалов. С помощью комплексообразования можно вовлечь в инертный комплекс не определяемое, а мешающее соединение, осуществляя маскирование. Большинство комплексообразователей-модификаторов имеют водорастворимые аналоги, применяемые в традиционной аналитической химии. Для перевода в нерастворимую форму их внедряют в состав сорбентов или ковалентно пришивают (прикрепляют) к поверхности инертных наполнителей. Как правило, комплексообразователи применяются в анализе ионов металлов. Известны также селективные комплексообразователи для некоторых органических соединений. Комплексообразователями являются и иммунореагенты (антитела), образующие прочные комплексы с антигенами, – веществами, инициирующими иммунный ответ организмов. Electrodes такого типа называются иммуносенсорами.

*Реагенты* – вещества, вступающие в химические реакции с определяемыми компонентами с образованием соединений, электрохимически более активных, чем исходные. Поскольку химические реакции протекают практически необратимо, требуется процедура периодического обновления реагента в объеме электрода. Для этого электрод время от времени вымачивают в растворе реагента. Частный случай – электрохимическая генерация реагента, реагирующего далее с определяемым соединением. Такой способ получения сигнала-отклика достаточно длителен, поэтому реагенты применяются в тех случаях, когда определяемое вещество элек-



трохимически неактивно и имеет низкую адсорбционную способность. Применение реагентов позволяет повысить эффективность накопления веществ, присутствующих в низких концентрациях, например, при их экстракции из газовой фазы или раствора. Реагенты могут повысить селективность определений, а также нивелировать действие мешающих веществ.

Классическими модификаторами являются биополимеры, применяемые для изготовления биосенсоров. Например, ферменты, введенные в состав материала электрода, катализируют превращение субстрата, продукт которого проявляет электрохимическую активность и может быть зарегистрирован по току восстановления (окисления). Высокая специфичность биохимического распознавания обеспечивает селективность сигнала, а введение биохимического компонента в углеродную пасту повышает его стабильность и снижает растворимость. Объемная модификация биологическими компонентами – один из способов их иммобилизации на электроде и создания амперометрических биосенсоров. Его преимущества – легкость обновления рабочего слоя, когда потерявший активность биологический компонент удаляется вместе с пастой, простота иммобилизации, возможность электрического контакта между материалом электрода и белком (в случае редокс-активных белков и ряда ферментов класса оксидоредуктаз). Однако по сравнению с поверхностным модифицированием электрода объемное модифицирование требует большего количества дорогостоящих биополимеров. Кроме того, некоторые вещества, входящие в состав пасты (отвердители, модификаторы и др.), не всегда совместимы с биологическими компонентами.

*Сорбенты* – вещества, способные увеличить поверхностную концентрацию определяемого компонента, например циклодекстрины. Эта группа модификаторов менее однородна, чем другие, упомянутые выше. С формальной точки зрения, комплексообразователи и реагенты решают одну и ту же задачу, поэтому под сорбентами понимают вещества, взаимодействующие с определяемыми соединениями неспецифически, преимущественно за счет электростатических или гидрофобных взаимодействий. Соответственно их действие менее селективно, они способны накапливать не одно, а несколько соединений, обладающих близкими характеристиками – зарядом или гидрофильно-гидрофобным балансом.

Поскольку большинство модифицированных электродов используется в водных или водно-органических средах, существенное значение имеет гидрофобизация материала электрода, способствующая повышению чувствительности определений малополярных и неполярных органических соединений. Например, таким образом можно оценить вклад полярных и неполярных соединений в величину сигнала окисления органических компонентов сточных вод. Для этого в качестве модификаторов применяют

привитые хроматографические фазы, в том числе нанесенные на сорбенты, выполняющие функции инертных носителей и стабилизаторов. В некоторых случаях гидрофобизация используется как вспомогательный прием при введении второго медиатора, например в целях снижения его растворимости в воде или для однородного распределения компонентов в объеме электрода.

Ионообменные соединения и полиэлектролиты применяются для снижения влияния заряженных частиц, имеющих одноименный заряд с модификатором. Например, таким способом можно снизить мешающее влияние аскорбиновой кислоты при окислении пероксида водорода. Для этого в состав углеродной пасты вводят полистиролсульфонат или глину, которые электростатически отталкивают аскорбат-анионы от поверхности электрода. При этом наблюдается либо увеличение перенапряжения восстановления (окисления) мешающего иона, либо снижение его тока из-за уменьшения поверхностной концентрации. При групповом определении следовых количеств ионов металлов в питьевых водах их накапливают на электродах, модифицированных нафием или анионными ПАВ. Такие же свойства проявляют некоторые белки и липиды.

Данная классификация не исчерпывает все типы компонентов, включаемых в материал электрода. Во-первых, многие компоненты одновременно выполняют несколько функций. Например, улучшение механических характеристик электрода может быть совмещено с его гидрофобизацией и снижением сорбции мешающих компонентов путем изменения заряда поверхности или заполнения свободного пространства. При этом модификатор может выполнять роль связующего. Во-вторых, в современных УПЭ редко используется только один модификатор – обычно это композиция, состоящая из нескольких компонентов, взаимно дополняющих и усиливающих действие друг друга. В-третьих, объемное модифицирование почти всегда дополняется поверхностным, особенно в случае пленочных электродов. Задачи объемных и поверхностных модификаторов пленочных электродов различаются; объемные модификаторы в основном обеспечивают механические характеристики покрытия и однородность его состава, тогда как поверхностные модификаторы обеспечивают требуемые характеристики отклика (селективность, чувствительность и т. п.).

Предложены и другие классификации модификаторов – на основе их химической природы. Например, аффинные модификаторы объединяют биохимические реагенты, обладающие высокой специфичностью связывания, – антитела, нуклеиновые кислоты, рецепторы и др. Они могут иметь разный механизм взаимодействия с определяемым веществом – реагентный (ферменты), комплексообразующий (иммунные реакции, взаимодействие авидин-биотин), неспецифический (накопление малополярных соединений в липид-

ных слоях). Их объединяет только происхождение модификаторов – все они участвуют в естественных биохимических процессах. Различают также органические и неорганические, высоко- и низкомолекулярные модификаторы и др. Указанные классификации не несут информации о характере процессов, но позволяют судить о потенциальных свойствах модификаторов и способах их иммобилизации на электроде.

**Способы введения модификатора в объем электрода.** В зависимости от природы модификаторов и особенностей конструкций электродов различают два основных способа введения модификатора в объем электрода – добавление модификатора на этапе формирования электрода и введение в объем электрода после его изготовления. В первом случае модификатор диспергируют вместе с электропроводящим материалом, связующим и пластификатором при приготовлении пасты. Обычно так поступают тогда, когда модификатор представляет собой достаточно труднорастворимое дисперсное вещество, размеры частиц которого не изменяются при механическом перемешивании пасты. Чем тщательнее диспергированы компоненты и однороднее паста, тем лучше воспроизводимость характеристик электрода. Поскольку с уменьшением размера частиц увеличивается вклад поверхностных сил и способность к электризации, для облегчения диспергирования в смесь добавляют водные растворы электролитов и поверхностно-активных веществ. Эти добавки не влияют на электрохимическое поведение модификаторов и определяемых компонентов и необходимы только на стадии приготовления пасты. С той же целью в пасту добавляют тальк или крахмал, препятствующие слипанию частиц модификатора.

Данный способ введения модификатора в пасту может иметь некоторые вариации в зависимости от конкретных характеристик модификаторов и состава пасты. Так, если модификатор представляет собой органическое вещество, его можно ввести в пасту в виде раствора в летучем органическом растворителе, который после приготовления пасты и изготовления электрода удаляют при нагревании или вакуумированием. Это позволяет повысить однородность распределения модификатора среди других компонентов пасты. Так же поступают, когда содержание модификатора настолько мало, что не позволяет добиться его равномерного распределения путем обычного механического перемешивания. В некоторых случаях модификатор сначала растворяют в одном или нескольких компонентах пасты, которые затем смешивают с основным компонентом – графитом или другим электропроводящим материалом. При этом следует иметь в виду, что пластификатор (как изолятор) может ухудшать электрический контакт модификатора с электропроводящим компонентом и условия доступа к нему определяемого вещества.

Для изготовления УПЭ с низким содержанием модификаторов применяют инертные сорбенты с высокоразвитой поверхностью. Модификатор сначала сорбируют на поверхности оксида алюминия, глины или цеолита, затем сорбент высушивают и смешивают с графитом. Сорбцию модификаторов можно осуществлять как из органических, так и из водных растворов. Применение сорбентов позволяет приготовить модификаторы для большой партии УПЭ, что обеспечивает постоянство их метрологических характеристик. Кроме того, сорбенты препятствуют вымыванию из пасты водорастворимых модификаторов, а значит, увеличивают срок службы электродов. Наконец, при сорбции стабилизируются неустойчивые состояния модификаторов, снижается скорость их окисления и гидролиза.

### 1.1.2. Импрегнированные и композитные электроды

Второй основной способ внесения модификатора в объем электрода – введение его в готовый электрод. В этом случае могут применяться разнообразные электропроводящие материалы. Это может быть достаточно пористый монолитный материал, например пирографит, или непроводящие керамические стержни, пропитанные электропроводящими полимерами, угольной суспензией или суспензиями наночастиц металлов, другими проводящими составами. Такие электроды называются *импрегнированными*. Они выгодно отличаются от классических УПЭ лучшими механическими и более стабильными электрохимическими характеристиками, широким температурным интервалом эксплуатации, лучшей воспроизводимостью результатов измерений. Их основной недостаток – неравномерное распределение компонентов пропитки по объему электрода. Они, как правило, концентрируются в поверхностном слое электрода и убывают по мере удаления от поверхности контакта с раствором.

Жидкие модификаторы могут применяться для пропитки непосредственно, но обычно их разбавляют подходящими органическими растворителями, что снижает вязкость и облегчает проникновение модификатора в поры электрода. Количество модификатора в этом случае определяется доступным объемом пор. После пропитки электрод высушивают, при этом по мере высушивания растворенный модификатор осаждается на внутренней поверхности пор так, что небольшие каналы могут полностью перекрываться и часть раствора оказывается в объеме электрода. Это одна из причин нестабильности характеристик импрегнированных электродов. После первой пропитки импрегнированный электрод можно обработать повторно, увеличивая количество поглощенного модификатора. Так поступают, например, если модификатор ограни-

ченно растворим в органическом растворителе и однократная пропитка не позволяет достичь его требуемой концентрации.

В качестве растворителя может служить и пластификатор. Он заполняет поры электрода, вытесняя воздух, что способствует улучшению характеристик сигнала. В некоторых случаях достаточно использовать только пластификатор, например воск, чтобы улучшить отношение сигнал/шум и повысить чувствительность электрода к полярным органическим соединениям (фенолам, аминам, альдегидам и др.). В других случаях процедуру импрегнирования проводят таким образом, чтобы максимально заполнить внутренний объем пор электрода. В противном случае диффузия и захват электролита не только увеличивают фоновый ток, но приводят к так называемому «эффекту памяти», когда величина сигнала-отклика зависит от предыдущего измерения. Если концентрация определяемого вещества в серии измерений снижается, «эффект памяти» выражается в завышении второго и последующих измерений, если же концентрация определяемого вещества возрастает – электрод дает заниженные значения сигнала.

Менее распространен способ импрегнирования, заключающийся в прокачивании модифицирующего раствора через пористый электрод под действием избыточного давления или вакуума. Хотя такой способ обеспечивает более равномерное распределение модификатора по объему электрода и позволяет повысить эффективность заполнения пор, он предъявляет более жесткие требования к механической прочности электродного материала. Кроме того, чем меньше средний размер пор, тем лучше операционные и электрохимические характеристики импрегнированного электрода, но тем сложнее прокачать через него раствор модификатора. Следует заметить, что процесс импрегнирования необратим. Если угольную пасту можно подвергнуть повторной гомогенизации или «исправить» добавлением отдельных компонентов, то импрегнированный электрод, если он приготовлен неправильно, «исправить» не удастся и его придется выбросить.

Один из вариантов – получение модификатора после стадии импрегнирования. Для этого электрод последовательно пропитывают двумя реагентами, взаимодействующими между собой. Например, при последовательной пропитке электрода растворами солей серебра или золота и восстановителя можно получить электрод, модифицированный мелкодисперсными частицами металлов, проявляющими электрокаталитические свойства.

В ряде случаев для изготовления электродов применяют полимеры и другие связующие, текущие лишь при повышенной температуре, – полиэтилен низкого давления, парафин, каучуки, воск, эпоксидные смолы и др. Компоненты пасты нагревают, смешивают с модификаторами, наполнителями и после гомогенизации и изготовления электрода охлаждают и механически обрабатывают рабо-

чую поверхность для придания ей гладкости. Такие электроды называются *композитными*. Они представляют собой те же пасты, в которых отдельные компоненты лишены подвижности относительно друг друга. Их изготавливают аналогично классическим УПЭ, но после формования электрод подвергают специальной обработке для скрепления отдельных частиц наполнителя. Это достигается спеканием порошков металлов и их оксидов, термическим разложением минералов с образованием монолитных высокопористых структур, полимеризацией мономерных компонентов (композиты на основе эпоксидных смол, составы, получаемые методом золь-гель полимеризации и др.), фотоотверждением (УФ-полимеризуемые составы) и т. д.

При выборе связующего исходят из его способности обеспечивать хорошую адгезию к компонентам пасты, прочность, водостойкость, химическую инертность и, что немаловажно, низкую стоимость и удобство в эксплуатации. Наиболее полно этим требованиям удовлетворяют эпоксидные композиции, состоящие из эпоксидного олигомера и отвердителя. Наличие в олигомерах алифатических и ароматических фрагментов, эфирных и гидроксильных групп обеспечивает высокую прочность электродов и хорошую адсорбционную способность по отношению к различным модификаторам. Для отверждения эпоксидных смол, как правило, применяют алифатические диамины.

Модифицированные электроды из композитных материалов привлекательны тем, что на стадии формования у них легко модифицируется не только поверхность, но и весь объем электродного вещества, что способствует получению более воспроизводимых результатов измерений. Простота технологии изготовления многих композитных электродов с заданными свойствами делает их перспективными для применения в электрохимическом анализе.

## **1.2. ПОВЕРХНОСТНОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОДОВ**

### **1.2.1. Физическая адсорбция модификатора на поверхности электрода**

Физическая адсорбция позволяет проводить мягкое закрепление различных модификаторов на поверхности электродов или в тонком приповерхностном слое, толщина которого определяется глубиной проникновения электролита. Считается, что для УПЭ и графита толщина этого слоя составляет не более 100 мкм; в случае металлических, стеклоуглеродных, металлооксидных электродов таким проникновением можно пренебречь. Физическая адсорбция контролируется слабыми межмолекулярными взаимодействиями, не связанными с образованием ковалентных связей. Чаще всего речь идет об электростатических и вандерваальсовых (гидрофоб-

ных) взаимодействиях. Примером может служить адсорбция полициклических ароматических соединений на углеродных материалах. В ее основе – структурное подобие бензольных колец определяемого вещества и гексагонов углеродной поверхности электрода.

Широко используется включение в поверхностный слой золотых электродов фенотазинových и феноксазиновых медиаторов электронного переноса (нейтральный красный, метиленовый синий, нильский голубой), а также ароматических аминов и спиртов, 2,6-дихлорфенилиндифенола, гидрохинона, пирокатехина. Их адсорбция облегчается плоской структурой молекул с разветвленной  $\pi$ -ароматической системой. Еще один пример адсорбции модификатора, содержащего молекулы с разветвленной системой  $\pi$ -электронов, – удерживание порфириновых комплексов кобальта на поверхности графитового электрода. Хинонзамещенные олефины хорошо адсорбируются на платиновых электродах. Для увеличения площади поверхности электроды предварительно покрывают платиновой чернью.

Физическую адсорбцию проводят аналогично импрегнированию, нанося на электрод небольшое количество модификатора (обычно в растворе) с последующей отмывкой избытка реагента. В этом случае достаточно сложно контролировать количество адсорбированного модификатора, который зачастую образует несколько слоев. При этом обеспечивается определенный запас прочности модифицирующего покрытия, а значит, больший срок службы электрода. Примером многослойного покрытия может служить система катехол/хинон, выполняющая функцию медиатора электронного переноса. Однако многослойная адсорбция плохо воспроизводима. Фактически взаимодействия, упомянутые выше, обеспечивают сцепление с материалом электрода только первого слоя, тогда как остальные слои адсорбируются на совершенно другой поверхности – собственно модификаторе. В результате силы сцепления первого и последующего слоев заметно различаются. При этом в процессе эксплуатации электрода происходит частичный смыв модификатора с рабочей поверхности. Важным исключением является осаждение соединений, способных к самоорганизации на границе раздела фаз. В частности, вещества, обладающие жидкокристаллическими свойствами, такие как холестерин, образуют упорядоченные многослойные структуры, хорошо воспроизводимые и обладающие функцией распознавания, например оптически активных изомеров аминокислот.

Поскольку физическая адсорбция – термодинамически обратимый процесс, разработаны варианты, ограничивающие скорость десорбции модификатора. Примером является так называемая электростатическая адсорбция. В ней электрод, на который наносится вещество, поляризуют для придания ему заряда, противоположного заряду модификатора. Размыкание цепи или изменение

потенциала поляризации электрода приводит к контролируемой десорбции модификатора.

К электростатической адсорбции относятся также варианты, в которых электрод сначала покрывают полиэлектролитом (нафийон, полистиролсульфонат, поливинилпирролидон, полиаллиламин, частично замещенные поливинилпиридины), а затем на образующемся заряженном слое электростатически осаждают низкомолекулярные заряженные или полярные соединения. Последовательность добавления реагентов можно изменить, поскольку образующиеся комплексы менее растворимы, чем исходные компоненты, что повышает стабильность адсорбированного слоя.

Если обработать электрод полиэлектролитами, несущими противоположные заряды (например, полиэтиленимином и нафийоном), то образуются устойчивые многозарядные ионные комплексы, способные удерживать достаточно крупные молекулы, такие как белки или рецепторные структуры биологических мембран. Достоинство комплексов на основе полиэлектролитов в том, что их состав достаточно просто контролировать. Осаждение «полииона» происходит, как правило, в виде мономолекулярного слоя, причем число осаждаемых монослоев определяется последовательностью добавления полиэлектролитов противоположного знака. В состав таких комплексов могут входить и неорганические компоненты. Например, отрицательным полиионом может быть оксидный слой металлического электрода, а также некоторые алюмосиликаты, включаемые в пасту до или после модифицирования.

Эффективность образования полиионных комплексов, как и электростатической адсорбции в целом, зависит от условий эксперимента. Присутствие многозарядных ионов фоновой электролиты и минеральных кислот, высокая ионная сила раствора снижают эффективность электростатической адсорбции как на поляризованном электроде, так и в отсутствие поляризации, тогда как смешивающиеся с водой органические растворители ее повышают. Электростатическая адсорбция наиболее эффективна, когда модификатор несет достаточно большой заряд, как, например, нуклеиновые кислоты, белки, полиэлектролиты. Особенности адсорбционного модифицирования биологическими компонентами рассмотрены ниже в разделах, посвященных амперометрическим биосенсорам.

Другой распространенный прием – механическое ограничение смыва модификатора, достигаемое, например, при использовании полимерных покрытий мембранного типа. Эффективность применения мембран можно повысить, если учитывать собственный заряд поверхности мембраны и ее буферные свойства. В зависимости от природы модификатора и его назначения варьирование указанных параметров может не только повысить стабильность модифицирующего покрытия, но и улучшить аналитические характеристики электрода за счет ограничения диффузионного переноса меша-



ющих компонентов или достижения благоприятного интервала рН в приэлектродном слое.

Хотя физическая адсорбция термодинамически обратима, в некоторых случаях скорость десорбции модификатора настолько мала, что ею в условиях эксплуатации электрода можно пренебречь. В этом случае говорят о необратимой адсорбции, подразумевая, что удаление адсорбированного реагента проходит в особых условиях – при повышенных температурах или в присутствии специальных реагентов. Например, такая условно «необратимая» адсорбция характерна для соединений, имеющих более двух ароматических центров, связанных системой сопряженных  $\pi$ -связей, при контакте с пирографитом и рядом других углеродных материалов. Прочно, иногда необратимо, адсорбируются на графите и углях многие комплексные соединения переходных металлов (фталоцианиновые, порфириновые, фенантролиновые и дипиридильные комплексы кобальта и железа, макроциклические комплексы, хлорофилл и др.). При этом образуются монослойные или близкие к ним покрытия, в которых обмен электронов с электродом происходит обратимо. Об этом свидетельствуют соответствующие вольтамперограммы комплексов, потенциалы пиков которых близки к их редокс-потенциалам.

Окисление углеродных материалов кислородом воздуха, а также предварительная обработка, способствующая окислению (нагрев, воздействие аргоновой плазмы, ультразвука, мокрое окисление сильными окислителями), благоприятствуют адсорбции полярных органических соединений, включая белки и нуклеиновые кислоты. Это выражается не только в увеличении количества адсорбированных молекул, но и в их более тесном контакте с поверхностью электрода, что облегчает перенос электрона. В случае адсорбции на оксидах переходных металлов физическая адсорбция иногда сопровождается химическим взаимодействием материала поверхностного слоя электрода и модификатора. Хемосорбция повышает прочность удерживания модификаторов, но зачастую способна изменить характеристики электрода в нежелательном направлении. Помимо собственно модифицирования поверхностные реакции с участием модификаторов ответственны за ухудшение операционных и аналитических характеристик электродов в процессе их эксплуатации.

Увеличение площади поверхности электрода повышает количество адсорбированного модификатора. Этого можно достичь, используя различные варианты травления или частичного анодного растворения металлических электродов, а также модифицированием электродов наночастицами металлов или нанотрубками. Например, коллоидное золото успешно применяется для увеличения адсорбционной способности электродов к ДНК. При этом поверхностная концентрация олигонуклеотидов достигает  $4 \cdot 10^{14} \text{ см}^{-2}$ . За-

метим, что площадь поверхности открытых однослойных углеродных нанотрубок достигает  $2700 \text{ м}^2/\text{г}$ . Конечно, далеко не вся эта площадь доступна для реакции с модификатором, но относительное увеличение концентрации адсорбированного модификатора при нанесении нанотрубок составляет тысячи и десятки тысяч раз. Меняя организацию наночастиц на поверхности электрода, можно управлять его селективностью и чувствительностью. Так, модифицирование стеклоуглерода наночастицами никеля и его оксидов размером 3 нм повышает чувствительность определений глюкозы на порядок по сравнению с традиционным никелевым электродом. Большое значение имеет также число слоев наночастиц, закрепленных на поверхности. В случае электрода из смеси оксидов индия и олова (англ. ITO-электрод, где I – indium, T – tin, O – oxide), модифицированного наночастицами золота, установлено, что чувствительность определения *n*-гидрохинона возрастает с увеличением числа слоев модификатора. Модифицирование поверхности электродов наночастицами металлов вызывает повышенный интерес еще и потому, что такие частицы имеют специфические свойства, которые связывают в первую очередь с тем, что на поверхности наночастиц находится большое число атомов с высокой поверхностной энергией.

В настоящее время особое внимание уделяется монослойным покрытиям, образующимся при адсорбции модификаторов на золотых и углеродных электродах. При надлежащей подготовке поверхности электрода монослойные покрытия отличаются высокой степенью упорядоченности и энергетической эквивалентности, что обеспечивает максимально благоприятные условия для переноса электрона. В электроанализе монослойные покрытия интересны прежде всего при изготовлении биосенсоров. Однако эксплуатационные характеристики электродов с монослоями модификаторов уступают электродам, модифицированным другими способами, а использование дополнительных компонентов, компенсирующих недостатки таких электродов (низкая механическая устойчивость, высокая чувствительность к условиям эксплуатации, влияние сорбционно активных компонентов матрицы), сказывается на упорядоченности и энергетической эквивалентности монослойных покрытий.

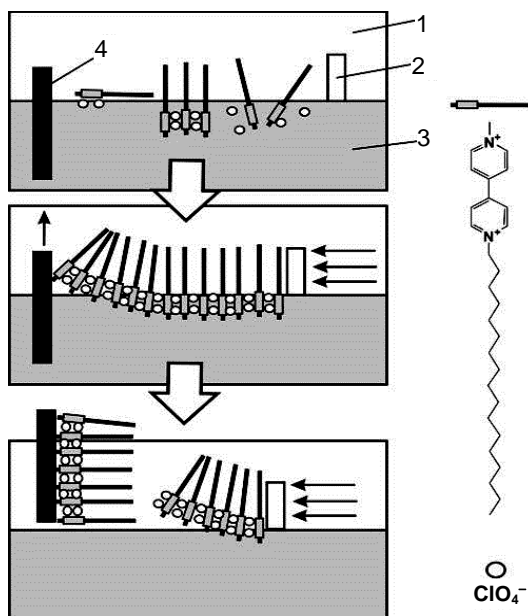
Получение строго монослойных покрытий – технически достаточно сложная задача, поскольку наличие дефектов или примесей на подстилающей поверхности провоцирует образование полислойных покрытий нерегулярного строения и ведет к появлению на поверхности электрода незаполненных участков – разрывов монослоя. Помимо жестких требований к химической чистоте и качеству механической обработки поверхности электрода, монослойные покрытия требуют специальных приемов формирования.

К ним относятся получение модификатора *in situ* и использование самоорганизующихся слоев.

Получение модификаторов *in situ* предполагает химическую или электрохимическую реакцию, приводящую к образованию адсорбционно активной формы модификатора. Поскольку скорость образования и стационарная концентрация модификатора при этом весьма незначительны, создаются условия достижения термодинамически наиболее предпочтительного монослойного заполнения поверхности. Самый простой и распространенный вариант – изменение заряда модификатора. Так, анодное окисление полиароматических систем – порфиринов, фенотиазин, феноксазинов, бипиридилов – приводит к образованию органических катионов, прочно удерживаемых на поверхности электрода. Помимо электростатических взаимодействий с поверхностью ионы модификатора отталкиваются друг от друга, что способствует монослойному заполнению поверхности.

Для более прочного связывания модификаторов металлические электроды иногда окисляют. Этот прием позволяет выровнять поверхность (благодаря заполнению на ней дефектов образующимися оксидами), а также усилить электростатические взаимодействия с катионными субстратами. Преимуществом данного способа является еще и то, что адсорбированный положительно заряженный модификатор можно довольно просто удалить с поверхности электрода, восстанавливая катион до нейтральной частицы. Образование монослоя в результате предварительного окисления – довольно распространенный способ получения монослоев органических модификаторов. Неорганические соединения склонны к образованию солеобразных продуктов, кристаллизующихся на поверхности электрода, поэтому для них данный способ модифицирования малоэффективен.

Самоорганизация поверхностного слоя предполагает достаточно сильные межмолекулярные взаимодействия, обеспечивающие не только связывание молекул модификатора с поверхностью электрода, но и их определенную ориентацию относительно друг друга и относительно границы раздела электрод/раствор. Это характерно, как отмечалось, для жидкокристаллических структур. Другим примером образования организованных слоев являются пленки Ленгмюра–Блодже. Их формируют на границе раздела фаз (обычно вода/воздух) из растворов амфифильных соединений (детергентов), значительно различающихся по гидрофобности. Схематически процесс получения пленки Ленгмюра–Блодже приведен на рис. 1.11. В водном растворе молекулы поверхностно-активного вещества – производного метилвиологена – распределяются хаотически по поверхности водной фазы. Сокращение ее площади с помощью специального подвижного барьера, выполненного из гидрофобного материала (политетрафторэтилена), приводит к увели-



**Рис. 1.11.** Схема образования пленки Ленгмюра–Блодже  
1 – воздух; 2 – подвижный барьер; 3 – вода; 4 – электрод

чению плотности заполнения границы раздела фаз вплоть до формирования мономолекулярной пленки, в которой молекулы ПАВ ориентированы ортогонально к границе раздела вода/воздух. Если теперь электрод медленно вытягивать из раствора, монослой толщиной порядка 3–4 нм удержится на поверхности электрода, так что полярные (заряженные) «хвосты» молекул будут контактировать с электродом, а неполярные (гидрофобные радикалы) обращены к воздушной среде. Взаимная ориентация алкильных радикалов определяется гидрофобными взаимодействиями, минимизирующими общую площадь поверхности пленки.

Аналогичным образом получают многослойные пленки Ленгмюра–Блодже. Так, молекулы стеарата кадмия на границе раздела воздух/вода ориентируются таким образом, что гидрофильные концевые группы располагаются на поверхности воды, а гидрофобные углеводородные цепочки вытягиваются над ней почти под прямым углом. Повторяя процедуру, можно получить полислойные покрытия с противоположной ориентацией молекул каждого слоя. Каждый последующий слой стеарата кадмия ориентируется к предыдущему под углом  $180^\circ$  так, что в соседних слоях молекулы располагаются по принципу «голова к хвосту». Подобные двуслойные мембраны называют также липидными бислоями, так как они

достаточно близки по строению к клеточным биологическим мембранам, в которых роль амфифильной основы играют липиды.

Пленки Ленгмюра–Блодже могут быть основой более сложных поверхностных структур, поскольку легко включают гидрофобные соединения, удерживаемые в пределах слоя за счет взаимодействия с неполярными фрагментами. Этим пользуются при иммобилизации биологических компонентов, включая белки, микроорганизмы и нуклеиновые кислоты. Аналогичным способом можно включать в состав пленок электрохимически активные компоненты. Например, смеси производных тетрацианохинодиметана и тетратиофульвалена с длинными алкильными радикалами в результате самосборки формируют поверхностные структуры, включающие указанные соединения, образующие органические соли и участвующие в трансмембранном переносе электрона. Таким же способом в пленки включают тиофен, ферроцен, некоторые другие медиаторы электронного переноса.

Моно- и полислойные пленки Ленгмюра–Блодже рассматривают в качестве простейших моделей биологических мембран при изучении процессов транспорта молекул, регуляции мембранных белков и лизиса. На практике применение пленок Ленгмюра–Блодже в электроанализе ограничено их низкой механической прочностью. По своим реологическим характеристикам пленки напоминают растительное масло. Даже будучи нанесенными на инертный носитель (так называемые импрегнированные пленки Ленгмюра–Блодже), они чувствительны к механическим воздействиям. По той же причине время жизни таких пленок невелико.

### **1.2.2. Иммобилизация модификатора с образованием ковалентных связей**

*Ковалентная иммобилизация* («пришивка») предполагает образование одной или нескольких ковалентных связей между функциональными группами материала электрода и модификатора. В отличие от рассмотренных выше вариантов адсорбции ковалентная иммобилизация необратима. Это расширяет спектр условий, при которых сохраняется стабильный сигнал электрода. В значительной степени увеличивается и срок службы последнего. Существует несколько подходов к ковалентному модифицированию; каждый имеет свои достоинства и ограничения:

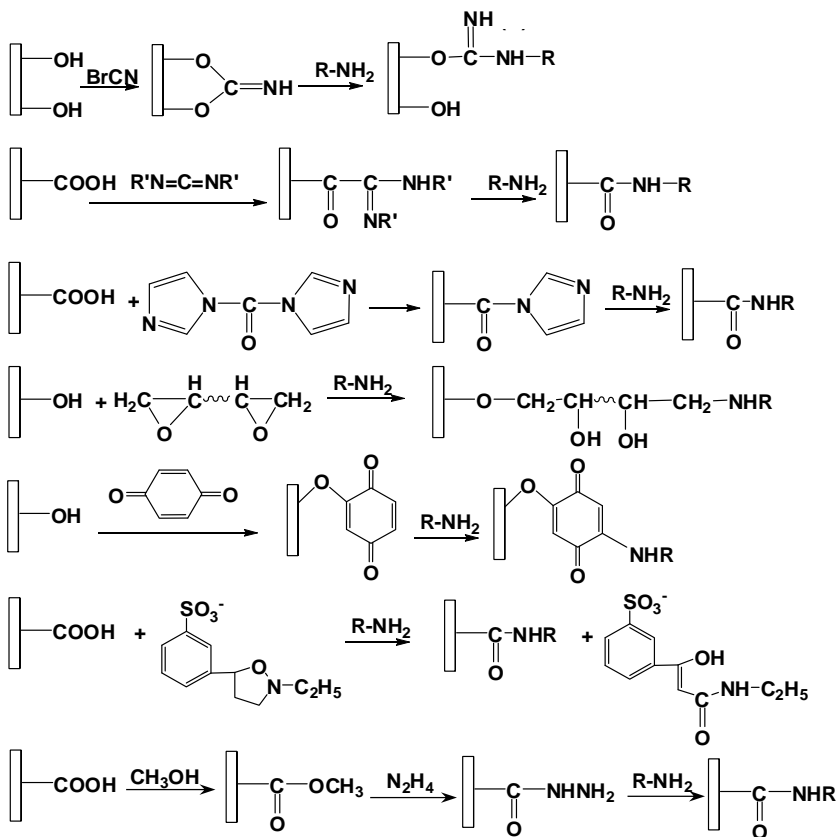
- предварительное химическое модифицирование электрода с целью создания активных функциональных групп, реагирующих с модификатором;
- ковалентная пришивка модификатора к инертным материалам (носителям), далее включаемым в состав электродного вещества или поверхностной пленки;

- использование самоорганизующихся слоев как матриц для ковалентной пришивки реагентов.

Прямая «пришивка» модификатора к электроду реализуется прежде всего для углеродных материалов и золота. Окисление углеродных материалов приводит к образованию значительного числа кислородсодержащих групп – гидроксидных, карбоксильных, фенольных, которые затем достаточно легко вступают в реакции ковалентной пришивки. Наиболее легко окисляются графитовые электроды и УПЭ, труднее всего – пирографитовые и допированные бором алмазные. Последние вообще для ковалентной иммобилизации не используются, поскольку окисление нивелирует допирующий эффект атомов бора. Условия окисления и состав окислителей в значительной степени определяют реакционную способность образующихся функциональных групп. Чаще всего окисление проводят, нагревая электроды в воздухе или кислороде либо обрабатывая их горячими растворами окислителей – азотной кислотой, смесью серной и азотной кислот, «хромпиком». Помимо окисления в поверхностном слое могут протекать и другие реакции с участием окислителей – образование сложных эфиров, дегидратация, осаждение нерастворимых продуктов восстановления окислителей. Слишком активное окисление нежелательно, поскольку электроды начинают разрушаться, в них образуются трещины и структурные дефекты, что препятствует получению воспроизводимых результатов ковалентного модифицирования. Для графитовых паст окисление протекает уже при механическом трении, сопровождающем шлифовку рабочей поверхности.

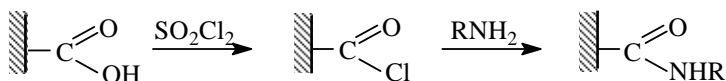
Инертные материалы обрабатывают окислителями совместно с воздействием ультразвука или при повышенных температурах. Окисление сопровождает и процессы обработки электродов аргоновой плазмой. При этом резко увеличиваются пористость поверхностного слоя и сорбционная емкость, что улучшает характеристики последующего ковалентного и нековалентного модифицирования. Обработку плазмой проводят в вакууме при низких парциальных давлениях кислорода. Аргоновая плазма позволяет также внедрять в поверхностный слой упрочняющие компоненты, например нитриды кремния и титана.

После обработки электродной поверхности электрод функционализируют, изменяя природу образующихся при окислении активных групп. Выбор способа функционализации зависит от природы модификатора и требований, предъявляемых к продукту ковалентной пришивки (доступность для взаимодействия с определяемым веществом, химическая устойчивость и др.). Чаще всего для функционализации используют amino- и амидогруппы, а также ангидриды кислот. Так, под действием  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  карбоксильные группы превращаются в хлорформильные, которые и взаимодейст-



**Рис. 1.12.** Способы ковалентного модифицирования электродов

вуют с модификатором. В частности, для пришивки к поверхности углеродного электрода ароматических аминов применяют реакцию амидирования:

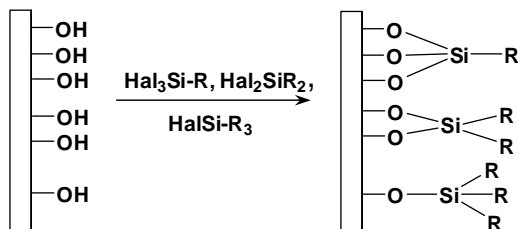


Гидроксигруппы на поверхности углеродного электрода могут реагировать с цианурхлоридом, хиноидные – с монозамещенными гидразинами, образуя гидразоны, или с аминами. Продукты функционализации, как правило, достаточно химически активны и должны использоваться сразу же после получения. Присоединение модификаторов может происходить непосредственно по функциональным группам на поверхности электрода или опосредованно. В последнем случае между электродом и модификатором включают

так называемые *линкеры* – достаточно длинные бифункциональные молекулы, пространственно разделяющие реагент-модификатор и электрод. Линкеры необходимы, если присутствие модификатора вблизи электродной поверхности нежелательно. Они позволяют снизить сопротивление переноса заряда в случае модифицирования электрода неэлектропроводящими и незаряженными компонентами, уменьшить диффузионное торможение переноса реагентов и определяемых веществ к электроду сквозь слой модификатора. Кроме того, сочетание нескольких линкеров различной длины позволяет повысить удельную концентрацию модификатора вблизи электрода. Некоторые из потенциальных реакций пришивки модификаторов к функционализированным углеродным материалам приведены на рис. 1.12.

Аналогичным образом для ковалентной пришивки могут использоваться сульфгидрильные группы, образующие с модификатором дисульфидные мостики или сложноэфирные связи. Применительно к биологическим объектам – компонентам биосенсоров – особенности ковалентного модифицирования рассмотрены в последующих разделах.

В случае металлических (металлоксидных) электродов поверхностные функциональные группы получают с помощью кремнийорганических соединений – хлор- или бромсиланов и силоксанов. Особенно широко этот метод применяется для модифицирования электродов из алюминия, никеля, олова и других металлов, образующих устойчивые оксидные пленки. Травление таких пленок кислотами или щелочами приводит к образованию на поверхности свободных гидроксидных групп, способных к реакциям этерификации с кремнийорганическими соединениями:



В табл. 1.2 приведены примеры функциональных групп, пришиваемых к металлическим электродам посредством обработки кремнийорганическими соединениями  $\text{RSiX}_3$  ( $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{OH}, \text{OAlk}$ ). Силилирование помогает защитить электроды, немодифицированные или модифицированные, от загрязнений, что особенно важно при анализе реальных объектов.

Состав образующихся продуктов силилирования зависит от удельной концентрации и расположения гидроксидных групп на поверхности электрода, а также от природы силилирующих аген-



**Таблица 1.2. Примеры функциональных групп (R), пришиваемых к электродам посредством силилирования**

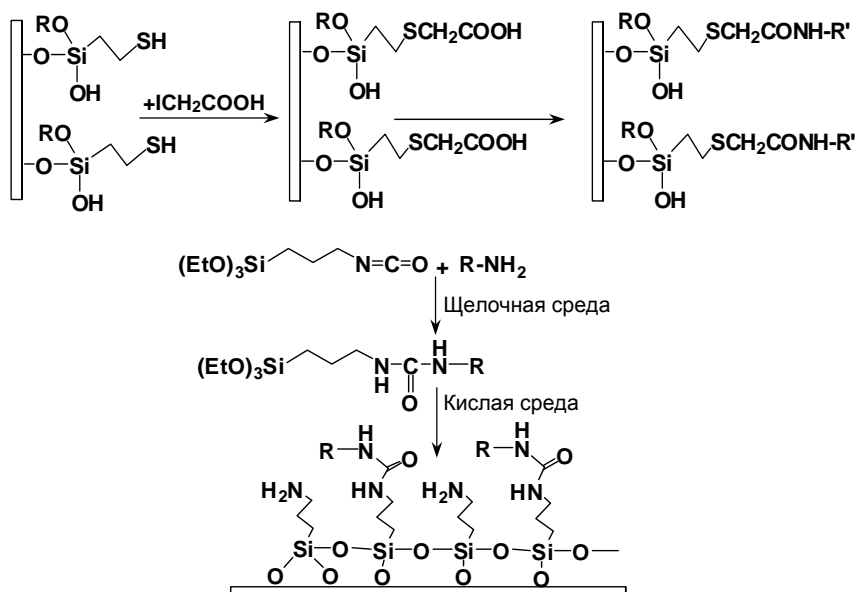
Функциональные группы (R)	
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PPh}_2$
$-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{PPh}_2$
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NBu}_3\text{Br}$
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PBu}_3\text{Br}$

тов. Все поверхностные ОН-группы функционализировать невозможно из-за стерических ограничений реакции. Поэтому после присоединения модификатора оставшиеся свободными гидроксидные группы блокируют гексаметилдисилазаном.

Реакции ди- и тригалогенсиланов осложняются процессами олигомеризации, идущими с образованием объемных органосиликатных гелей. Такие процессы используются для включения в состав гелей белков и ДНК, но в случае поверхностного модифицирования они нежелательны. По этой причине в реакциях силилирования чаще используются производные с одной уходящей группой, не способные к олигомеризации. Кроме того, вместо высокоактивных хлорсиланов применяются триалкоксиалкилсиланы – классические силилирующие реагенты для модифицирования стекол и алюмосиликатных сорбентов. Они менее активны и поэтому образуют преимущественно монослои на поверхности металлооксидных пленок. Примеры модифицирования электродов посредством силилирования приведены на рис. 1.13.

Аналогичным образом проводится ковалентная пришивка модификаторов к сорбентам, содержащим поверхностные гидроксидные группы. Это хроматографические сорбенты, высушенные гели хитозана, силикагели, диоксид титана и другие оксиды металлов. Модифицированные сорбенты либо вводят в состав пасты УПЭ, либо закрепляют на электродной поверхности в составе геля или полимерного носителя. Силилирование способствует гидрофобизации микроокружения модификатора, что стабилизирует неустойчивые при гидролизе молекулы, а также оказывает влияние на реакции с участием заряженных частиц.

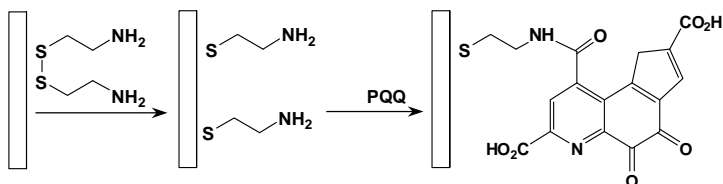
Для ковалентной пришивки модификаторов можно использовать самопроизвольные реакции образования меркаптидов между свободными тиольными и дисульфидными группами модификаторов и золотом или ртутью. При этом образуются связи  $\text{Au-S}$  и  $\text{Hg-S}$ , отличающиеся высокой прочностью и устойчивостью к гидролизу. Для осуществления реакций поверхность металла должна быть свободной от оксидов, а в растворе не должно быть растворенного кислорода, частично окисляющего тиольные группы и

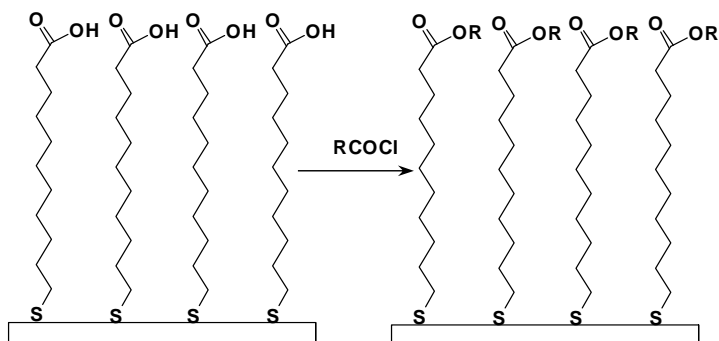


**Рис. 1.13.** Ковалентное модифицирование электродов посредством силилирующих реагентов

снижающего тем самым эффективность связывания. В условиях вольтамперометрии образование меркаптидов ртути сопровождается генерированием каталитических токов восстановления ионов водорода, что находит применение для высокочувствительного определения тиолов. В анодной области потенциалов меркаптиды ртути окисляются с образованием солей ртути, что делает данный способ модифицирования непригодным для генерирования анодного сигнала. Заметим, что меркаптиды золота широко применяются в современных амперометрических биосенсорах.

Образование меркаптидов металлов используется для присоединения к электроду разнообразных модификаторов, включая медиаторы электронного переноса, белки с поверхностными сульфгидрильными группами и тиолированные олигонуклеотиды. В качестве примера ниже приведена схема модифицирования электрода пирролохинолинихиноном PQQ – медиатором электронного переноса, входящим в состав некоторых оксидоредуктаз:





**Рис. 1.14.** Самоорганизующийся слой меркаптоундекановой кислоты на золотом электроде и его этерификация

Данный модификатор находит применение в ферментных сенсорах на основе пероксидазы и глюкозооксидазы. Он используется для снижения перенапряжения в некоторых окислительно-восстановительных реакциях с участием низкомолекулярных соединений – пероксида водорода, допамина, NADPH. Аналогичным образом к поверхности золотых электродов пришивают тиолированные производные ферроцена, фенотиазин, тетратиафульвалена, тиофена. В свою очередь, тиофен поверхностного слоя может участвовать в электрополимеризации, образуя электропроводящие покрытия, прочно связанные с поверхностью электрода.

Заметные успехи в формировании модифицирующих покрытий с помощью меркаптидных связей получены для так называемых самоорганизующихся монослоев (SAM – self assembled monolayers) на электродах, содержащих наночастицы золота. Самоорганизующиеся слои на золотых электродах отличаются от пленок Ленгмюра–Блодже тем, что в них амфифильные соединения содержат терминальные тиольные группы, с помощью которых плотноупакованные ортогональные слои ковалентно связываются с поверхностью золотого электрода. Длина углеводородного радикала, необходимая для обеспечения взаимной ориентации молекул за счет гидрофобных взаимодействий, составляет порядка 8–12 атомов углерода. Меняя природу второго заместителя, можно в широких пределах варьировать свойства получаемых покрытий. На рис. 1.14 приведена схема модифицирования самоорганизующегося на золотом электроде слоя меркаптоундекановой кислоты в реакции этерификации.

Меркаптоундекановую кислоту и меркаптоундеканол часто применяют для последующего ковалентного присоединения различных заместителей, образующих с компонентами самоорганизующегося слоя сложноэфирные или амидные связи. Возможно также применение бифункциональных сшивающих реагентов, напри-

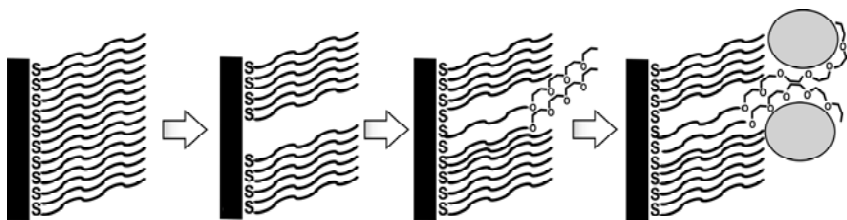
мер глутарового альдегида. Такой слой может служить основой для формирования полиионных комплексов, поскольку он способен координировать водорастворимые полимеры, несущие протонируемые или положительно заряженные фрагменты, например полиаллиламин, полиэтиленимин или поливинилпирролидон. В отсутствие заряженных фрагментов может происходить самоассоциация гидрофобных радикалов с образованием бислойных структур, аналогичных липидным бислоям. Поскольку один из слоев ковалентно связан с электродом, липидные бислои на золотых электродах более устойчивы к механическим воздействиям, чем другие синтетические аналоги биологических мембран.

И сам монослой, и полиэлектролитные комплексы на его основе могут включать гидрофобные и заряженные соединения. Первые, например полиароматические соединения, входят в локальную гидрофобную область вблизи электрода, вторые связываются с полярными концевыми группами, удаленными от электрода на расстояние, определяемое длиной углеводородного радикала. Важно, что во всех вариантах такого покрытия достигается высокая однородность состава и регулярность строения, обеспечиваемые точечным взаимодействием терминальных тиолов и плотной упаковкой гидрофобных частей амфифилов.

Успехи в изучении самоорганизующихся слоев на золоте в немалой степени стимулируются тем, что эта технология востребована в микроэлектронике. Отсюда широкие возможности для промышленного изготовления электродов, а также элементов субмикронного размера для них. Современные варианты фотолитографических процессов позволяют создавать пленочные элементы из микрокристаллического золота с линейными размерами порядка десятков нанометров. В сочетании с тиолированием такая технология позволяет достигнуть высокой плотности как молекул модификатора, так и отдельных элементов.

Самоорганизующиеся монослои на золоте допускают селективную пришивку модификаторов и на основе фотолитографического процесса. Для этого после нанесения самоорганизующегося слоя его покрывают фоторезистом и проводят отжиг отдельных участков, облучая электрод ультрафиолетом. При этом происходит фотохимическое окисление сульфидных мостиков и на открытых участках тиолированное покрытие удаляется, освобождая часть золотой поверхности для модифицирования другими реагентами. Это позволяет получать участки для пришивки конкретных соединений, что значительно повышает селективность процессов модифицирования и последующего распознавания. В качестве примера на рис. 1.15 схематически представлен способ мягкой иммобилизации белков в самоорганизующемся слое.

После удаления части монослоя в образовавшихся лакунах к электроду пришивают тиолированные линкеры с полиоксиэтилено-



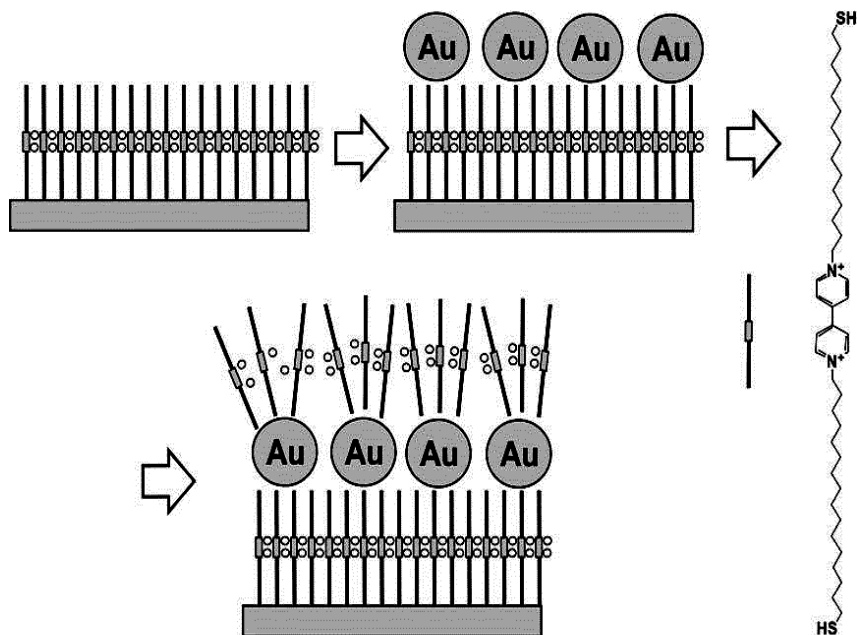
**Рис. 1.15.** Иммобилизация белков в самоорганизующемся слое

выми концевыми фрагментами, а они в свою очередь удерживают положительно заряженную глобулу белка. Варьируя длину линкера, размер и форму лакун, можно добиться различной глубины «погружения» модификатора в поверхностный слой, а значит, и селективности связывания не только объемных молекул белков, но и меньших по размерам молекул модификаторов.

Если для формирования самоорганизующегося монослоя использовать соединения с двумя тиольными группами, то можно последовательно наращивать слои, используя в качестве связующего дисульфидные мостики, образующиеся при контролируемом окислении свободных тиольных групп, и частицы коллоидного золота (рис. 1.16). При этом сначала получают монослой из дитиолов, который далее прочно связывает наночастицы золота с образованием меркаптидных связей. После этого закрепленные на поверхности электрода частицы золота взаимодействуют с тиолированными амфифилами, образуя новый упорядоченный слой. Процесс наращивания слоев можно повторять, последовательно меняя реагенты и получая таким образом строго упорядоченные структуры из кратного числа амфифильных слоев с золотыми «прослойками».

Поскольку из-за наноразмеров расстояние между частицами золота достаточно для электронного переноса, образующиеся слоистые структуры обладают свойствами полупроводников, характеристики которых зависят от числа слоев проводника и изолятора. Нанося пленку золота поверх последнего слоя наночастиц, можно сделать полупроводники и другие элементы наноэлектроники. Возможности миниатюризации таких наноэлементов теоретически ограничены только параметрами фотолитографического процесса получения исходных золотых матриц. В перспективе слоистые структуры самоорганизующихся слоев с различными модификаторами могут составить основу наносенсоров, имитирующих совершенные системы распознавания клеточных рецепторов и биохимических сигнальных систем, — природных инструментов, пока непревзойденных по селективности и чувствительности отклика.

Микрочастицы золота с мономолекулярным покрытием тиолированными амфифилами находят применение в качестве носителей белков, фоточувствительных молекул рецепторов и в инверси-



**Рис. 1.16.** Осаждение наночастиц золота на самоорганизующемся монослое дитиольных производных виологена

онных вариантах вольтамперометрии для усиления сигнала. В последнем случае содержание соединений, взаимодействующих с модификаторами на поверхности наночастиц золота, измеряется по току анодного растворения золота после осаждения наночастиц на специально подготовленных электродах. Поскольку каждой молекуле определяемого соединения соответствуют десятки и сотни тысяч атомов золота, формирующих наночастицу, чувствительность определений очень высокая – до  $10^{-18}$ – $10^{-15}$  моль/л.\* Главное ограничение метода – недостаточная селективность взаимодействия модификаторов с определяемыми соединениями и как следствие большие значения фонового сигнала. Сочетание высокой плотности ковалентно пришитых модификаторов и высокой электропроводности наночастиц золота способствовало появлению гибридных методов модифицирования электродов, в которых сначала реагент пришивают к частицам коллоидного золота посредством меркаптидных связей, а затем сами частицы включают в состав полярных и неполярных носителей – полимерных мембран, неорганических и органических гелей на основе органосиликатов или

\*Castañeda M. T., Alegret S., Merkoçi A. *Electroanalysis*, 2007, vol. 19, p. 743.  
Liao K.-T., Huang H.-J. *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 538, p. 159.

производных целлюлозы. Помимо высокой электропроводности подобные системы выгодно отличаются от гомогенных аналогов большей доступностью модификатора, его химической устойчивостью и механической прочностью в составе поверхностного слоя.

### 1.2.3. Включение модификатора в полимерную пленку

Как известно, многие характеристики модифицированных электродов связаны с процессами переноса вещества к поверхности преобразователя сигнала и реакциями, протекающими на границе электрод/раствор. От стабильности и воспроизводимости характеристик электродной поверхности во многом зависят метрологические и аналитические характеристики электродов. Полимерные материалы в составе электродов решают, по крайней мере частично, следующие задачи:

- механическую изоляцию рабочей поверхности электрода от воздействия электролитов, включая анализируемый раствор;
- контроль стадий массопереноса реагирующих веществ и вспомогательных реагентов из раствора к преобразователю сигнала, включая дискриминацию переносимых частиц по заряду, полярности, размеру и другим характеристикам;
- механическое удерживание на электроде модифицирующих реагентов – медиаторов электронного переноса, катализаторов, биологических компонентов;
- генерирование аналитического сигнала;
- механическую защиту модифицирующих слоев от повреждения в процессе хранения и эксплуатации электрода.

Вероятно, первоначально использование полимерных материалов в конструкции электродов было связано с решением задач изоляции электрода от действия электролита. Прямой контакт токоъемника с растворами солей, кислот или щелочей, растворенным кислородом не только способствует ускоренной коррозии контактов, но приводит к появлению артефактов на вольт-амперных кривых – токов растворения вещества электрода, каталитического восстановления кислорода, выделения водорода и т. д. Эти процессы усугубляются вторичными реакциями взаимодействия продуктов электрохимической коррозии и определяемых соединений, сопровождаются искажением формы вольт-амперных кривых из-за коррозии в области контакта проводников первого и второго рода. Еще больше влияние замыкания токоъемников вне области модифицирования электрода, когда превалирующими процессами, определяющими его сигнал, становятся электродные реакции, не связанные с составом анализируемого раствора. Аналогичные проблемы известны в микроэлектронике в связи с необходимостью механической и электрохимической защиты токопроводящих

участков печатных плат. Их решают путем использования специальных капсулирующих составов на основе термостойких и хемотстойких лаков и красок, эпоксидных смол и других непроводящих материалов. В настоящее время задачи капсулирования решаются на этапе промышленного изготовления электродов и представляют сложность тогда, когда речь идет о нестандартных решениях при миниатюризации и комплексной автоматизации системы измерения (микрофлюидные устройства, микрочипы).

Классификация полимерных материалов по тем задачам, которые они позволяют решить при использовании в конструкции электродов, в определенном смысле условна, поскольку один и тот же материал может обеспечить в разной степени решение не одной, а сразу нескольких задач. Наиболее очевидно влияние полимеров на процессы массопереноса; любой дополнительный слой на поверхности преобразователя сигнала снижает скорость диффузии и миграции реагентов к электроду. С этим нежелательным эффектом приходится мириться для достижения других целей – получить сигнал-отклик или увеличить его селективность. В некоторых случаях диффузионный барьер создается специально, поскольку позволяет разделить частицы по их заряду, гидрофобности и другим параметрам, т. е. обеспечить селективность измерения.

Достаточно сложно классифицировать полимерные материалы, содержащие в своем составе низкомолекулярные модифицирующие частицы. С одной стороны, такие материалы могут выполнять роль инертных носителей и изотропных матриц (ПВХ, гидрогели на основе полисилоксанов, фосфазенов). С другой стороны, если модификатор ковалентно пришит к носителю, полимерный материал «работает» как генератор сигнала (замещенные поливинилпиридины, пирролидоны, полипиррол и полианилин). В качестве основной указывают ту функцию полимера, которая обеспечивает свойства электрода, не достижимые (или недостаточные) в его отсутствие. Например, контроль массопереноса важен только в тех случаях, когда полимерный материал призван обеспечить селективность этого процесса в отношении определяемого и мешающих веществ. Механическое удерживание также характерно для полимерных материалов, как и задачи механической защиты, которые актуальны для имплантируемых медицинских сенсоров, подверженных биообрастанию – самопроизвольному осаждению биологических компонентов на активной части электрода.

Полимерные материалы используются в различных формах. Это коммерческие пленки, выпускаемые промышленностью, другие материалы (гранулы, порошки, монолит), подвергаемые предварительной переработке или формованию прямо на преобразователе сигнала, полимеры, получаемые из мономерных смесей различного состава, дисперсные полимерные частицы, включаемые в материал электрода или распределяемые на его поверхности. Все



они характеризуются большим разнообразием состава и механических свойств. Помимо особенностей строения основными параметрами, определяющими свойства полимерных материалов и их влияние на характеристики электродов, являются средняя молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение, размер пор и свободный внутренний объем, а также связанные с ними газопроницаемость, электрическое сопротивление и смачиваемость.

**Накладные полимерные мембраны.** В настоящее время практически не выпускаются полимерные мембраны, которые были бы разработаны специально для модифицирования электродов. Обычно при изготовлении последних применяют материалы, созданные для электродиализа, обратного осмоса, ультрафильтрации, разделения газов и жидкостей в промышленных и лабораторных условиях и для мембранных технологий очистки. Полимерные мембраны широко применяются в медицинских приборах для низкотемпературной стерилизации, в устройствах для разделения и очистки биологических образцов, установках обессоливания и очистки воды, системах газоочистки. Исключение составляют газопроницаемые мембраны для топливных элементов и электрохимических сенсоров (определение кислорода с помощью оксиметров, аммиака, окисляющихся органических соединений). В них применяются диализные мембраны из гидрофобных материалов (полиэтилена, полипропилена, фторированных полимеров).

Основу большинства коммерческих мембран составляют поливинилхлорид, эфиры целлюлозы, полиэтилен и полипропилен, полиэфирные смолы, сополимеры полистирола и дивинилбензола, а также их сульфированные и аминированные производные. Реже используются природные материалы – коллаген, хитозан, целлюлоза и др. Промышленные мембраны производятся не только из органических полимеров, в их состав входят и другие вещества, призванные обеспечить требуемые механические и операционные характеристики – эластичность, механическую прочность, постоянство порового распределения и проницаемости, устойчивость на воздухе и в условиях эксплуатации. Это – неорганические наполнители, пластификаторы, стабилизаторы, промышленные антиоксиданты и т. п.

Мембраны классифицируют по числу слоев и однородности характеристик по объему (одно- и многослойные, изотропные и асимметричные), способу получения (с использованием золь-гель технологии, экструзии, реакций на границе раздела фаз, формование при испарении органического растворителя, путем вытягивания, из тканых или нетканых полимерных материалов и т. д.), по форме полимерных волокон и конфигурации пор.

По размеру пор полимерные мембраны подразделяются на микропористые (средний диаметр пор менее 2 нм), мезопористые (диаметр пор 2–50 нм) и макропористые (50–500 нм). Соответ-

ственно толщина мембран увеличивается от 8–35 мкм для нанопористых мембран до нескольких миллиметров для макропористых мембран. Помимо этого толщина мембран зависит от присутствия армирующих материалов, придающих им требуемые прочностные характеристики, особенно если мембраны предназначены для работы под давлением (обратный осмос, ультра- и микрофльтрация). Размер пор зависит также от условий получения полимера, в частности от температурного режима, наличия испаряющихся или газообразующих компонентов, вязкости полимеризационной смеси, а также от условий формования пленки – давления вытягивания, градиента температуры, однородности химического состава полимера, присутствия порообразующих компонентов и пластификаторов, добавляемых после завершения полимеризации. Кроме того, поры могут образовываться и после формования пленки. Например, в ядерных фильтрах мембранное полотно обрабатывают ускоренными ядрами тяжелых элементов с последующим химическим травлением. Процесс образования пор во многом определяет устойчивость характеристик мембран при эксплуатации.

Различают композитные, гибридные и смешанные материалы и мембраны на их основе. К первым относятся материалы, основу которых составляют мезопористые мембраны, на которые осаждают материалы, не имеющие собственной пористости (или имеющие нанопоры) и самостоятельно не образующие пленок с требуемыми характеристиками. В случае смешанных материалов каждый из компонентов может функционировать не только в виде единой мембраны, но и независимо. В зависимости от способа получения смешанные мембраны могут состоять из отдельных изотропных слоев (многослойные мембраны) или одного однородного асимметричного слоя. Под гибридными мембранными материалами понимают мембраны, содержащие органические и неорганические компоненты.

Следует учитывать, что коммерческие мембраны ориентированы прежде всего на решение задач по разделению компонентов. Это диктует определенные требования к их составу и строению. Такие мембраны должны иметь однородное распределение пор по размерам и форме, низкие адсорбционные и адгезионные характеристики, газопроницаемость. Кроме того, некоторые мембраны должны обеспечивать разделение компонентов смеси не только по размерам, но и по другим параметрам (заряд, полярность, природа функциональных групп). В отдельных случаях коммерческие мембраны несовместимы с электродами, поскольку из-за низкой проницаемости и высокой гидрофобности существенно возрастает омическое падение напряжения на границе электрод/раствор, затрудняющее измерение сигнала.

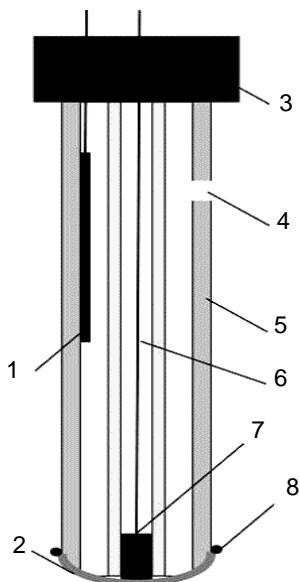
В своем большинстве коммерческие полимерные мембраны применяются в качестве покровных пленок, обеспечивающих ме-

ханическую защиту и удерживание низкомолекулярных компонентов на поверхности электрода. Варьирование состава и других характеристик мембран позволяет регулировать их гидрофильность (гидрофобность), кислотно-основные свойства и заряд, сочетать функции защиты и разделения реагентов, переносимых к электроду. Основным достоинством коммерческих мембран является высокая воспроизводимость их основных характеристик, достигаемая за счет жесткого контроля технологии производства. Кроме того, свойства таких мембран по отношению к некоторым биологическим реагентам в значительной мере стандартизованы, что ускоряет создание электродов и облегчает воспроизведение их характеристик.

К недостаткам покровных мембран следует отнести сложность их объемного модифицирования. В этом случае изменяются основные параметры мембран, что в значительной степени нивелирует их достоинства по воспроизводимости структурных параметров по сравнению с гранулированными материалами. Существует риск подтекания электролита в местах крепления, усиливающийся при закреплении мембраны самим пользователем. Недостаточно плотный контакт между мембраной и электродом может привести к увеличению диффузионного торможения переноса реагентов и даже к появлению пузырьков газа в процессе эксплуатации электрода. Кроме того, покровные мембраны плохо сочетаются с особенностями конструкции миниатюрных электродов и устройств, где требуется большая гибкость и эластичность поверхностного слоя, а геометрия поверхности может быть далека от планарной.

Наиболее широко коммерческие полимерные мембраны используются в устройствах для определения кислорода с помощью так называемого электрода Кларка. Последний представляет собой платиновый электрод, поверхность которого покрыта тонкой полупроницаемой мембраной (рис. 1.17). Растворенные молекулы кислорода диффундируют через мембрану и восстанавливаются на электроде, тогда как другие соединения, в первую очередь органические компоненты матрицы, удерживаются мембраной и на сигнал электрода не влияют. Регистрируемый катодный ток при определенных условиях пропорционален концентрации растворенного кислорода. Такие электроды применяются в биологических исследованиях для контроля потребления кислорода живыми организмами (респираторные измерения), в оценке качества поверхностных и сточных вод (показатели самоочищения водоема, биохимического потребления кислорода), эффективности работы биологических очистных сооружений.

Кислородный электрод входит также в состав биосенсоров на основе оксидоредуктаз и микроорганизмов. В последнее время вместо платины в кислородных электродах используются менее дорогие материалы, модифицированные оксидами никеля или мар-



**Рис. 1.17.** Схема электрода Кларка для определения концентрации растворенного кислорода

1 – серебряный электрод, покрытый хлоридом серебра; 2 – полупроницаемая мембрана; 3 – крышка из эпоксидной смолы; 4 – отверстие для заполнения раствора 0,1 моль/л KCl; 5 – внешний корпус из плексигласа; 6 – токо-съемник; 7 – платиновый электрод; 8 – зажимное кольцо

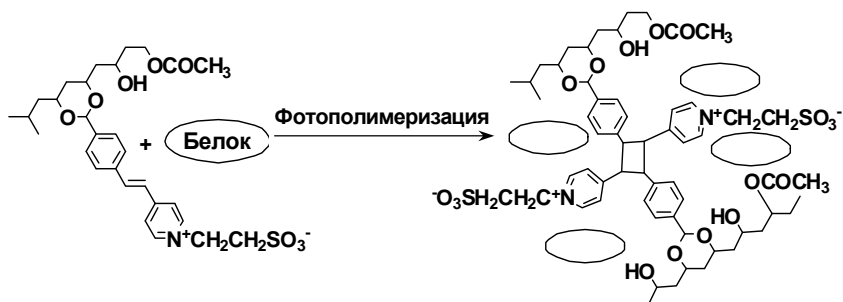
ганца, а вместо целлофана – полиэтилен или полипропилен низкого давления либо политетрафторэтилен. Аналогичные технические решения реализованы в электродах для определения других низкомолекулярных газов и гидрофобных соединений, например оксида азота в воде и биологических жидкостях. Существенным отличием этих соединений от кислорода является то, что они неустойчивы и их концентрация достаточно мала. Это повышает требования к диффузионной проницаемости полимерных мембран, что в свою очередь заставляет использовать сверхтонкие мембраны, получаемые другими способами – электрополимеризацией или осаждением на электроде из раствора полимера в летучем растворителе.

**Полимерные пленки.** В отличие от полимерных покровных мембран полимерные пленки получают непосредственно на электроде – чистом или модифицированном. Это позволяет в значительной степени избежать проблем, связанных с капсулированием и неплотным прилеганием, что характерно для покровных мембран. Такие пленки отличаются меньшей толщиной и механической прочностью, поскольку их формование происходит на твердой подложке, снижающей механические нагрузки и напряжения,

возникающие в полимере по мере увеличения его вязкости в процессе формования. Пористость полимерного покрытия, как правило, также уступает пористости коммерческих мембран, хотя данный недостаток частично компенсируется введением порообразующих добавок (циклодекстрины, крахмал), блокировкой поверхности электрода непроводящими гидрофобными или амфифильными полимерами либо созданием условий осаждения, способствующих порообразованию. Например, использование переменного напряжения позволяет воспроизводить на поверхности электрода процесс электропорации, хорошо известный в биофизике – образование пор в бислойных липидных мембранах и аналогичных им амфифильных синтетических мембранах. В большинстве случаев специальных мер по увеличению порообразования не требуется, поскольку проницаемость пленок можно контролировать, уменьшая или увеличивая их толщину в процессе формования. Лимитирующий фактор – сопротивление поверхностного слоя. В частности, такие полимеры как ПВХ, широко применяются для изготовления потенциометрических сенсоров, но практически не используются в качестве покровных мембран в амперометрических устройствах, поскольку не обеспечивают удовлетворительной электропроводности поверхностного слоя.

Существуют различные способы получения поверхностных полимерных пленок контролируемого состава и толщины. Их можно условно разделить на три группы. Первую образуют традиционные способы синтеза полимеров, такие как эмульсионная или блок-полимеризация. Реакцию проводят в растворе мономеров, используя электрод как матрицу для осаждения образующихся полимерных частиц. Процесс полимеризации инициируют введением дополнительных реактивов в реакционную смесь или с помощью соответствующих физических воздействий – УФ-облучения, ионизирующего излучения, ультразвука и др. Поскольку процесс протекает в объеме раствора, толщина и пористость покрытия определяются скоростью полимеризации, средним размером частиц и скоростью их осаждения на электроде. Эти параметры в определенных пределах регулируют, изменяя концентрацию и состав мономерной смеси, природу инициаторов полимеризации и время нахождения электрода в реакционной среде. Объемная полимеризация может сопровождаться захватом высоко- и низкомолекулярных соединений, вводимых в полимеризационную смесь. Например, таким образом проводят иммобилизацию ферментов с использованием гидрофильного полимера, образующего поперечные сшивки под действием УФ-облучения (рис. 1.18).

Помимо гидрофильно-гидрофобных взаимодействий захват низкомолекулярных компонентов возможен и за счет электростатических взаимодействий, если полимер или его отдельные структурные фрагменты заряжены. Такие полимерные материалы назы-



**Рис. 1.18.** Включение белков в гидрофильную поверхностную пленку под действием УФ-облучения

ваются допированными, а низкомолекулярные компоненты в их составе – *допантами*. Данный термин применяют, желая подчеркнуть значимость захваченного соединения для генерирования сигнала электрода или распознавания определяемого вещества. Компоненты, захват которых не влияет на характеристики электрода и является следствием способа получения покрытия, обычно обозначают термином «примесь».

Наиболее часто объемные методы полимеризации применяют для получения пленок сополимеров на основе акрилатов и поликарбонатов, отличающихся высокой сорбционной активностью. Таким же способом получают некоторые электрохимически активные полимеры – полианилин и полипиррол. Их полимеризацию проводят при низких температурах ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в отсутствие кислорода под действием УФ-облучения. Инициаторы полимеризации – персульфат и бихромат аммония,  $\text{FeCl}_3$ . По сравнению с методами электрополимеризации химические методы позволяют получить полимеры более регулярного строения с большей средней молекулярной массой. Недостаток – наличие в полимере примесей инициаторов, а также переменная толщина покрытия.

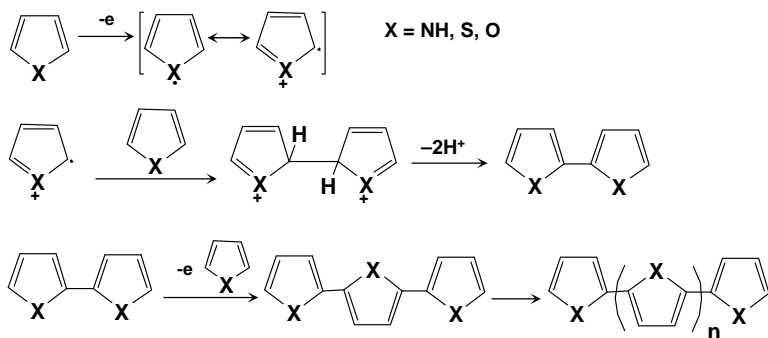
Вторая группа методов – нанесение полимеров, предварительно растворенных в органических растворителях (ТГФ, диоксан и др.) или эмульгированных в водно-органических смесях (например, нафийон в легких спиртах), на поверхность электрода. Выбор растворителя зависит не только от природы полимера, но и от тех добавок, которые предполагается включить в состав покрытия. Общее правило – соответствие гидрофильно-гидрофобного баланса полимера и растворителя. Иными словами, для гидрофобных добавок следует использовать неполярные растворители, для гидрофильных – полярные. В последнем случае при эксплуатации электрода неизбежны потери части модификатора, присутствие которого в полимерной пленке определяется исключительно стерическими ограничениями выноса модификатора из поверхностного слоя.

Технологически методы осаждения могут быть реализованы двумя способами. В первом случае на электрод наносят раствор полимера, который растекается по рабочей поверхности за счет действия гравитации и сил поверхностного натяжения и далее по мере испарения растворителя формируется пленка. Относительное постоянство толщины пленки самопроизвольно достигается лишь при малых размерах электродов. В промышленности для аналогичных целей применяют центробежные аппараты, так называемые спин-коутеры (spin-coater). Менее распространен второй вариант – замена растворителя. Для этого к раствору полимера в растворителе, смешивающемся с водой, добавляют воду для уменьшения растворимости полимера. В результате происходит медленное осаждение сверхтонкой пленки полимера на поверхности электрода. Таким же способом можно осадить заряженные полимеры, нейтрализуя их заряд, или за счет образования полиэлектролитных комплексов. Например, растворимость хитозана и его N-замещенных производных по-разному зависит от pH. Это позволяет не только контролировать осаждение биополимера, но и включать в него различные реагенты.

Высокая пористость образующегося полимерного покрытия, достигаемая за счет изменения природы растворителей, существенно отличающихся по температурам кипения, может быть использована для последующего модифицирования электрода неполярными компонентами, плохо удерживаемыми на поверхности металлооксидных слоев или графита. Пористые пленки могут включать большие количества модификаторов, удерживаемых в порах полимера.

Заметим, что при использовании физических способов осаждения получить строго однородную пленку полимера затруднительно. Силы поверхностного натяжения, а также гидрофильно-гидрофобные взаимодействия влияют на толщину покрытия при переходе от центра пленки к ее краям. Равномерное распределение полимера по поверхности электрода зависит от скорости испарения растворителя, наличия неровностей и дефектов структуры электродного материала, его взаимодействия с водой и электролитами, отличий в гидрофобно-гидрофильном балансе материала электрода и изолирующей оболочки, температурного градиента и ряда других факторов, контролировать которые достаточно сложно. То же относится к распределению низкомолекулярных добавок, растворенных в полимере. По этой причине физические способы осаждения полимеров на поверхности электрода применяются не столько для внесения в поверхностный слой модификаторов, сколько для механической защиты и гидрофобизации поверхности.

Третий способ получения тонких полимерных пленок непосредственно на электроде – электрополимеризация. В этом случае инициирование полимеризации осуществляется электрохимически



**Рис. 1.19.** Схема электрополимеризации гетероциклических соединений

за счет образования первичных катион-радикалов при высоких анодных потенциалах. В качестве примера на рис. 1.19 приведена схема электрополимеризации гетероциклических соединений.

Если образующееся полимерное покрытие электрохимически активно, то рост пленки продолжается и после полного покрытия поверхности электрода. В противном случае регистрируемые токи быстро уменьшаются до нуля. Такой эффект наблюдается при электрополимеризации диоксифенолов, некоторых ароматических аминов и др. Сверхтонкие непроводящие покрытия применяются для защиты модификаторов, предварительно нанесенных на электрод, либо для их ковалентной или физической иммобилизации поверх слоя полимера. Непроводящие электрополимеризованные покрытия сохраняют высокую емкость по отношению к удерживаемым соединениям и ограничивают доступ к электроду мешающих компонентов. Кроме того, они имеют более плотную структуру по сравнению с электропроводящими аналогами и могут удерживать на поверхности белки и нуклеотиды, включенные в состав других носителей или физически адсорбированные на электроде до электрополимеризации. Однако следует помнить, что многие электрополимеризованные покрытия подвержены деградации, например в щелочной среде, что сокращает срок службы электродов при их эксплуатации в агрессивных средах.

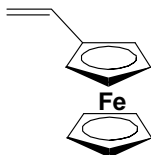
Методы электрополимеризации находят применение и при создании сенсоров и сенсорных устройств с неэлектрохимическими способами регистрации сигнала. Например, полимеризация пиррола или анилина на электродах ИТО или сверхтонких оптически прозрачных пленках золота используется при разработке электрохромных устройств и оптических сенсоров, электрополимеризация на золотых электродах в пьезокварцевых резонаторах – при создании масс-чувствительных сенсоров. Полипиррол применяют для иммобилизации олигонуклеотидов при разработке так называемых



ДНК-чипов. Для этого в состав мономеров вводят функциональные группы, к которым после полимеризации ковалентно пришивают олигонуклеотиды. Данная технология была применена при расшифровке генома человека.

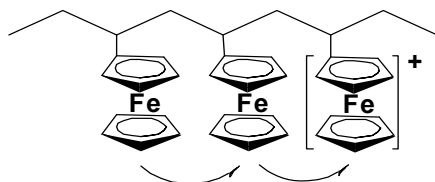
Рассмотрим более подробно методы нанесения и способы применения электрохимически активных полимеров, участвующих в переносе электрона между определяемыми соединениями и электродом – преобразователем сигнала.

**Электрохимически активные полимеры.** К данной группе полимерных модификаторов относятся два класса соединений – редокс-полимеры и электропроводящие полимеры (органические полупроводники). Примером полимеров первой группы является поливинилферроцен, получаемый полимеризацией соответствующих мономеров:



Редокс-полимеры не обладают электропроводностью в том смысле, что они не способны к переносу электрона по системе сопряженных  $\pi$ -связей. Электрохимически активные группы изолированы и фактически выполняют функции, аналогичные мономерным медиаторам электронного переноса, адсорбированным или ковалентно пришитым к электроду (ферроцен, металлопорфирины и др.). В некоторых случаях к данному классу полимеров относят также ионообменные материалы, содержащие в своем составе электрохимически активные противоионы, удерживаемые в поверхностном слое за счет электростатических взаимодействий.

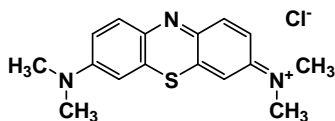
Для редокс-полимеров характерно регулярное расположение электрохимически активных групп, ковалентно связанных с основной цепью. Если инертные мостики в полимере достаточно малы, то появляется возможность для переноса электрона между соседними редокс-группами. Соответствующий механизм получил название «прыжкового»:



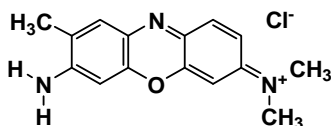
Изменение состава поверхностного слоя, в частности внедрение в полимер соединений, затрудняющих перенос электрона по

цепи из-за деформации пространственной структуры, снижает эффективность электрокатализа. Это можно использовать для определения электрохимически неактивных соединений, способных электростатически взаимодействовать с полимерным слоем электрода. Его электропроводность, а также параметры обмена электронов, электрокаталитическая и медиаторная активность зависят от удельной концентрации редокс-центров и их подвижности, т. е. от природы и строения линкеров.

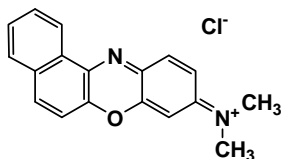
Другой пример редокс-полимеров – полимерные формы азиновых красителей (метиленовый синий, толуидиновый синий, мелдола синяя, нейтральный красный и др.):



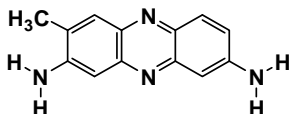
Метиленовый синий



Толуидиновый синий



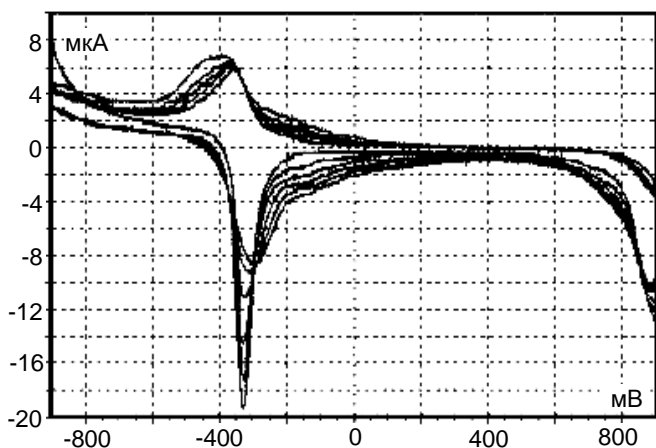
Мелдола синяя



Нейтральный красный

В них редокс-центры встроены в основную цепь полимера, причем делокализация  $\pi$ -электронов происходит предпочтительно в пределах фенотиазиновых фрагментов мономерных единиц. Основное отличие этой группы редокс-медиаторов от поливинилферроцена и других аналогичных полимеров – возможность получения при электрополимеризации. Это позволяет контролировать количество полимера, а значит, и концентрацию редокс-центров на поверхности электрода по величине тока или количеству перенесенного электричества. Процесс электрополимеризации можно проводить в потенциостатических условиях. Однако применительно к модифицированным электродам обычно используют многократное циклирование потенциала. Это обусловлено тем, что изменение степени окисления, а значит, и заряда поверхностного слоя при циклировании сопровождается переносом противоионов и молекул воды. В результате периодического изменения объема поверхностной пленки происходит уплотнение полимера, улучшаются его сцепление с электродом и, в конечном итоге, операционные и метрологические характеристики последнего.

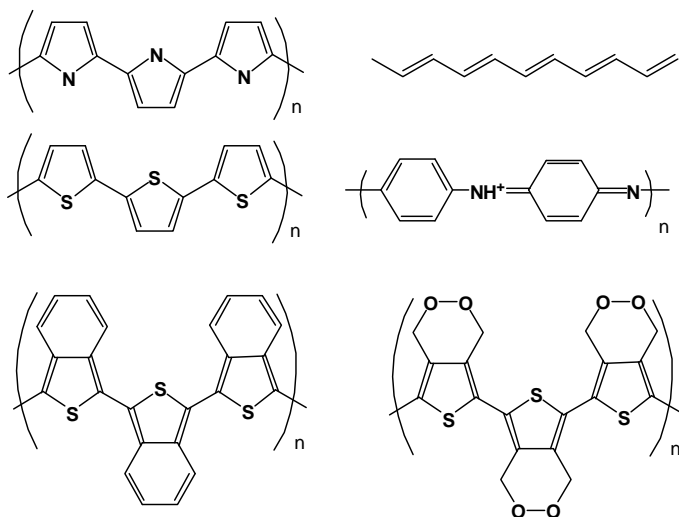
Циклирование потенциала в растворе мономерной формы азинового красителя сопровождается изменением формы сопряженных катодно-анодных пиков на вольтамперограммах. Как правило,



**Рис. 1.20.** Вольтамперограммы метиленового синего на стеклоуглеродном электроде (анодным токам соответствует отрицательная область шкалы)

при первом циклировании в области анодных потенциалов наблюдается первичный пик образования катион-радикала, инициирующего процесс полимеризации. При последующих циклах сканирования указанный пик частично или полностью исчезает, а в области потенциалов пика мономерной формы появляются одна или несколько дополнительных пар пиков окисления-восстановления полимера, высота которых изменяется по мере циклирования потенциала. Например, в случае метиленового синего происходит уширение пиков, смещение их в сторону больших потенциалов и одновременно снижение абсолютных значений токов (рис. 1.20), что связано с диффузионным торможением переноса мономера через растущую пленку полимера.

В зависимости от природы красителя электрохимические свойства модифицирующих полимерных слоев изменяются, но в любом случае пики на вольтамперограммах относятся как к полимеру, так и к мономеру, захватываемому в процессе электролиза в полимерную матрицу. Полностью удалить мономерные (олигомерные) формы достаточно сложно. Некоторая стабилизация сигнала достигается лишь при многократном циклировании электрода, покрытого полимерной пленкой, в буферном растворе в отсутствие мономера. Электроды, покрытые редокс-полимерами, получаемыми при электрополимеризации, находят применение в качестве медиаторов в процессах окисления-восстановления таких биологически важных соединений, как NADPH, допамин, аскорбиновая кислота, пероксид водорода.

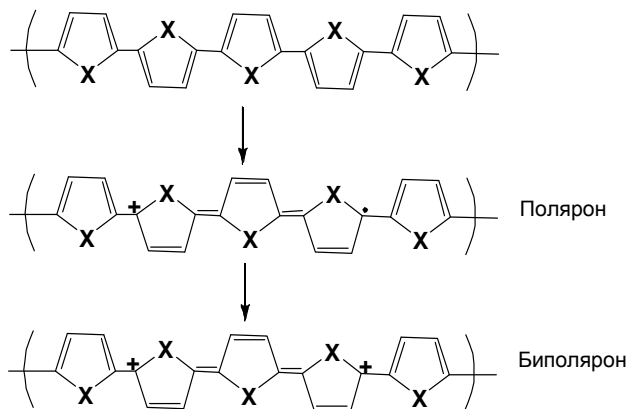


**Рис. 1.21.** Полимеры с электронной проводимостью

Примеры полимеров с электронной проводимостью приведены на рис. 1.21. Это полиацетилен – первый представитель данного класса, который практически не применяется для модифицирования электродов, а также более распространенные полианилин, полипиррол, политиофен и некоторые его производные.

Электропроводящие полимеры имеют в своей структуре систему сопряженных связей, причем в частично окисленном состоянии положительный заряд в значительной степени делокализован. Относительно свободный перенос электронов по делокализованной  $\pi$ -электронной системе обеспечивается наличием достаточного числа вакансий, обычно на гетероатомах гетероциклов. Такой процесс, строго говоря, представляет собой направленную миграцию положительного заряда по линейной цепи полимера. Помимо этого, за счет частичного диспропорционирования соседних окисленных и восстановленных мономерных звеньев может происходить образование катион-радикальных частиц и дикатионов. Такой вид проводимости называют *поляронной* и *биполаронной* соответственно. Для полипиррола схема переходов между соответствующими формами представлена на рис. 1.22.

В отличие от редокс-полимеров свойства электропроводящих полимеров изменяются в зависимости от того, в каком – проводящем или непроводящем – состоянии они находятся. По аналогии с диодами такие полимеры можно назвать *двухпозиционными*. В непроводящем состоянии они не заряжены и гидрофобны, а в проводящем – имеют положительный заряд и гидрофильны. Переход между проводящим и непроводящим состояниями происходит при

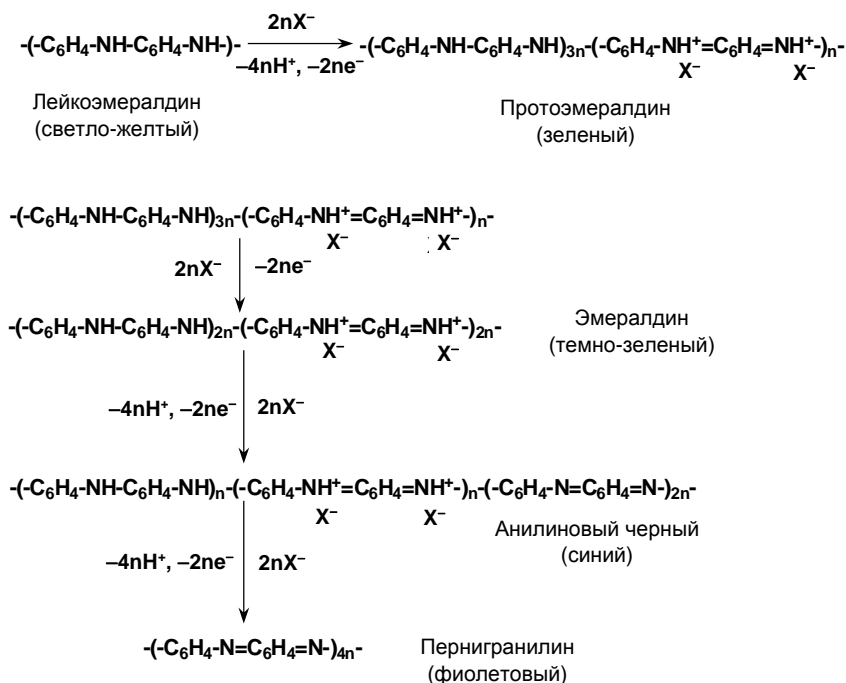


**Рис. 1.22.** Схема редокс-переходов в полипирроле

протекании окислительно-восстановительных реакций, обычно рН-зависимых, что позволяет использовать проводящие полимеры как основу для рН-чувствительных электродов, а также регистрировать процессы, протекающие на их поверхности с участием ионов водорода. Часть указанных процессов протекает с переносом отрицательных зарядов, другая – с переносом ионов водорода.

В качестве примера на рис. 1.23 приведены схемы сопряженных реакций с участием различных форм полианилина в зависимости от рН и редокс-потенциала среды. В зависимости от степени протонирования полимера и средней степени его окисления выделяют несколько форм полианилина – лейкоэмералдин, протоэмералдин, эмералдин, анилиновый черный и пернигранилин. Из них только солевая форма эмералдина проводит электрический ток и электрохимически активна. В реальных условиях электропроводящие полимерные покрытия полианилина имеют доменную структуру с чередованием восстановленных и окисленных участков – кластеров, образующихся при диспропорционировании соседних звеньев в уже сформировавшемся полимерном покрытии. Влиять на доменную структуру полимерного покрытия можно варьированием природы и состава мономеров (например, введением заряженных заместителей), изменением режима электролиза (потенциодинамический или потенциостатический) и способа введения модификатора.

Электропроводность полимеров с электронной проводимостью зависит от способа получения полимера. Химически синтезированные полианилин и полипиррол имеют более высокую электропроводность, чем электрополимеризованные, поскольку они менее загрязнены продуктами деградации и имеют более регулярное строение. В то же время в условиях электрополимеризации можно полу-



**Рис. 1.23.** Окислительно-восстановительные и кислотно-основные равновесия полианилина

чить очень тонкие пленки практически любой толщины и геометрии, а при добавлении полиэлектролитов и тщательном контроле условий электролиза электрохимические и реологические характеристики получаемых продуктов приближаются к соответствующим характеристикам химически синтезированных аналогов. Значения электропроводности некоторых полимеров данной группы приведены в табл. 1.3.

Если допирующие ионы электрополимеризованного анилина неподвижны (например, входят в состав полиэлектролита, как в нафине или ДНК), интервал pH, в котором полимер находится в допированном состоянии, расширяется, захватывая не только кислые (обычно до pH 3), но и нейтральные или даже слабощелочные среды. Это позволяет использовать полианилин в качестве медиатора электронного переноса или носителя низко- и высокомолекулярных модификаторов практически во всем интервале pH, необходимом для измерения сигнала-отклика. Аналогичный эффект достигается при использовании в качестве допанта сильных органических кислот, плохо растворимых в воде и удерживаемых в слое полианилина. Например, допирование полианилина камфоро-

Таблица 1.3. Электропроводность некоторых полимеров

Полимер	Максимальная электропроводность, См/см	Тип допирования
Полиацетилен	200–1000	p, n
Полипиррол	40–200	p
Политиофен	10–100	p
Полиизотионафталин	1–50	p
Полианилин	5	n, p

сульфоновой кислотой обеспечивает электропроводность полимера даже при pH 8.\*

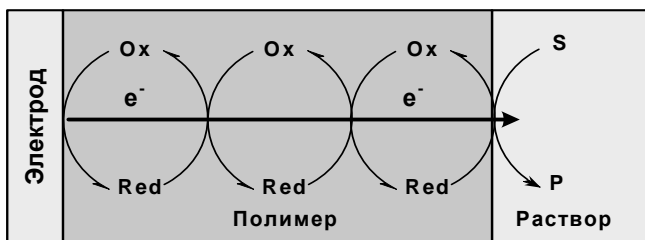
Природа допанта влияет также на содержание протонированных мономерных единиц, что сказывается на электропроводности полимера. Так, если в качестве допантов применять  $\text{HBF}_4$  или  $\text{HPF}_6$ , протонируется только 3 % пиррольных фрагментов полипиррола. В присутствии  $\text{CF}_3\text{COOH}$  их содержание возрастает до 30 %. Соответственно более чем на три порядка возрастает и электропроводность полимерного покрытия.

Для модифицирования электродов электрополимеризованные проводящие материалы применяются в следующих целях: как гетерогенные медиаторы электронного переноса, как изолирующие покрытия с регулируемыми характеристиками переноса заряда и проницаемости поверхностного слоя, как носители других модифицирующих добавок.

Наличие электроактивных центров в полимерных пленках обеспечивает эффективный перенос электронов в ходе электрохимических реакций. Этот процесс может осуществляться двумя путями: вследствие диффузии электрохимически активных частиц через поры и точечные отверстия внутри пленки (ионный перенос) и в результате обмена электронами между соседними парами редокс-центров (электронный перенос). В последнем случае кажущийся коэффициент диффузии деполяризатора зависит от концентрации вещества-переносчика электронов в пленке. При этом реализуется медиаторный механизм переноса заряда по толщине пленки в соответствии со схемой на рис. 1.24.

С увеличением толщины полимерного покрытия может наблюдаться неполное участие редокс-центров в переносе заряда. На перенос электронов влияет структура полимера, расположение электроактивных фрагментов в полимерной цепи, их окружение, подвижность противоионов, pH раствора. Свойства пленки зависят также от природы растворителя и фонового электролита. Наилуч-

\* Zhang L., Dong S. J. *Electroanal. Chem.*, 2004, vol. 568, p. 189.

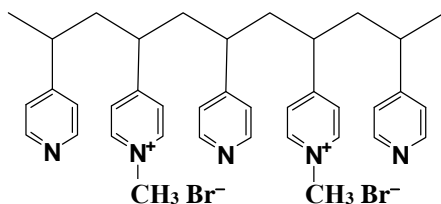


**Рис. 1.24.** Схема переноса электрона в пленке электрохимически активного полимера

шие свойства имеют пленки, нерастворимые в воде, но набухающие в ней. Однако сильно набухающие полимеры могут частично растворяться в воде. Чтобы этого не произошло, применяют перекрестное связывание молекул с помощью бифункциональных реагентов. При этом молекулы модификатора связываются и с полимером, и с поверхностью электрода, и друг с другом.

**Ионообменные полимеры** содержат функциональные группы, способные связывать ионы по ионообменному механизму. Типичные примеры таких полимеров – нафийон, поливинилпиридин, полистиролсульфонат, поливинилсульфонат. В частности, нафийон относится к катионообменным полимерам и имеет двухфазную структуру; одна фаза представляет собой гидрофильные ионные кластеры, состоящие из сульфогрупп, противоионов и гидратированной воды, а вторая – гидрофобный скелет, состоящий из фторуглеродных и эфирных цепей. Перенос заряда осуществляется за счет переноса катионов с одной сульфогруппы на другую. Это позволяет использовать пленки нафийона как ион-селективные мембраны, способные пропускать одни ионы и задерживать другие.

Другой представитель ионообменных полимеров – поливинилпиридин – состоит из углеводородных цепей с функциональными пиридиновыми группами, способными электростатически или координационно связывать анионы. Электропроводность поливинилпиридина обусловлена переносом анионов, поэтому его относят к группе анионообменников. Применяют также частично замещенный поливинилпиридин, в котором до 40 % мономерных фрагментов содержат N-метилпиридиниевые заместители:





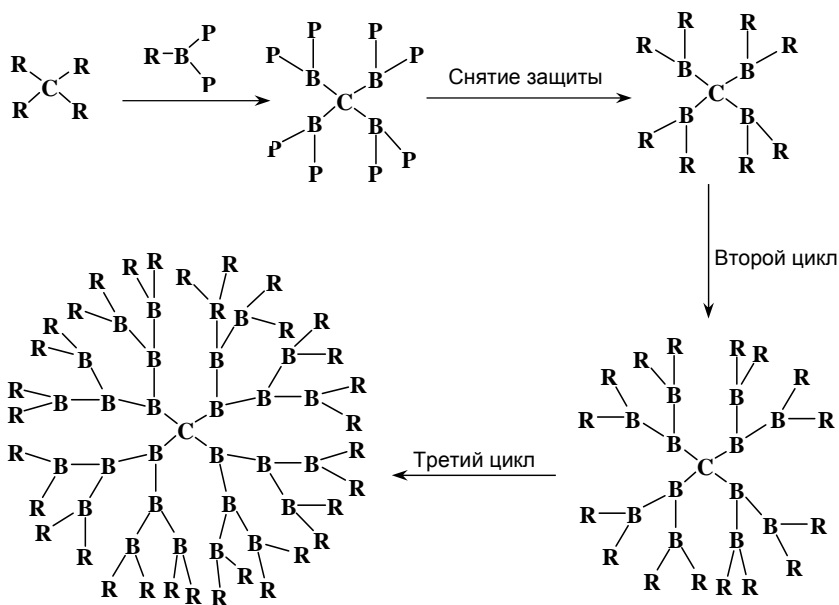
В отличие от исходного поливинилпиридина заряд такого полимера меньше зависит от pH и буферных характеристик раствора, что позволяет использовать его для электростатической адсорбции белков и нуклеиновых кислот, а также для работы в неводных и водно-органических смесях.

Пленки из ионообменных полимеров осаждают на поверхности электрода чаще всего за счет адсорбции, используя метод погружения электрода в раствор полимера или испарения растворителя из нанесенной на поверхность электрода капли раствора полимера. Таким же образом получают смешанные покрытия, в которых один слой представляет собой электрополимеризованный поликатион (полианилин, политиофен, полипиррол), а второй – синтетический полианион (нафион, полистиролсульфонат, поливинилсульфонат). Многослойные покрытия отличаются повышенной емкостью в отношении заряженных молекул. Они создают также электростатический барьер, ограничивающий доступ к электроду мешающих ионов, таких как мочева и аскорбиновая кислота или билирубин.

Удерживание модификатора в пленке ионообменных материалов эффективно только для заряженных соединений. Преимущественно это комплексы переходных металлов, осуществляющие функции переноса электрона, либо сами металлы, прочно связывающиеся с функциональными группами полимера, выполняющего роль полидентатного лиганда. Такие связи образуются также за счет донорно-акцепторных взаимодействий с неподеленными электронными парами гетероатомов заместителей. Например,  $\text{Ru}^{3+}$  образует комплексы с поливинилпиридином за счет образования координационных связей  $\text{N} \rightarrow \text{Ru}^{3+}$ . Примером электростатических взаимодействий в ионообменных полимерах может служить иммобилизация многозарядных ионов  $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]^{2+}$ ,  $[\text{Co}(\text{dipy})_3]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ,  $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (dipy – дипиридил) и др.

Если соли металлов, удерживаемые в составе полимеров, химически или электрохимически восстановить, можно получить композитные покрытия с мелкодисперсными частицами металлов, демонстрирующие высокие электрокаталитические и медиаторные свойства. В качестве матриц дисперсных металлов используются и электропроводящие полимеры. В этом случае полимеризацию проводят в присутствии водорастворимых солей металлов или их комплексных соединений.

Получены композитные полимерные пленки из нафиона, поливинилпиридина, полианилина, содержащие частицы золота, платины, палладия и родия. При осаждении металлов в полимерных матрицах изменение их электрокаталитических свойств происходит не только за счет увеличения степени дисперсности, но в большей степени за счет промотирующего действия матрицы. В частности, уменьшение размера частиц Pt и Pd при включении этих металлов в



**Рис. 1.25.** Схема синтеза дендримера с использованием дивергентного подхода

пленку полианилина сопровождается повышением их активности при окислении метанола, этиленгликоля, глицерина. Увеличение скорости окисления органических соединений достигается в основном за счет того, что полимерная пленка препятствует отравлению металлов каталитическими ядами. Прямая связь между размерами частиц металла и их эффективностью при электрокаталитическом окислении органических кислот и спиртов на высокоориентированном пирографите установлена для палладия с помощью атомно-силовой микроскопии.

В последнее время большой интерес исследователей привлекают новые типы полимерных молекул, значительно отличающихся по свойствам от традиционных линейных гомо- и сополимеров. Это так называемые *дендримеры* – сополимеры, состоящие из двух и более мономеров, которые входят в состав сверхразветвленных полимерных молекул. Дендримеры интенсивно изучаются с начала 1990-х годов. Их получают на основе *дивергентного* подхода или *конвергентного* роста. По первому способу (дивергентный подход) синтез дендримера начинают от центрального ядра с последовательным наращиванием числа мономеров. При этом быстро увеличивается число концевых функциональных групп, называемых точками роста (рис. 1.25). По второму способу (конвергентный рост)

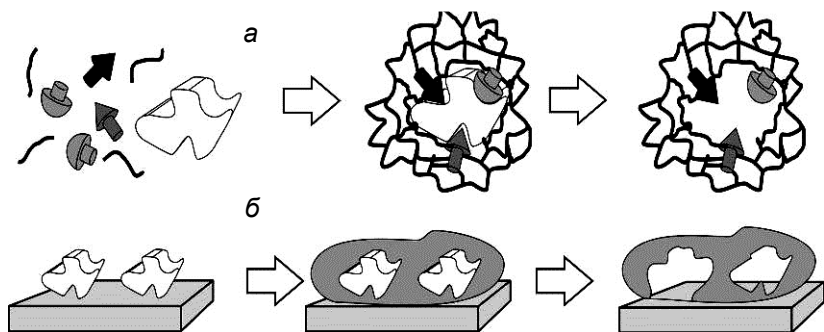
сначала получают высокоразветвленные молекулы с одной функциональной группой, которые присоединяют затем к полифункциональному ядру.

Синтезировано большое число дендримеров – полиамидов, отличающихся средней молекулярной массой и способом получения. В растворах дендримеры ведут себя как мицеллярные системы, способные включать в открытые полости, образуемые ветвями молекулы, гидрофобные низкомолекулярные вещества, что используется для транспорта последних в биологических системах. Они рекомендовали себя как эффективные стабилизаторы белков и нуклеиновых кислот. За счет многоточечного связывания дендримеры способны фиксировать конформацию белков в агрессивных и малополярных средах.

Поскольку технология получения дендримеров предполагает гомогенные условия реакции, обычно их получают методом эмульсионной полимеризации, а затем наносят на электрод из эмульсий или растворов в летучих органических растворителях. После этого электрод, покрытый пленкой дендримера, модифицируют низкомолекулярными модификаторами или биополимерами, прочно удерживаемыми на поверхности между ветвями полимерной молекулы. За счет достаточно больших размеров дендримерных молекул образующиеся пленки не создают заметного диффузионного торможения для ионов. Они позволяют также удерживать значительные количества воды и неорганических ионов при использовании электродов в водно-органических и неводных средах. Технология нанесения дендримеров на электродную поверхность совместима с другими методами поверхностной модификации – ковалентной прививкой модификаторов к поверхностным аминогруппам дендримеров, удерживанием наночастиц золота и других металлов и т. д.

**Полимеры с молекулярными отпечатками.** Для получения полимерных пленок, выполняющих роль специфических сорбентов, применяют технологию *molecular imprinting*. Эта технология появилась около 25 лет назад и основана на использовании молекул определяемого вещества в качестве шаблона-матрицы при формировании пленки в процессе полимеризации или поликонденсации (рис. 1.26). Определяемое вещество адсорбируется на твердом носителе или вносится в раствор специально подобранной смеси мономеров. В результате полимеризации образуются микропоры – полости, повторяющие конфигурацию молекул определяемых веществ в соответствии с их размерами и расположением функциональных групп. После этого молекулы шаблона разрушают химически или удаляют физически (вымывают) из полимера.

Полученный в результате молекулярного импринтинга полимер проявляет высокое сродство к молекулам вещества, использованного в качестве шаблона. Помимо экстракции и хроматографии



**Рис. 1.26.** Схема получения полимера с молекулярными отпечатками  
*а* – объемная модификация; *б* – поверхностная модификация

полимеры с молекулярными отпечатками находят применение для изготовления селективных электродов. Обычно их располагают на поверхности электрода или вводят в полимерные мембраны на основе поливинилхлорида, органических и неорганических гелей. В зависимости от состава такие слои могут либо повышать селективность и чувствительность определений молекул-шаблонов, либо маскировать компоненты, мешающие измерению сигнала.

На сегодняшний день различают два основных способа в технологии получения полимеров с молекулярными отпечатками, основанные на ковалентной и нековалентной модификации шаблона.

Ковалентную модификацию применяют для получения молекулярных отпечатков малоустойчивых органических молекул. Предварительно их подвергают дериватизации соединениями, способными к полимеризации (например, введением винильных или аллильных групп) либо амино- и тиольными группами для последующей кросс-сшивки глутаровым альдегидом или иным бифункциональным реагентом. После полимеризации молекулу-шаблон гидролизуют или окисляют, удаляя из полимерной матрицы. Таким способом получают, например, «отпечатки» сахаров и аминокислот. Ковалентную модификацию можно проводить и с участием собственных функциональных групп и ненасыщенных фрагментов молекулы-шаблона. При этом наблюдается частичный импринтинг, поскольку образующиеся поры отражают особенности строения не всей молекулы-шаблона, а только той ее части, которая не была затронута реакцией полимеризации.

При отсутствии в составе определяемого соединения активных функциональных групп либо в случае сложности его внедрения в полимерную матрицу из-за малой химической активности (полициклические ароматические углеводороды, органические растворители и др.) применяют методы физической нековалентной модификации. Ее осуществляют несколькими способами. При получении

полимеров, содержащих определяемые соединения по всему объему, последние добавляют в реакционную смесь, а после полимеризации удаляют из матрицы, вымывая подходящим органическим растворителем. В качестве полимерных матриц используются гели на основе акрилатов, полисилоксанов, продукты полимеризации винилсодержащих соединений (аллиламин, винилпиридин, полистирол). В мономеры можно вводить функциональные группы, обеспечивающие специфические взаимодействия с центрами связывания молекул шаблона.

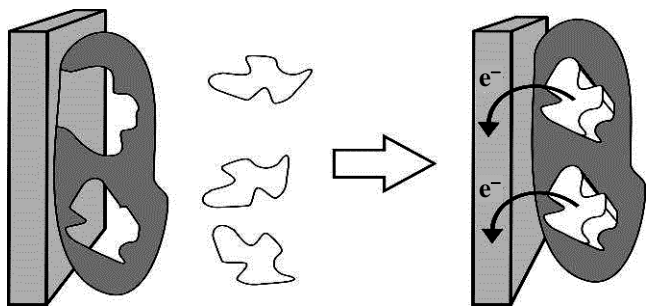
Обычно полимеризационная смесь содержит как минимум два вида мономеров. Это так называемые функциональные мономеры, специфически взаимодействующие с определяемым соединением, и линкеры. В состав полимеризационной смеси вводят также пластификаторы, органические растворители и порогены. Последние обеспечивают пористость образующегося монолита. В противном случае скорость диффузионного переноса определяемых соединений в объем полимера мала и распознавание будет протекать только на поверхности полимера. Емкость такого сорбента недостаточна для обнаружения эффекта молекулярного импринтинга. В некоторых случаях, например при получении полиуретанов, пористость продукта обеспечивается технологией поликонденсации. Иногда в качестве порогена служат органические растворители, удаляемые после полимеризации, и некоторые неорганические добавки, вымываемые из полимерной матрицы. При получении полимеров с отпечатками шаблонов большого объема – биополимеров, ферментов, внутриклеточных образований, микроорганизмов, вирусов – дополнительные порогены не нужны.

Подбор состава смеси для полимеризации, как и условия ее проведения, – предмет специальных исследований, проводимых, в том числе, методами компьютерного моделирования параметров взаимодействия определяемого соединения с функциональными группами мономеров. Наибольшее значение для качества образующегося полимера имеют температура полимеризации, природа растворителя и гидрофильно-гидрофобный баланс. Последний параметр имеет определяющее значение при определении малополярных органических соединений.

Следует заметить, что при включении полимеров с молекулярными отпечатками в состав электродов высокая гидрофобность пленки может помешать проникновению электрохимически активных компонентов к электроду, т. е. регистрации сигнала.

На рис. 1.27 приведены мономеры, наиболее часто применяемые для получения полимеров с молекулярными отпечатками. Как видно, они обеспечивают достаточно большое разнообразие углеродного скелета, кислотно-основных и донорно-акцепторных свойств, необходимых для распознавания молекул определяемого вещества.





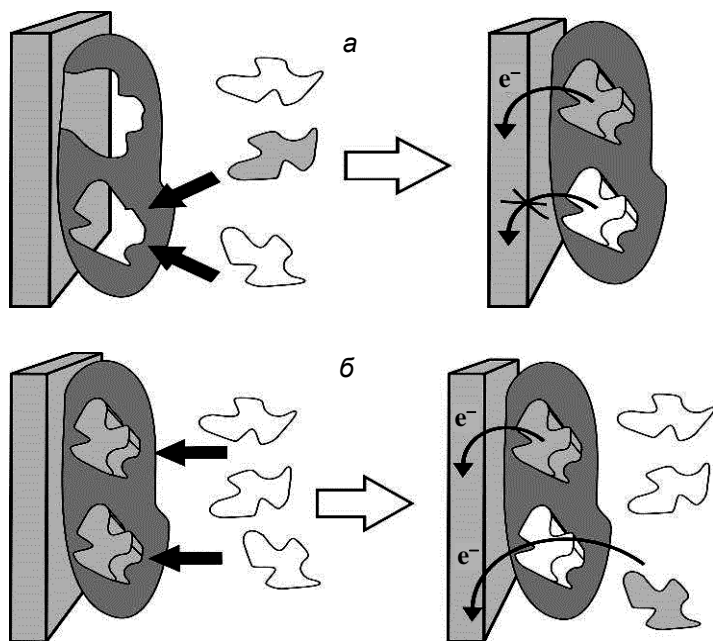
**Рис. 1.28.** Определение электрохимически активного вещества на электроде, модифицированном полимером с молекулярными отпечатками

Электроды, модифицированные полимерами с молекулярными отпечатками, можно разделить на две группы: электроды для прямого определения электрохимически активных веществ и электроды для определения электрохимически неактивных соединений с помощью маркеров, способных специфически взаимодействовать с полимерами с молекулярными отпечатками.

В первом случае сигнал-отклик измеряют после накопления определяемого соединения в поверхностном слое полимера (рис. 1.28). При этом стадии накопления и измерения сигнала могут проводиться в разных растворах. Замена раствора позволяет исключить влияние мешающих примесей или повысить подвижность молекул деполаризатора, включенных в поры полимера. В тех случаях, когда после стадии накопления электрохимическое превращение определяемого вещества невозможно из-за стерических эффектов, электрод переносят в раствор электрохимически неактивного соединения, обладающего большим сродством к полимеру. В результате конкурентного замещения накопленный на первой стадии компонент выделяется в раствор, где его определяют на том же электроде или с помощью другого электрода, в том числе модифицированного.

При определении электрохимически неактивных соединений используются маркеры, способные наряду с определяемыми соединениями реагировать с полимерами с молекулярными отпечатками. Различают конкурентную и заместительную схемы.

В случае конкурентной схемы электрохимически активный маркер добавляют в анализируемый раствор. При выдерживании электрода в таком растворе определяемое вещество и маркер конкурируют за центры связывания полимера. Регистрируемый сигнал (ток окисления или восстановления маркера) зависит от соотношения их концентраций и констант адсорбционного равновесия. Содержание электрохимически неактивного соединения определяют по току окисления (восстановления) маркера при его постоянной



**Рис. 1.29.** Конкурентная (а) и заместительная (б) схемы регистрации сигнала с использованием электрохимически активного маркера

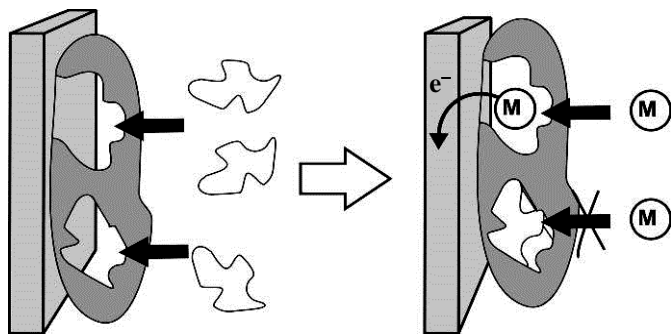
концентрации в серии измерений (рис. 1.29, а). Важно, чтобы маркер был структурно подобен определяемому веществу (шаблону) и реагировал с теми же центрами связывания полимера.

В заместительном способе электрод сначала выдерживают в растворе электрохимически активного маркера, после чего переносят в раствор определяемого неактивного соединения. В результате замещения часть молекул маркера высвобождается из поверхностного слоя. В зависимости от электрохимической активности свободной и связанной форм ток окисления (восстановления) маркера увеличивается или уменьшается (рис. 1.29, б).

Если выбор маркера с параметрами связывания, близкими к параметрам определяемого соединения, затруднителен, можно измерить снижение сигнала маркера, добавляемого в раствор после регистрации сигнала определяемого соединения. Заполнение пор сорбента увеличивает диффузионное торможение переноса маркера и снижает ток его окисления (восстановления) (рис. 1.30).

Разрабатывая способы модифицирования электродов полимерами с молекулярными отпечатками, полученными в условиях объемной полимеризации, следует учитывать, что многие из описанных в литературе полимеров создавались для решения задач хроматографического разделения и концентрирования соединений из





**Рис. 1.30.** Влияние диффузионной проницаемости полимера с молекулярными отпечатками на сигнал электрода

неводных и газовых сред в условиях ВЭЖХ и ГЖХ. При их использовании в водной среде эффективность разделения может резко снизиться. Это происходит из-за того, что в процессе формирования полимера в отсутствие воды электростатические взаимодействия практически не оказывают влияния. При этом молекулы воды не участвуют в образовании водородных и иных связей как с молекулами шаблона, так и с функциональными группами мономера. По этой причине предпочтение следует отдавать полимерам, синтезируемым *in situ* на поверхности электрода в реальных условиях.

Несмотря на то что молекулярный импринтинг находит пока ограниченное применение, данный способ модифицирования электродов, несомненно, имеет большое будущее. Разработаны электроды для определения теофиллина, кокаина, ряда аминокислот. Большое внимание аналитическому применению полимеров с молекулярными отпечатками уделяется в биосенсорике. В частности, данной проблеме посвящен раздел журнала *Biosensors and Bioelectronics*. Это обусловлено тем, что сама идея создания распознающего компонента электрода с участием определяемого соединения перекликается с системами иммуноанализа, в которых синтез антител происходит в ответ на поступление в организм чужеродного вещества – антигена. Не случайно полимеры с молекулярными отпечатками называют «искусственными антителами». Вторая причина популярности данного направления модифицирования заключается в том, что чем сложнее биологическая молекула, тем больше вариаций строения функциональных мономеров, используемых на стадии полимеризации, и тем больше вероятность достижения высокой селективности распознавания.

#### 1.2.4. Модифицирование неорганическими материалами

Наряду с органическими полимерами в качестве модификаторов применяются неорганические материалы, главным образом цеолиты

ты, глины, оксиды металлов, силикаты, фосфаты и др. Они в целом плохо проводят электрический ток и их иммобилизация на поверхности электрода или в составе электродного вещества УПЭ предполагает использование дополнительных электропроводящих компонентов. Помимо уже упоминавшихся электрохимически активных полимеров такую роль могут выполнять ионные жидкости, полиэлектролиты, дисперсные фазы металлов, соединения металлов переменной валентности. Они удерживаются на поверхности электрода за счет неспецифических электростатических или донорно-акцепторных взаимодействий. При этом неорганические материалы выполняют функции сорбентов, повышающих концентрацию модификатора или стабилизирующих его на поверхности электрода. Предложены следующие способы закрепления неорганических материалов на электродной поверхности:

- испарение растворителя из суспензии неорганического материала в растворе полимера;
- иммобилизация мелкодисперсных неорганических порошков в пленку полимера при его полимеризации;
- удерживание неорганических соединений в объеме гелей, включая осаждение коллоидных растворов;
- ковалентная пришивка неорганических материалов к поверхности электрода с помощью бифункциональных реагентов;
- поверхностное модифицирование нерастворимыми неорганическими соединениями и пленками;
- введение неорганических порошков в пасту угольно-пастового электрода.

Полимерные пленки, содержащие неорганические сорбенты (силикагели, алюмосиликаты, алюмофосфаты и др.), являются уже не двумерными, а трехмерными структурами. При этом появляется возможность избирательного концентрирования определяемых веществ на поверхности электрода в зависимости от сорбционных свойств модификатора и размера его пор. Так, применение в качестве модификаторов силикагелей (силасорбы, сферохромы, сепароны, цветохромы и др.) позволяет избирательно определять хлорфенолы в присутствии избытка фенола, а введение в пасту угольно-пастового электрода карбохрома обеспечивает селективное определение *o*-нитрофенола в присутствии *n*-нитрофенола.

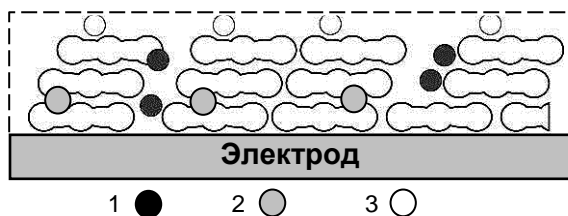
Природные алюмосиликаты (глины) представляют собой удобный объект для включения в состав различных ХМЭ, в том числе благодаря широкому разнообразию свойств. Различные глины отличаются между собой по заряду частиц, сорбционной активности, набухаемости, отношению к полярным органическим растворителям, что позволяет в широких пределах варьировать свойства УПЭ и композитных мембран на поверхности электрода, добиваясь требуемых параметров удельной концентрации модифика-

тора, его стабильности и активности в электрокаталитических и иных процессах.

Чаще всего для задач модифицирования применяют монтмориллониты общего состава  $[(Al_{2-x}Mg_x)Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)]$ , для которых характерны высокая сорбционная емкость (0,6–1 моль/г) и положительный заряд частиц. Аналогичные свойства имеют нонтронит  $[Fe_2^{3+}(Si_{4-x}Al_xO_{10})(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)]$ , вермикулит  $[Mg_3(Si_{4-x}Al_xO_{10})(OH)_2(Na_x^+, Ca_{x/2}^{2+}, nH_2O)]$  и лапонит – синтетический алюмосиликат состава  $[(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)]$ . Гидротальцит  $[Mg_6Al_2(OH)_{16}]CO_3 \cdot 4H_2O$  и его частично гидратированные производные имеют отрицательный заряд частиц.

Наибольшую ионообменную емкость (1,2–2 моль/г) имеет вермикулит, поэтому его чаще всего применяют в УПЭ для определения ионов металлов. Для этого электрод сначала выдерживают в анализируемом растворе, а затем регистрируют вольтамперограмму. Содержание металла определяют по току катодного восстановления ионов, количеству электричества либо анодному току растворения металла после его восстановления на электроде. Сорбционное концентрирование позволяет снизить предел обнаружения металлов в 100–1000 раз по сравнению с немодифицированными электродами той же площади. Помимо ионов металлов сорбционное концентрирование на глинах применяют для определения полярных органических соединений – уже упоминавшихся замещенных фенолов, допамина, мочевой кислоты, ряда лекарственных препаратов. Пределы обнаружения указанных соединений при предварительном концентрировании на глинах в составе угольно-пастового электрода и определении методами дифференциально-импульсной или квадратно-волновой вольтамперометрии достигают 0,1 мкмоль/л.

Чаще всего глины применяются для электрокаталитического определения окисляющихся соединений, а также в качестве матрицы для включения других модификаторов, включая биополимеры. Следует помнить, что далеко не все молекулы модификатора, включенные в глинистые составы, остаются активными. В зависимости от природы модификатора, способа его включения и типа каталитической реакции в ней участвует 10–20 % от общего количества модификатора. Одной из причин этого является стерическое ограничение доступа определяемых ионов и вспомогательных реагентов к иммобилизованному модификатору. Различают три основных способа сорбционного удерживания модификатора в матрице на основе глинистых материалов: адсорбция на поверхности, удерживание в мезопорах, каналах и краевых плоскостях, а также интеркалирование (включение в складчатые параллельные структуры, образуемые гексагонами силикатов и алюмосиликатов в глинах). Схематически распределение низкомолекулярных модификаторов в глинах представлено на рис. 1.31.



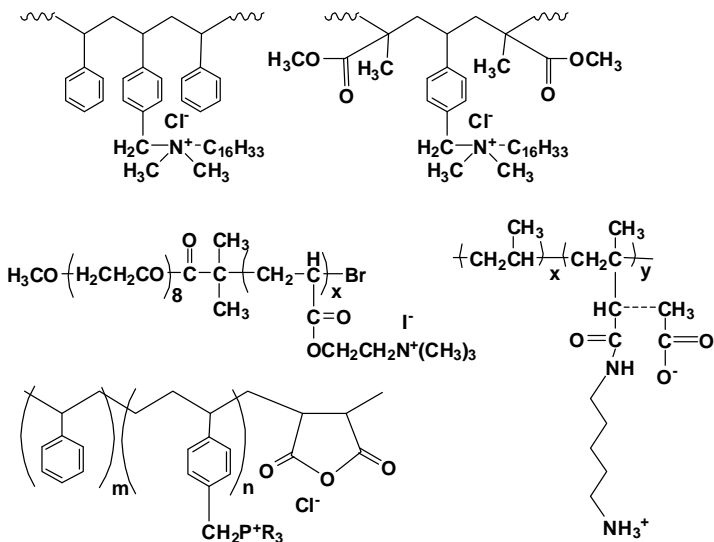
**Рис. 1.31.** Распределение низкомолекулярного модификатора в слое сорбента на основе глин

- 1 – адсорбция в мезопорах, каналах и на краевых плоскостях;  
2 – интеркалирование; 3 – поверхностная адсорбция

Помимо природы катионов свойства сорбентов на основе глин зависят от числа и природы функциональных поверхностных групп. Для этого подходят все способы поверхностной модификации, описанные выше. Так, при обработке глин силоксанами или галогенсиланами происходит гидрофобизация поверхности и как следствие – повышение сорбционной емкости по отношению к малополярным органическим соединениям. Силановые и силоксановые мостики могут использоваться также для пришивки модификаторов с помощью сложноэфирных, амидных и дисульфидных связей при модифицировании глин сшивающими реагентами и линкерами. Например, при обработке глин  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом образуются аминированные частицы алюмосиликатов, к которым далее пришивают высоко- и низкомолекулярные соединения с первичными аминогруппами, альдегидными, сульфгидрильными и гидроксидными функциями. Таким же способом ковалентно присоединяют белки. Благодаря высокому содержанию воды и общей гидрофильности алюмосиликатов сохраняется благоприятное микроокружение белка, что способствует сохранению его пространственной структуры, а значит, и биохимических функций.

Глины имеют также высокое сродство к неионогенным поверхностно-активным веществам на основе полиэтиленгликолей, хорошо сорбирующимся на лапоните и монтмориллоните, а также водорастворимым полимерам, содержащим катионные или анионные центры связывания. Некоторые примеры поверхностно-активных модификаторов, применяемых для модифицирования глин, приведены на рис. 1.32.

Задачи поверхностного модифицирования глин разнообразны. Это прежде всего стабилизация суспензий и коллоидных растворов, с помощью которых частицы глины наносят на поверхность электрода или вводят в угольную пасту. Улучшение их реологических характеристик позволяет получить более тонкие слои модификатора с более регулярной структурой и более воспроизводимыми параметрами (толщина, плотность, пористость и др.). Кроме то-

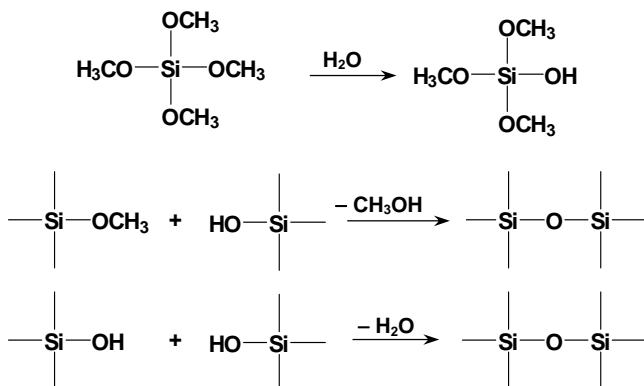


**Рис. 1.32.** Поверхностно-активные соединения, применяемые для модифицирования глин в составе ХМЭ

го, придание заряда частицам глины позволяет избежать мешающего влияния ионов матрицы, например при определении органических соединений в присутствии электрохимически активных ионов металлов. Наконец, предварительное модифицирование используется при последующем включении органических модификаторов в состав глин.

Близкая по методологии и задачам технология нанесения на поверхность электрода объемных трехмерных гелей, производных кремниевой кислоты и амфотерных гидроксидов металлов (гидратированные полимерные формы диоксида циркония, титана, их смеси с силикагелем), получила название *золь-гель иммобилизации*. Суть метода – контролируемая поликонденсация смеси замещенных силоксанов и ортосиликатов, инициируемая небольшими добавками воды и сильных минеральных кислот. Процесс состоит из двух стадий – гидролиза и последующего образования эфирных связей (собственно конденсации). На рис. 1.33 на примере тетраметоксисилана – одного из наиболее распространенных прекурсоров – приведена схема получения такого геля.

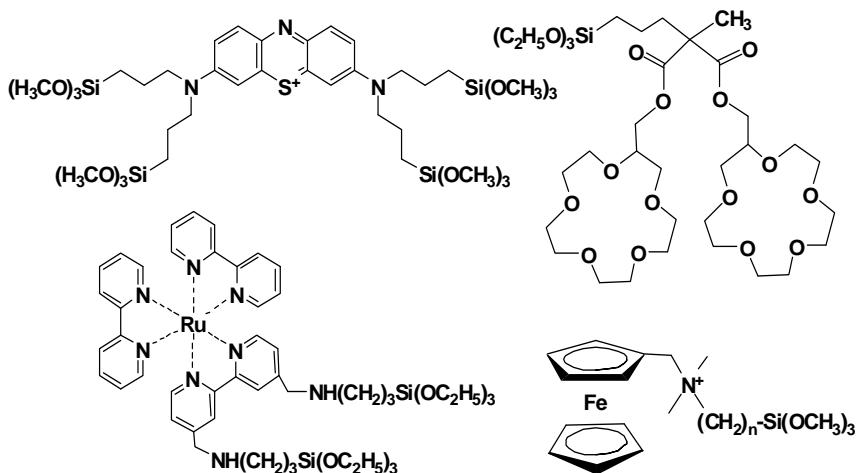
Гель можно получить в растворе, обычно в полярном органическом растворителе, либо непосредственно на поверхности электрода, добавляя фиксированный объем реакционной смеси на электрод после введения в нее кислотного катализатора. При этом образуется коллоидный раствор с размером частиц порядка 1–100 нм. Процесс сопровождается значительным увеличением вязкости



**Рис. 1.33.** Образование геля по методу золь-гель иммобилизации

раствора (стадия желирования). В зависимости от природы прекурсоров и катализатора стадия конденсации, сопровождающаяся образованием трехмерного сетчатого продукта, занимает от нескольких секунд до минут, иногда – до нескольких часов. Время желирования возрастает с увеличением числа негидролизующих связей у атома кремния при переходе от тетраэтоксисилана к метилтриэтоксисилану и далее к диметилдиэтоксисилану из-за стерических факторов, контролирующих образование трехмерных сетчатых структур. Высыхание полученного продукта сопровождается удалением спирта и воды. Это приводит к уменьшению пористости покрытия. Полностью высушенные продукты желирования называются *ксерогелями*. Их используют в качестве высокоэффективных сорбентов в газовой хроматографии, для изготовления визуальных тест-систем, а также матриц для нанесения модификаторов – красителей, медиаторов электронного переноса, наночастиц металлов и их оксидов – при изготовлении модифицированных электродов.

Поскольку в процессе поликонденсации число алкильных радикалов сокращается, можно получить практически чистый гидратированный диоксид кремния. Такие материалы получили название *силикатных стекол*. Однако их применение для модифицирования электродов ограничено низкой сорбционной емкостью и сложностями включения в состав поверхностного модифицирующего слоя. Чаще применяют частично гидратированные гели с относительно высокой долей алкоксильных групп (0,25–0,33) или смешанные продукты поликонденсации ортосиликатов и алкоксисиланов общей формулы  $\text{R}_{4-x}\text{Si}(\text{OR}')_x$ . Заместители R, устойчивые к гидролизу и остающиеся в составе продукта поликонденсации, могут содержать тиольные, гидроксидные, первичные и вторичные аминогруппы, используемые далее для ковалентной пришивки ре-



**Рис. 1.34.** Компоненты покрытий, получаемых методом золь-гель иммобилизации

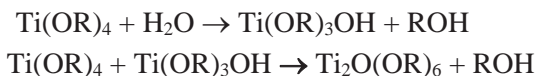
агентов. Такие материалы получили название органически модифицированных силикатов – «ормосилов» (Ormosil – organically modified silicates). По сравнению с неорганическими силикатными стеклами ормосилы имеют следующие преимущества:

- лучшие механические характеристики, в том числе устойчивость к растрескиванию, характерному для силикатов, и возможность получения сверхтонких пленок;
- возможность ковалентной пришивки модификаторов, что снижает их потери по сравнению с физической адсорбцией на силикатах;
- прямое введение функциональных групп, участвующих в распознавании определяемых соединений или генерировании аналитического сигнала, в состав полимерной матрицы;
- устойчивость при экстремальных рН и к действию агрессивных реагентов.

В качестве примера ормосилов, применяемых для модифицирования электродов, на рис. 1.34 приведены функционализированные мономеры, позволяющие получать покрытия с ковалентно связанными медиаторами электронного переноса или комплексообразователями. В сочетании с удобством нанесения и возможностями дополнительного физического включения разнообразных компонентов ормосилы позволяют получать электроды, проявляющие высокую эффективность в электрокаталитических, комплексообразующих и биохимических реакциях.

Производные кремниевой кислоты не единственные прекурсоры золь-гель технологий. В частности, применение находят неор-

ганические матрицы на основе тетраалкоксидов титана. В этом случае процесс поликонденсации можно описать следующей схемой:



Реакцию проводят в безводном этаноле, а инициатором поликонденсации служит ледяная уксусная кислота. Конечным продуктом является гидрат диоксида титана, способный образовывать тонкие оптически прозрачные пленки на золотых и металлоксидных электродах. Нанесение модифицирующего слоя проводят окунанием электрода в коллоидный раствор алкоксида титана. При температуре 80–150 °С формируется ксерогель диоксида титана, образование которого контролируют методами термического анализа и атомно-силовой микроскопии. При более высоких температурах (свыше 800 °С) диоксид титана рекристаллизуется в фазу рутила. Этот процесс сопровождается потерей основной части свойств, которые позволяют использовать метод золь-гель иммобилизации для модифицирования электродов. Золь-гель технологии применяются также для получения объемных трехмерных матриц на основе оксидов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{V}^{6+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$  и их композиций.

С технологиями желирования хорошо совмещаются методы получения полиэлектролитных комплексов. Для этого после начала процесса поликонденсации к раствору добавляют хитозан, полиэтиленимин и некоторые другие полиэлектролиты, заряд которых противоположен заряду коллоидных частиц. Гибридные органо-неорганические матрицы отличаются высокой стабильностью состава, пористостью, а также совместимостью с полярными органическими соединениями, такими как медиаторы электронного переноса или красители. Кроме того, некоторые неорганические материалы обладают сродством к определенным функциональным группам, что позволяет создавать гибридные покрытия с высокой прочностью удерживания компонентов. Так, диоксид циркония способен связывать фосфатные остатки органических эфиров, содержащихся в NADPH, олигонуклеотидах и белках. Диоксид титана, силикагель и диоксид циркония стабилизируют окисленные формы фенотиазиновых красителей и усиливают их сенсibiliзирующее действие, что находит применение в фотоэлектрохимических микроустройствах.

Помимо неорганических носителей, предназначенных для захвата и удерживания низкомолекулярных модификаторов, неорганические материалы используются также в качестве катализаторов химических, электрохимических и биохимических реакций. Образование полноценных неорганических пленок обеспечивает более высокую концентрацию активных центров, а также контролируемые условия осаждения. С формальной точки зрения такой способ



модифицирования мало отличается от физической или ковалентной сорбции неорганических соединений на электродах без образования самостоятельной фазы. Применительно к электрохимически активным медиаторам следует отметить энергетическую эквивалентность поверхности модифицированного неорганическими пленками электрода, отсутствие мешающих эффектов в области контакта модификатора с поверхностью последнего (образование гальванических пар, ускоренная коррозия, возникновение токов подтекания и смешанных коррозионных токов, химическая активность и др.). Из недостатков следует указать на существенно большее количество модификатора, необходимое для образования самостоятельной фазы, а также низкую проводимость большинства покрытий, что в свою очередь накладывает ограничения на их толщину и область рабочих потенциалов.

Неорганические пленки получают главным образом двумя методами – осаждением и растворением. По методу осаждения электрод последовательно обрабатывают растворами реагентов, образующих нерастворимое соединение с металлом на поверхности электрода. Например, пленку берлинской лазури получают смешиванием растворов желтой кровяной соли (гексацианоферрата(II) калия) и хлорного железа. Возможны варианты данного метода, в которых второй реагент генерируют электрохимически окислением ионов  $\text{Fe}^{2+}$  после введения в раствор соответствующей соли. К методу осаждения относятся также стандартные методы получения полимерных пленок – осаждение из суспензий в органических растворителях и замена растворителя, включая контролируемое изменение pH раствора.

Метод растворения применяется для модифицирования электродов, проявляющих электрохимическую активность. Это могут быть УПЭ, содержащие электрохимически активные компоненты, электроды из никеля, свинца, меди, других окисляющихся металлов. Анодирование электродов приводит к образованию на их поверхности оксидной пленки, которая при определенных условиях может быть включена в пленку нерастворимой соли или комплекса металла. Окисление можно проводить химически, подвергая электрод действию сильных окислителей или высоких температур. К данной группе методов относится также модифицирование первичных пленок, полученных на электроде одним из вышеперечисленных способов. Это термическое разложение неустойчивых солей (карбонаты, иодиды, оксалаты), преобразование оксидов в фосфаты и др.

Наиболее известны способы модифицирования электродов неорганическими пленками, состоящими из солей или нерастворимых комплексов металлов, например, цианатов  $M'_n[M''(\text{CN})_x]$ , где  $M' = \text{Fe}, \text{Os}, \text{Ru}$ . Для удерживания на электроде образующегося слоя металлоцианатов их осаждение совмещают с электростатиче-

ской адсорбцией на нафине или ином полиэлектролите. С той же целью применяют электрополимеризованные покрытия. Электрохимические характеристики неорганических пленок стабилизируют термической обработкой для удаления остаточной влаги и для более прочного сцепления внутренних слоев покрытия.

Селективность металлоцианатных пленок по отношению к ионам металлов, их прочность и проницаемость зависят от состава и структуры покрытия. Некоторые пленки, например, содержащие  $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ , ведут себя подобно цеолитам. Перспективными являются системы на основе гексацианоферратов  $\text{In}^{3+}$  и  $\text{Ru}^{3+}$ . Электроды с такими пленками имеют высокую устойчивость к воздействию агрессивных сред. Их применяют для вольтамперометрического определения тиолов, сульфидов и дисульфидов. Электроды из стеклоуглерода, модифицированные гексацианоферратами, применяются в качестве амперометрических детекторов в проточных системах, особенно при определении серосодержащих соединений, которые могут загрязнять поверхность электродов других типов или с другими модификаторами. Выраженные каталитические свойства гексацианометаллатных пленок и стабильность отклика модифицированных ими электродов позволяют использовать их при разработке биосенсоров, применяемых при исследованиях *in vivo* или *in vitro*.

В последнее время появились сообщения о пленках из смешанных гексацианометаллатов, которые находят применение в анализе неорганических и органических соединений. Модифицированные такими пленками электроды проявляют высокую каталитическую активность при окислении ионов серосодержащих кислот, гидразина, гидроксилamina, пероксида водорода.

Особенностью поведения электродов, модифицированных оксидами поливалентных металлов ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{RuO}_2$  и  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{WO}_3$ ), является то, что они способны к переносу не только ионов водорода, как классические медиаторы, но и атомов кислорода по узлам кристаллической решетки. Это позволяет получить электрокаталитический отклик в реакциях определения окислителей (бромат-ионы) и восстановителей (сахара, аминокислоты). Медный электрод, модифицированный оксидами, — единственный сенсор, успешно конкурирующий с ферментными глюкометрами при неферментативном определении глюкозы и некоторых сахаров. Примеры модифицированных электродов на основе неорганических пленок, дающих каталитический отклик, рассмотрены ниже.

Несмотря на многообразие модифицированных неорганическими материалами электродов, используемых для электрохимического окисления и восстановления органических и неорганических соединений, остаются проблемы, связанные с совершенствованием технологии нанесения пленок и повышением селективности отклика. Поэтому продолжается поиск новых модифицирующих матери-

алов, обеспечивающих не только высокую электрокаталитическую активность, но стабильность и селективность сигнала. Особенно это касается проблем, возникающих при миниатюризации электродов и их применении в мультисенсорных системах (микрофлюидные чипы, микролаборатории и др.).

### **1.2.5. Физические методы модифицирования электродов**

Логично предположить, что кроме большого числа химических методов должны существовать способы физического модифицирования поверхности электрода. И действительно, физическое воздействие на электрод как вводная часть химического модифицирования или его альтернатива хорошо известно. Оно активно применяется в различных вариантах модифицирования электродов или их подготовки к проведению измерений. Примером может служить механическое обновление рабочей поверхности УПЭ, ее механическая зачистка, полировка углеродных и металлических электродов.

Предварительная подготовка поверхности электрода до нанесения слоя модификатора имеет большое значение в обеспечении воспроизводимости процедуры модифицирования, измерении и стабильности сигнала-отклика, времени жизни электрода. Основная задача такой обработки – достижение определенной шероховатости поверхности электрода (постоянного соотношения истинной и геометрической площади поверхности), а также ее химической и энергетической однородности (эквипотенциальности). Последняя в значительной степени влияет на обратимость электронного переноса, а значит, на перенапряжение измерения сигнала и его селективность.

Механическая обработка предполагает выравнивание микрорельефа поверхности электрода, удаление с нее примесей и загрязняющих частиц. Кроме того, при механическом воздействии происходит частичное перераспределение вещества поверхностного слоя – заполнение мезопор, исправление микродефектов структуры (трещины, разрывы), выдавливание жидких компонентов (пластификаторы, вода, электролиты). В случае планарных графитовых электродов и УПЭ это приводит к повышению их прочности и улучшению реологических характеристик (снижение текучести, более четкая геометрия краев рабочей поверхности). Для металлических электродов результаты механической шлифовки не так однозначны. При сглаживании впадины микрорельефа заполняются оксидами, имеющими больший объем, чем металл, из которого они образуются. В результате плотность поверхностного слоя может понизиться, как и его механическая прочность, вследствие поверхностных дефектов металлической решетки. Накопление оксидов – неизбежное следствие механической полировки (шлифовки) по-

верхности. При электростатической иммобилизации, получении сорбционных слоев полярных модификаторов, силилировании накопление поверхностных оксидов благоприятно. Однако при формировании самоорганизующихся слоев на золоте оксидную пленку приходится удалять. В некоторых случаях оксидная пленка, образующаяся при шлифовке, оказывается слишком рыхлой или недостаточно толстой и подлежит удалению или модифицированию. Не следует забывать и о загрязнении поверхностного слоя электрода продуктами коррозии, компонентами шлифовальной пасты и т. д.

Другой распространенный способ физического воздействия — нагрев электрода. Его практикуют для удаления воды, летучих компонентов модифицирующих составов, рекристаллизации поверхностных компонентов (солей, оксидов, молекулярных кристаллов), образования твердых растворов и т. д. В случае УПЭ контролируемый нагрев рабочей поверхности (в том числе в процессе механической шлифовки) способствует частичному плавлению связующего (воск, полиэтилен низкого давления, полиэтиленгликоль). Это позволяет получить более гладкую поверхность и в ряде случаев заполнить трещины, возникающие в составах с высоким содержанием сыпучих компонентов (углерод, минеральные сорбенты и др.) или при недостаточно плотной набивке пасты.

При поверхностном модифицировании электродов термическую обработку применяют для повышения адгезии поверхностных слоев из термоустойчивых компонентов (преимущественно неорганических), а также для изменения природы модификатора. В основном это касается удаления избыточной воды, как свободной (захваченной в поверхностный слой при осаждении модифицирующего слоя), так и связанной (вода в составе гидратов ионов и молекул, выделяющаяся при разложении гидроксидов и неустойчивых кислот). Максимальная температура обработки зависит от природы модифицирующих компонентов и конструкции электрода. Например, для печатных графитовых электродов на поликарбонатной пленке, она не должна превышать 100–120 °С. При печати электродов на керамических пластинах допустимы температуры порядка 200–250 °С. Необходимость термической обработки обусловлена тем, что при получении тонких (около 5 мкм) слоев угольной пасты при указанных температурах происходит уплотнение поверхностного слоя (удаление летучих компонентов), а также термоотверждение полимерных компонентов. В результате не только повышается механическая прочность покрытия, но и увеличивается его электропроводность. Полное и тщательное высушивание снижает деградацию угольной пасты при последующей эксплуатации электрода.

Стеклоуглеродные электроды в изолирующей оболочке из политетрафторэтилена выдерживают нагрев до 300 °С. Сам стеклоуглерод термически устойчив и выдерживает нагрев до 3000 °С.

Большинство электродов из благородных металлов можно прокалывать при 800–1200 °С и выше. Ограничения зависят от термической устойчивости вспомогательных элементов конструкции — изолирующих лаков, электропроводящих клеев, полимерной изоляции и др.

При нагреве медных, никелевых, серебряных и стальных электродов на их поверхности образуются оксидные пленки, которые в зависимости от условий получения могут пассивировать электрод, повышая сопротивление переноса заряда, или участвовать в медиаторном переносе электрона (смешанные оксиды меди, никеля). В настоящее время такие электроды используются достаточно редко из-за плохой воспроизводимости характеристик поверхности, но они могут входить в состав более сложных устройств как первичные преобразователи сигнала (кислородные датчики, биосенсоры).

Воздействие высоких температур способствует регенерации поверхности электродов из благородных металлов за счет выжигания органических примесей. Так, после нагрева платиновых электродов, «отравленных» соединениями серы, до 600–1000 °С они восстанавливают свои свойства и становятся каталитически активными. Хорошие результаты получены при активации поверхности стеклоуглеродных электродов с помощью лазера. При этом свойства электродов существенно улучшаются, что связывают с более тщательной очисткой их поверхности от загрязняющих веществ по сравнению с механической обработкой.

Следует оговорить, что в большинстве случаев температурная обработка плохо совместима с органическими модификаторами. Умеренный нагрев практикуется на стадии обезвоживания (получение ксерогелей и полимерных материалов, сорбционное модифицирование), при инициировании полимеризации и поликонденсации некоторых соединений (термически и УФ-отверждаемые составы печатных электродов и полимерных пленок, эпоксидные композиты), а также при формировании жидкокристаллических и иных упорядоченных структур.

Упомянутые выше методы физической обработки электродной поверхности предусматривают одновременное воздействие кислорода атмосферного воздуха и поэтому, строго говоря, включают элементы химического модифицирования. Но есть примеры модифицирования электродов и в бескислородной среде. Это процессы пиролиза некоторых прекурсоров модификаторов, таких как карбонаты, силикаты, а также плазменная обработка для упрочнения и повышения химической устойчивости поверхностных слоев металлических электродов. Особо следует отметить процесс допирования поликристаллического алмаза атомами бора. Электроды из допированного алмаза отличаются высокой устойчивостью в агрессивных средах и обратимостью переноса электрона, что позволяет использовать их в качестве преобразователей сигнала модифици-

рованных электродов при измерениях в производственных условиях, в потоке, а также в микроаналитических системах. Аналогичные процессы р,п-допирования традиционно применяются при изготовлении микроэлектронных устройств на кремниевой основе – полевых транзисторов.

Из микроэлектроники заимствованы и способы имплантирования электродов наночастицами благородных металлов и оксидами переходных металлов в условиях искрового или электродугового разряда. Имплантируемые частицы металлов, испаряемых в электрической дуге, осаждаются на более холодной поверхности электрода, внедряясь в нее на глубину до нескольких сот нанометров. В частности, на платиновых электродах, имплантированных свинцом, по сравнению с чистой платиной существенно ускоряется процесс анодного окисления муравьиной кислоты. Однако такие электроды пока не нашли широкого практического применения, поскольку в результате имплантирования происходит изменение состава и структуры электрода лишь в тонком приповерхностном слое, что обуславливает их низкую стабильность.

В условиях электродугового разряда и лазерного разложения ряда углеродсодержащих газов (метан, угарный газ) можно получить электроды, модифицированные аморфным углеродом и его наноструктурированными частицами (нанотрубки, фуллереноподобные структуры). По сравнению с аналогичными процедурами «мокрого» модифицирования осаждение из газовой фазы в вакууме отличается более плотной упаковкой поверхностного слоя, меньшей его пористостью и большим разнообразием структур и функциональных групп. Последующий частичный отжиг полученных слоев в присутствии небольших количеств кислорода позволяет регулировать пористость, гидрофильность и сорбционную активность покрытий.

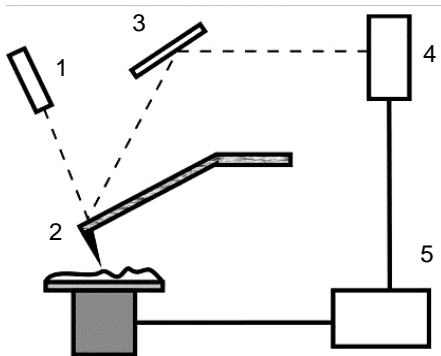
Применительно к УПЭ обработка аргоновой плазмой часто приводит к так называемой активации электрода. При формировании поверхностного слоя электрода частицы углеродсодержащего вещества (сажа, наночастицы стеклоуглерода, нанотрубки) обволакиваются тонким слоем связующего компонента, что увеличивает сопротивление поверхностного слоя и снижает эффективность последующего модифицирования. Обработка электрода аргоновой плазмой сводится к бомбардировке его поверхности ионами  $Ar^+$ , результатом которой является разблокирование поверхностных частиц углерода, сопровождающееся образованием однородной наноструктурированной поверхности с хорошо воспроизводимыми электрохимическими характеристиками. Положительный эффект обработки аргоновой плазмой отмечен и для электродов на основе фуллерена, внедренного в угольную пасту; увеличивается емкость электродов в отношении других модификаторов, таких как нуклеиновые кислоты, повышаются токи окисления отдельных нуклеоти-

дов ДНК и РНК. В случае пирографита и аналогичных углеродных материалов обработка аргоновой плазмой способствует открытию краевых плоскостей, а также закрытых капсулированных структур в приповерхностном слое. Увеличение числа дефектов кристаллической решетки увеличивает поверхностную энергию и электрокаталитическую активность электрода.

Большое значение имеет адекватная оценка состояния поверхности после ее обработки. Для этого применяют методы сканирующей электронной и зондовой микроскопии. На современных приборах можно получить изображения элементов от бора до урана с разрешением порядка 0,5 нм и чувствительностью до  $10^{-20}$  г, что составляет ~150 атомов на единицу площади поверхности. Информацию о подобных объектах дает электронная микроскопия высокого разрешения. Высокоэффективными методами исследования поверхности с разрешением на уровне нескольких атомов (молекул) являются сканирующая туннельная микроскопия, ее варианты с электрохимически активным зондом, а также атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия.

Туннельная микроскопия дает картину распределения поверхностной энергии, отражающую кривизну элементов поверхности, либо электрохимического потенциала. Последний не только позволяет установить присутствие адатомов и микровключений электрохимически активных элементов и материалов, но исследовать природу поверхностных слоев неорганических и органических модификаторов, включая крупные молекулы белков и отдельные клетки микроорганизмов, по распределению их заряда и концентрации ионов водорода.

Электронная и атомно-силовая микроскопия дают информацию о микрорельефе электродной поверхности. В первом случае для этого используется дифракция электронного пучка на золотой матрице, получаемой напылением в вакууме сверхтонкого слоя золота поверх электрода. В атомно-силовой микроскопии изображение рельефа электродной поверхности получается при движении сверхтонкого игольчатого зонда (кантеливера) относительно поверхности образца. Зонд крепится на пружинном держателе. Изменение позиции зонда контролируется по углу отражения лазерного луча на микропризме, закрепленной на конце кантеливера (рис. 1.35). Атомно-силовая микроскопия позволяет дополнить данные электрохимических исследований, а в ряде случаев дать интерпретацию наблюдаемых изменений на вольтамперограммах при варьировании условий модифицирования. Примером может служить влияние способа электрополимеризации анилина на размер образующихся полимерных кластеров (рис. 1.36). Нанесение полианилина на подложку из полимерной формы метиленового синего приводит к заметному увеличению доли крупных кластеров.

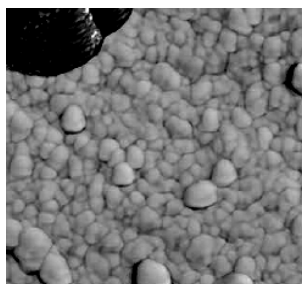


**Рис. 1.35.** Схема атомно-силового микроскопа

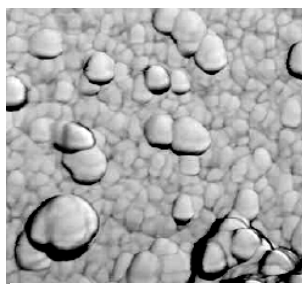
1 – лазерный диод; 2 – кантилевер; 3 – зеркало; 4 – детектор движения;  
5 – система управления движением столика с образцом

Результаты исследований электродов с помощью современных спектральных методов, включая регистрацию рамановских и ИК-спектров отражения и поглощения сверхтонких поверхностных пленок модификаторов на оптически прозрачных электродах ИТО позволили получить картину распределения зарядов в полимерных пленках, установить природу дефектов поверхности и их влияние на электрохимические процессы, а также исследовать кинетику электрохимических, сорбционных и биохимических реакций.

Методы физической обработки включают также различные варианты изотермического переноса энергии, в том числе обработку электродов ультразвуком и микроволновым излучением. Как и в других химических процессах, они ускоряют многие химические и электрохимические реакции, протекающие на поверхности электрода. В частности, применение ультразвуковой обработки в золь-гель технологиях заметно ускоряет процесс желирования и позво-



**а**



**б**

**Рис. 1. 36.** Атомно-силовые фотографии поверхности полианилина  
*а* – на стеклогуглероде; *б* – на стеклогуглероде, предварительно покрытом пленкой полиметиленового синего



ляет получить более плотные и устойчивые покрытия. Методы соноэлектрохимии находят применение в промышленности для решения разнообразных задач, начиная от очистки электродов и их подготовки к нанесению гальванических покрытий и заканчивая интенсификацией электрохемилюминесценции и полимеризации различных материалов.

Рассмотренные способы вполне применимы для модифицирования электродов и создания электрохимических сенсоров, хотя в настоящее время они реализованы лишь эпизодически. Основным направлением применения ультразвука в электрохимии является интенсификация процессов движения частиц в приэлектродном пространстве, что имеет многочисленные следствия, начиная от изменения размера кластеров полимеризуемых материалов и кончая улучшением операционных характеристик микрофлюидных систем. Следует указать также на применение ультразвука для подавления пассивации, в том числе при получении тонких пленок при электроокислении ароматических фенолов и аминов.

Характеризуя физические методы обработки электродов в целом, необходимо отметить, что их участие в преобразовании поверхности, как и влияние на операционные характеристики электродов часто недооценивается. Вместе с тем грамотное и тщательное выполнение всех операций, как и использование современной техники ультразвуковой и плазменной обработки, способно в значительной степени изменить характеристики электрода.

### **1.2.6. Иммобилизация биокomпонентов**

Под иммобилизацией биологических компонентов – ферментов, антител, олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот или содержащих их природных материалов (срезы тканей, кожура растений, плодов и др.) – понимают перевод биокomпонентов в нерастворимую форму путем включения в состав инертного носителя, а также в результате физического (сорбционного) или химического связывания с поверхностью электрода. Стадия иммобилизации является ключевой для измерения биохимических взаимодействий и от искусства ее проведения во многом зависят операционные характеристики электрода, чувствительность и селективность отклика на определяемый компонент в объектах сложного состава. Идеи иммобилизации биоматериала и его включения в состав специализированных аналитических устройств – биосенсоров – пришли в электроанализ из смежных областей биологии и медицины, что указывает на междисциплинарный характер таких исследований.

Строго говоря, методы иммобилизации биомолекул и биологических материалов – клеток и тканей – методически не отличаются от описанных выше подходов к модифицированию электродов. Основное отличие в том, что процедура иммобилизации и

условия эксплуатации биосенсоров в большей степени, чем для других модификаторов, определяются особенностями биологических объектов. К ним относятся достаточно узкий интервал температур, высокая чувствительность к резким перепадам pH, присутствию органических растворителей, особенно смешивающихся с водой, другим высокоактивным реагентам. Кроме того, биологические компоненты в иммобилизованном состоянии должны сохранять определенную степень свободы. Это касается как конформационной подвижности биополимеров, так и доступа к ним низкомолекулярных компонентов, необходимых для осуществления биохимических реакций. Помимо собственно реагентов (субстратов и ингибиторов ферментов, кофакторов, рецепторных молекул) к ним относятся стабилизаторы, компоненты буферных систем и т. д. Это накладывает определенные ограничения на подходы, разработанные ранее для других типов модификаторов. С другой стороны, именно сложности иммобилизации биологических компонентов стимулировали развитие методов модифицирования электродов, не случайно многие примеры из предыдущих глав так или иначе касались создания биосенсоров.

Не повторяя классификации методов модифицирования электродов в целом, остановимся на особенностях их применения в случае биологических компонентов.

**Включение в инертные носители** остается одним из наиболее мягких способов иммобилизации, поскольку при этом сохраняется микроокружение биоконпонентов и присущая им гидрофильность среды. С этой целью в качестве носителей обычно выбирают высокополярные гидрофильные полимеры, способные к многоточечному связыванию с биологическими молекулами.

Исторически первыми носителями для ферментов и нуклеиновых кислот были так называемые природные гидрогели (гидроколлоиды), вырабатываемые преимущественно для пищевой промышленности, – полисахариды и белки. К ним относятся агар, крахмал, каррагинан, хитин и хитозан, целлюлоза и ее производные, альгинаты. Поскольку они применяются в качестве модификаторов электродов исключительно в составе биосенсоров, кратко рассмотрим их основные характеристики.

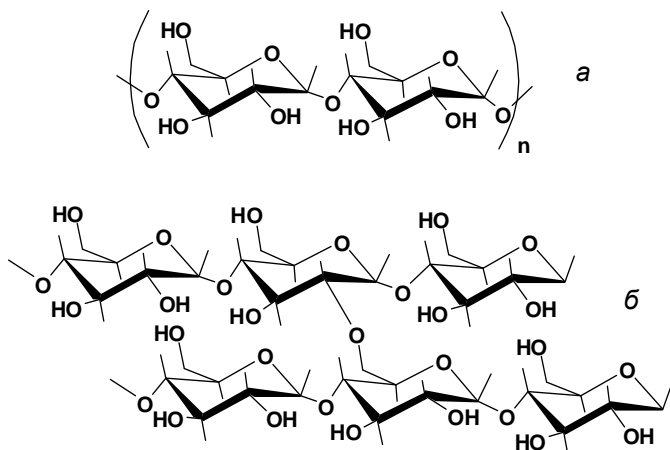
*Агар* вырабатывается из морских водорослей и представляет собой линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся фрагментов D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы с небольшой фракцией их сульфатов (2,5–7 %). С химической точки зрения, агар представляет собой смесь нескольких фракций, одна из которых – агароза – обеспечивает его желирование при контакте с водой. Образование трехмерных сетчатых структур в основном достигается за счет образования водородных связей. Вследствие этого образование геля агара имеет обратимый характер. Процесс желирования начинается при температурах около 35–40 °C, а выше 85 °C гель

разрушается из-за плавления. В процессе желирования молекулы агара сначала образуют двойные спирали, которые затем соединяются концевыми фрагментами в сетчатые структуры, напоминающие природную губку. Агар хорошо совместим с большинством биологических материалов, применяемых в биосенсорах, однако его достаточно рыхлая структура плохо удерживает небольшие водорастворимые белки.

*Крахмал* – самый известный гидрогель, применяемый не только для включения биологических компонентов в поверхностную пленку электрода, но и для стабилизации белков в других способах иммобилизации, таких как ковалентная сшивка и капсулирование в синтетических полимерах в присутствии органических растворителей. Крахмал представляет собой смесь линейного и разветвленного полимеров глюкозы. Доля линейного изомера – амилозы – составляет порядка 20–25 % при длине 500–6000 глюкозных остатков. Температура желирования крахмала составляет 65–70 °С. При температурах выше 80 °С происходит необратимое разрушение микрокристаллических гранул (образование так называемого клейстера), сопровождающееся скачкообразным изменением вязкости раствора. Как и в случае агара, желирование крахмала при умеренных температурах носит обратимый характер. Образование водородных связей в геле крахмала практически аналогично взаимодействию биополимеров с водой, что делает данный носитель идеальным стабилизатором большинства биопрепаратов. Сейчас помимо собственно крахмала продаются коммерческие препараты его ацилированных и метоксипропилированных производных, разрешенные к использованию в качестве добавок к продуктам питания. В среднем в образовании эфирных связей участвует каждый пятый глюкозный остаток. Линейная и разветвленная структуры крахмала изображены на рис. 1.37.

Крахмал подвергают также частичному гидролизу и кросс-сшивке специальными реагентами. Модифицирование крахмала обычно проводят в пищевой и кондитерской промышленности; этим объясняется его введение в состав некоторых продуктов питания и напитков.

*Желатин* не является природным продуктом. Он образуется при длительной тепловой обработке коллагеновых белков, сопровождающейся их частичным гидролизом и разрушением третичной и частично вторичной структуры. Само название «желатин» произошло от латинского термина *gelata* – желирование, обозначающего основное свойство желатина, используемое на практике. Желатин при умеренном нагреве дает вязкие составы – гели – практически во всем интервале pH, что делает его удобным для иммобилизации биологических компонентов. Как и исходный коллаген, он содержит значительную долю глицина (примерно треть), что является причиной высокой подвижности белковых цепей.



**Рис. 1.37.** Линейная (а) и разветвленная (б) структуры крахмала

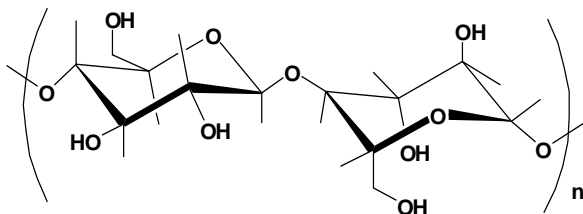
Считается, что при температурах начала желирования (35–40 °С) белковые цепи достаточно хаотичны. Однако по мере образования поперечных связей в структуре желатина появляются искаженные  $\alpha$ -спирали, формируемые, как полагают, с участием присутствующих в полипептидах иминокислот – пролина и гидроксипролина. Такое сочетание гибкости и жесткости дает желатину способность к формированию сетчатых трехмерных структур в широком диапазоне концентраций и в различных по составу растворах. Температура плавления геля желатина около 40 °С, что связано с разрывом внутримолекулярных водородных связей. Тем не менее, даже при более высоких температурах сохраняется высокая регулярность структуры желатина за счет сохранения поперечных связей отдельных полипептидов. Средняя молекулярная масса желатина зависит от сырья и особенностей его производства. Наиболее распространенные марки желатина имеют максимальную фракцию с молекулярной массой порядка 180 000 – 200 000. Для сравнения, коллаген имеет молекулярную массу более 360 000, тогда как гидролизаты коллагена из кожи свиньи и быка – порядка 1800 и 20 000 соответственно.

*Каррагинан* (близкий аналог агара) – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей. По сравнению с агаром каррагинан имеет большую молекулярную массу и долю сульфатированных мономерных звеньев (до 24 %). Это линейный полимер из повторяющихся остатков галактозы и 3,6-ангидрогалактозы, частично сульфатированных и соединенных 1,2- и 1,4-гликозидными мостиками. Различают три основных разновидности каррагинана –  $\lambda$ ,  $\kappa$  и  $\iota$  (лямбда, каппа и иота), отличающихся конформацией, положением сульфатных групп и степенью сульфатирования. Они

заметно различаются по желирующей способности. Например, к-каррагинан образует плотные гели в присутствии ионов калия, тогда как другие каррагинаны к данному иону индифферентны. Только ι-каррагинан взаимодействует с ионами кальция, образуя мягкие эластичные гели. Все каррагинаны растворимы в горячей воде, λ- и калиевые соли κ- и ι-каррагинана – в холодной воде.

В зависимости от концентрации, температуры и природы катиона металла каррагинаны дают гели, заметно отличающиеся по реологическим характеристикам, текстуре и температурному интервалу существования. Обычно для приготовления гелей в зависимости от природы катиона используют температурный интервал 40–60 °С. Существенно изменяется и структура ассоциатов – от плотно упакованных агрегатов κ-каррагинана, в которых ионы калия играют роль мостиков, удерживающих молекулы полисахарида вместе, до рыхлой сетчатой структуры ι-каррагинана в присутствии ионов кальция с преобладанием димеров, соединенных между собой концевыми фрагментами. Влияние ионов металлов на структуру гелей, например, казеина в присутствии ионов кальция, способствует захвату заряженных белковых глобул. При этом в растворе формируются мицеллярные структуры с большими насыщенными белком фрагментами, покрытыми по поверхности заряженными полисахаридными цепочками. Управление процессами желирования путем изменения ионного состава раствора делает каррагинан удобным носителем при иммобилизации белков для последующей эксплуатации биосенсоров в растворах с низким содержанием воды, например, при работе в неводных средах, а также при включении белков в материал электрода.

*Целлюлозы* объединяют целую группу продуктов, вырабатываемых из растительного сырья и состоящих преимущественно из линейных полимеров глюкопиранозы, соединенных 1,4-мостиковыми эфирными связями:



Коммерческие препараты целлюлозы для аналитических целей (сорбенты, фильтры и др.) имеют фибриллярную структуру, включающую плотноупакованные «кристаллические» фрагменты, чередующиеся с аморфными участками. В зависимости от размера волокон, их плотности, степени упаковки целлюлоза содержит различные количества гидратной воды и по-разному ведет себя в составе различных материалов. Микрокристаллическая целлюлоза

достаточно давно используется в качестве сорбента и хроматографического носителя, поэтому ее свойства рассматриваться не будут. В отличие от других природных полисахаридов целлюлоза не растворяется, а лишь набухает в воде, что накладывает ограничения на регулярность образующегося на поверхности электрода слоя и возможность удерживания в нем высоко- и низкомолекулярных соединений. Исключение составляют порошковые и коллоидные препараты микроцеллюлозы (например, Avicel или Ceolus), образующие коллоидные системы. Однако их применение ограничено необходимостью стабилизации неустойчивых биологических компонентов на стадиях ковалентной или сорбционной иммобилизации.

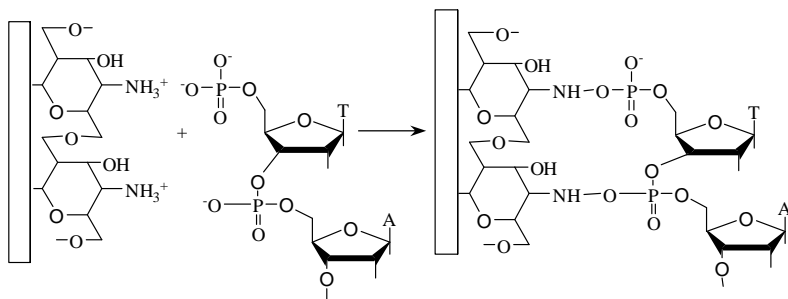
Следует заметить, что применение природных полисахаридов, столь популярное еще десять лет назад, в настоящее время сокращается из-за недостаточной стабильности модифицирующих слоев при хранении, а также вследствие появления других, более удобных, материалов. Тем не менее, природные полисахариды и сейчас весьма широко используются для иммобилизации микроорганизмов, клеточных культур и внеклеточных материалов (гомогенатов и неочищенных экстрактов тканей и др.), а также в ферментных биосенсорах, предназначенных для работы в неводных средах\*.

*Хитин* – полимер 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-глюкозы, как и продукт его деацетилирования *хитозан*, выделяют из экзоскелета краба, отходов переработки кальмара, некоторых других морских животных и насекомых (тараканы, пчелы и т. п.). Это высокопрочные и устойчивые к гидролизу полимеры, образующие гладкие покрытия после пересадки из концентрированных щелочей (хитин) или кислот (хитозан). Хитин вследствие достаточно жестких условий растворения не может быть использован для объемной иммобилизации биологических компонентов, инактивирующихся в концентрированных щелочных растворах. Пленки хитина применяют либо как покровные мембраны после нанесения на электрод биологических компонентов, либо как сорбенты. В последнем случае хитин гранулируют или формируют пленки и высушивают их для придания пористости. В отличие от синтетических защитных мембран хитиновое покрытие обладает высокой биологической совместимостью, что имеет существенное значение при создании имплантируемых в живые организмы электродов.

Свойства хитозана заметно разнообразнее. В зависимости от средней молекулярной массы и условий получения молекулы хитозана содержат до 20 % остаточных ацетамидных фрагментов. Свободные аминогруппы легко этерифицируются с образованием полимерных продуктов, растворимость которых существенно зависит

---

\* См., например, Campanella L., De Luca S., Sammartino M. P., Tomassetti M. Anal. Chim. Acta, 1999, vol. 385, p. 59.

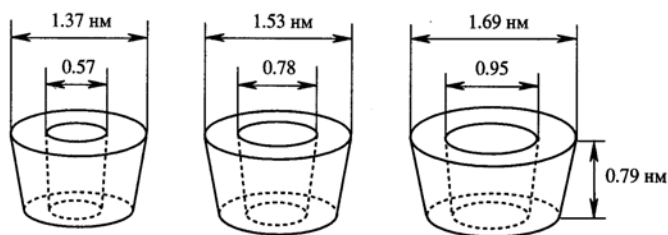
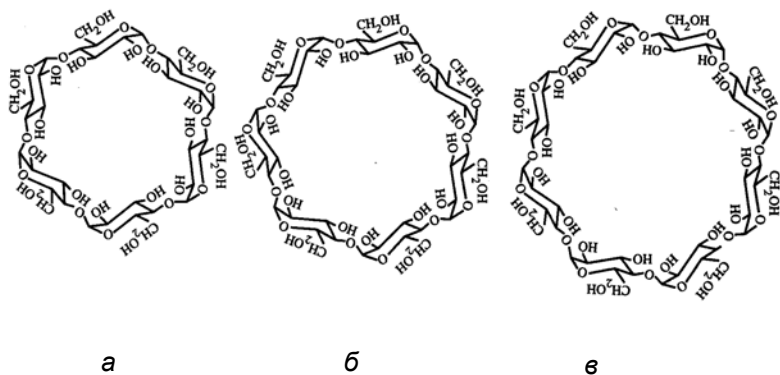


**Рис. 1.38.** Иммобилизация ДНК на поверхности электрода, модифицированного хитозаном

от pH раствора. Так, если хитозан растворим в концентрированной уксусной кислоте, то его N-замещенные производные, как N-фталилхитозан, образуют вязкие гели уже в щелочной среде, например в присутствии аммиака. Наличие положительного заряда в нейтральной или слабокислой области способствует вовлечению хитозана в полиэлектролитные или самоорганизующиеся комплексы с участием анионных компонентов, как нафийон или ДНК. Такие комплексы осаждаются на электроде вследствие большой молекулярной массы (аналог процесса агглютинации) либо ковалентно связываются с электродом посредством глутарового альдегида или с помощью других методов ковалентного модифицирования. В качестве примера образования комплексов хитозана на рис. 1.38 приведена схема иммобилизации ДНК на электроде за счет образования электростатических и эфирных связей с фосфатными остатками нуклеотидов.

*Циклодекстрины* – шести- ( $\alpha$ -ЦД), семи- ( $\beta$ -ЦД) или восьми- ( $\gamma$ -ЦД) циклические олигомеры глюкопиранозы с геометрией усеченного конуса, в котором первичные гидроксидные группы расположены у более суженного конца (рис. 1.39). Глюкозные остатки циклодекстринов образуют полости, внутренняя часть которых гидрофобна, а внешняя – гидрофильна. Химическая модификация гидроксидных групп позволяет варьировать геометрию полости, гидрофильно-гидрофобные и рецепторные характеристики циклодекстринов. Предложены методы функционализации ОН-групп, что в ряде случаев позволило осуществить распознавание энантимеров. С помощью модифицированных циклодекстринами электродов проводят селективное вольтамперометрическое определение хлор- и нитробензолов, *n*-нитрофенола, бензофенонов и других органических веществ. Как правило, образуются комплексные соединения типа «гость-хозяин» состава 1 : 1.

Полость ЦД достаточна для координации небольших полярных органических молекул, а также ионов металлов. Это позволяет



**Рис. 1.39.** Молекулярные и пространственные структуры  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов (*а*, *б* и *в* соответственно)

использовать циклодекстрины как сорбенты-модификаторы в УПЭ и для поверхностного модифицирования электродов из углеродных материалов. Их же используют для стабилизации и мягкого включения в поверхностные пленки медиаторов электронного переноса – тетраметилбензидина, тетратиафульвалена, диметилферроцена и N-метилпиридиниевых солей. Некоторые характеристики и размеры молекул циклодекстринов приведены в табл. 1.4.

Способность циклодекстринов к формированию гидроколлоидов, стабилизированных водородными связями и электростатическими взаимодействиями, а также мягкое нековалентное включение низкомолекулярных медиаторов электронного переноса позволяют получить сигналы, отклик которых основан на явлении биоэлектрокатализа – окислительно-восстановительных превращениях белков и нуклеиновых кислот. Тиолированные и аминированные производные циклодекстринов образуют упорядоченные структуры с повышенной емкостью по отношению к белкам и аминокислотам (рис. 1.40).

Помимо рассмотренных полисахаридов и белков в качестве носителей биокomпонентов применяются гидрофильные синтети-

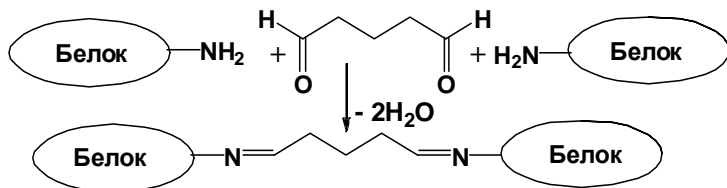


**Таблица 1.4. Характеристики и размеры молекул циклодекстринов**

Характеристика	Циклодекстрин		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Число глюкозных остатков	6	7	8
Растворимость в воде, %	14,5	18,0	23,2
Молекулярная масса	972	1135	1298
Внешний диаметр полости, нм	1,37	1,53	1,69
Внутренний диаметр полости, нм	0,57	0,78	0,95

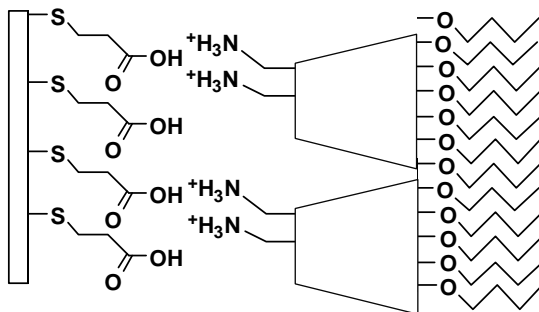
ческие материалы, такие как полиакриламиды, полисилоксаны, лапониты, модифицированные глины и органосиликаты. Иммобилизация предполагает захват объемных молекул белков и нуклеиновых кислот, а также целых клеток и клеточных культур в объем полимерной пленки, формирующейся на поверхности электрода. Помимо стерических факторов захвату способствуют электростатические взаимодействия и образование водородных связей между гидроксидными группами носителей и поверхностными функциональными группами биологических компонентов.

Гидрофильные носители различной природы, в том числе выпускаемые промышленностью (сефадекс, гидрогели поливинилпирролидона, фотополимеризуемые гели и др.), при контакте с водой увеличивают объем в результате набухания. Это может затруднить крепление пленки на поверхности электрода или привести к подтеканию электролита в зазор между ней и электродом. Набухание носителя может сопровождаться также частичным вымыванием биокон компонента в раствор. Во избежание этого гидрогели обрабатывают глутаровым альдегидом или другими бифункциональными реагентами. Они образуют ковалентные связи между отдельными молекулами белка:



При этом формируются более жесткие и содержащие меньшие количества воды по сравнению с исходными гидрогелями сетчатые трехмерные структуры. В качестве матрицы, образующейся в результате кросс-сшивки, могут выступать и сами белки, реагирующие между собой с образованием нерастворимых продуктов.

Глутаровый альдегид часто применяют в сочетании с другими би- и полифункциональными реагентами, содержащими гидроксидные, amino- и карбоксильные группы, – полиэтиленимином,

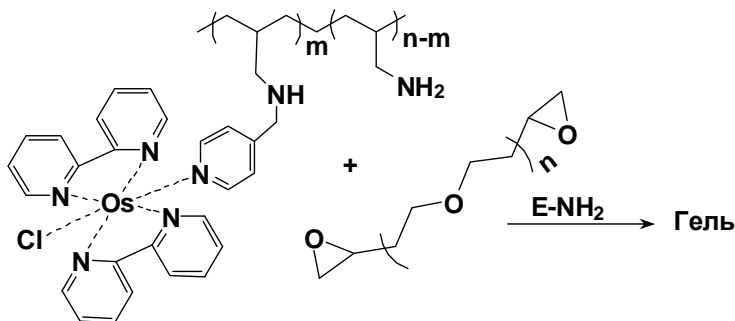


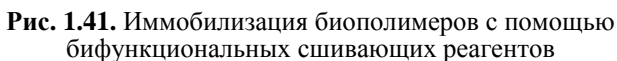
**Рис. 1.40.** Самоорганизующиеся слои производных циклодекстринов на золотых тиолированных электродах, полученные методом электростатической самосборки

полиаллиламином и др. При этом функция глутарового альдегида остается той же – образование сшивок, препятствующих вымыванию ферментов или нуклеиновых кислот из гидрофильной пленки. Для примера на рис. 1.41 приведена схема ковалентной иммобилизации пероксидазы, в которой глутаровый альдегид используется совместно с бензохиноном.

В качестве бифункциональных сшивающих реагентов применяются карбодиимиды и N-гидроксисукцинимид. Они образуют более прочные связи с белками, чем глутаровый альдегид, реагируют быстрее и не склонны к образованию олигомерных продуктов. Кросс-сшивку осуществляют также цианурхлоридом и его производными. В реакции замещения участвуют один или два из трех атомов хлора кольца.

Олигомеры также используются в качестве сшивающих реагентов. Например, для иммобилизации пероксидазы применяют гель, образующийся при взаимодействии полиаллиламина, содержащего бипиридинный комплекс  $\text{Os}^{2+}$  как медиатор электронного переноса, с эпоксидными концевыми группами полиэтиленгликоля на поверхности электрода:





Вариантом включения в полимерные пленки является *микрокапсулирование*. Главным его отличием является то, что в этом случае захватываются не отдельные молекулы, а микрочастицы, содержащие помимо биополимеров низкомолекулярные соединения, необходимые для их функционирования. Это позволяет несколько расширить перечень возможных материалов, применяемых для удержания биологических компонентов. Например, возможно использование растворов и суспензий полимеров в органических растворителях, которые при действии на чистый фермент (белок) оказывают инактивирующее действие. Таким образом удалось получить ферментосодержащие пленки нитрата и ацетата целлюлозы.

Микрокапсулирование биоконфонов осуществляют с помощью двойного эмульгирования, при котором предварительно получают эмульсии раствора полимера в органическом растворителе и биологического компонента в воде. После смешивания эмульсий раствор высушивают и получают мембрану, в которой полимерный носитель содержит микрокапсулы воды, содержащие биомолекулы и низкомолекулярные ионы электролитов на всех стадиях иммобилизации.

Включение биологических компонентов в полимерные слои позволяет получать мембраны, которые могут храниться и транспортироваться отдельно от сенсора. Это особенно удобно, если преобразователь сигнала биосенсора является технически сложным изделием или серийно выпускаемым датчиком, срок эксплуатации которого заведомо превышает время жизни иммобилизованных биомолекул. Обновление биослоя и рабочей поверхности электрода в этом случае достигается путем замены мембраны, накладываемой на электрод. Накладные мембраны сочетают также с дополнительными покровными мембранами, в том числе газодиффузионными (политетрафторэтилен, полипропилен, целлофан). Такие мембраны не только механически защищают электрод, но и обеспечивают селективность сигнала в отношении мешающих компонентов. Достоинством указанного подхода является возможность использования одного электрода в сочетании с различными мембранами, содержащими разные биоконфоновы. К недостаткам относятся большее время отклика, связанное с диффузионными факторами, а также погрешности, обусловленные заменой мембраны и ее фиксацией на поверхности преобразователя сигнала.

**Поверхностная иммобилизация.** Биополимеры (белки, ДНК) при адсорбционной иммобилизации удерживаются на электродной поверхности за счет электростатических, вандерваальсовых, ионных и водородных связей, которые достаточно слабы, но множественны (или кооперативны) и обеспечивают относительно прочное связывание биомолекул с электродом. При иммобилизации клеточных культур удержание клеток на специально подготов-

ленных поверхностях бывает настолько сильным, что зачастую удаление возможно лишь с их разрушением – лизисом.

Особое внимание при адсорбционной иммобилизации уделяют свойствам поверхности, на которой адсорбируется биологический компонент. Ее заряд, удельная площадь, функциональные поверхностные группы, их редокс-потенциал определяют не только количество удерживаемого биоматериала (поверхностную емкость электрода), но и его биохимические характеристики, в том числе и специфичность распознавания определяемого соединения. Адсорбция обычно не позволяет достичь высокой поверхностной концентрации биологических компонентов. Последние, как правило, имеют заряд и электростатически «выдавливают» избыток одноименнозаряженных биомолекул с поверхности электрода.

Предварительная обработка электродной поверхности с целью введения заряженных или полярных групп способствует адсорбции биоматериала. Для этого разработаны и применяются различные методы анодирования электродов и их модифицирования функционализирующими реагентами. Так, окисление золотых и углеродных электродов повышает емкость последних по отношению к заряженным молекулам белка, нуклеиновым кислотам и клеткам микроорганизмов. С той же целью применяют силилирующие реагенты и полиионные или ионообменные материалы, усиливающие электростатические взаимодействия и способствующие удерживанию противоположно заряженных биологических молекул на поверхности электрода.

Описана электростатическая иммобилизация нуклеиновых кислот и одноцепочечных олигонуклеотидов, удерживаемых на поверхности поляризованных стеклогуглеродных электродов. Несмотря на обратимый характер электростатической адсорбции, требующей постоянной поляризации электрода во время всех операций, результаты определения олигонуклеотидов оказались не хуже, чем при использовании более сложных вариантов ковалентной и аффинной иммобилизации. Мягкая иммобилизация за счет электростатических взаимодействий достигается, например, при использовании в качестве модификатора оксида  $Zr^{4+}$ , образующего ионные комплексы с олигонуклеотидами. Заметим, что последовательная обработка электрода реагентами может привести как к монослойному, так и полислойному заполнению поверхности.

Золотые электроды способны к самопроизвольному связыванию белков и тиолированных по концевым фрагментам олигонуклеотидов за счет образования связей  $Au-S$ . Такие процессы приводят к весьма прочному удерживанию биологических молекул. В некоторых случаях удается иммобилизовать не только сами белки, но и их отдельные фрагменты. Для этого используется предварительное окисление белков периодатом, расщепляющим дисульфидные мостики и окисляющим сахаридные поверхностные груп-

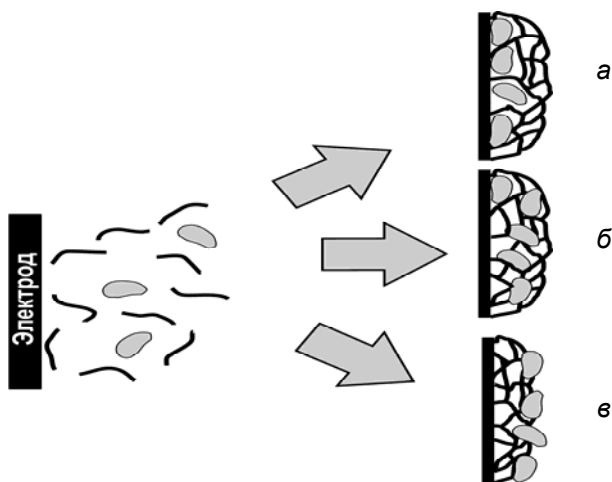
пы. В результате увеличивается число и реакционная способность функциональных групп белков, связывающихся с материалом электрода.

Естественное микроокружение фермента сохраняется и в липидных мембранах, по составу и свойствам близким к природным биологическим мембранам. Липидные мембраны используются в качестве моделей при изучении мембранных процессов и в качестве носителей белков и нуклеиновых кислот. Поскольку сами липидные мембраны имеют низкую механическую прочность, их наносят на поверхность инертных полимеров (ПВХ, тефлон), получая импрегнированные мембраны, или непосредственно на электрод. Ориентация биологических компонентов в искусственных липидных мембранах может отличаться от ориентации биоконпонентов, адсорбированных на твердой поверхности. Это способствует протеканию сопряженных реакций превращения субстратов в полиферментных или окислительно-восстановительных реакциях. Например, бромид дидодецилдиметиламмония, образующий пленку Ленгмюра–Блодже, обеспечивает прямой электронный перенос между электродом и гемом цитохрома P<sub>450</sub> из *Pseudomonas putida*. В результате генерируется биокаталитический ток, пропорциональный концентрации пероксида водорода.

Фотополимеризуемые полимерные мембраны получают нанесением на электрод гомогенной смеси мономеров и биологического компонента и подвергая затем ее УФ-облучению, инициирующему полимеризацию. По технологии этот способ аналогичен фотолитографическому способу получения поверхностных слоев, применяемому в микроэлектронной промышленности, что облегчает применение биоконпонентов в микроустройствах на основе полупроводниковых преобразователей сигнала. Считается, что УФ-инициирование полимеризации оказывает меньшее денатурирующее действие на биологические компоненты по сравнению с химическим инициированием.

Стабильность биологического компонента в процессе полимеризации и эксплуатации обеспечивается электростатическими и донорно-акцепторными взаимодействиями с функциональными группами полимера. Например, для стабилизации холинэстеразы, иммобилизованной в фотополимеризуемый замещенный поливиниловый спирт, в состав мономера дополнительно вводят пиридиновые заместители с сульфонатными группами. Фотополимеризация позволяет получать весьма тонкие покрытия, применение которых может потребовать дополнительных защитных слоев (диализных мембран, пористых мембранных фильтров и т. д.), компенсирующих недостаточную механическую прочность поверхностного биочувствительного слоя.

**Электрополимеризация.** Как уже отмечалось выше, электрополимеризация – достаточно простая и быстрая процедура, которая

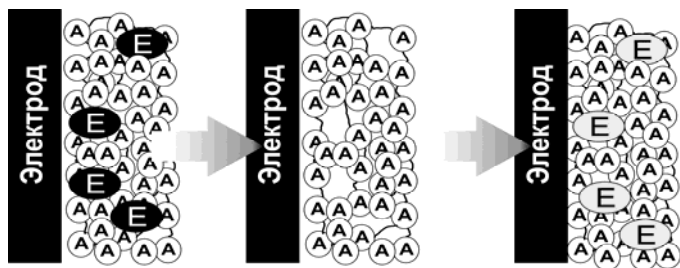


**Рис. 1.42.** Способы включения биоконпонентов в пленку полимера  
*а* – покрытие полимером адсорбированных молекул; *б* – равномерное распределение в объеме полимера; *в* – адсорбция на полимерном покрытии

позволяет контролировать толщину биочувствительного слоя изменением параметров электролиза. Она легко поддается автоматизации при массовом производстве и обеспечивает требуемые метрологические характеристики свойств образующегося покрытия.

В зависимости от условий электрополимеризации биологические компоненты могут располагаться под слоем полимера, во всем его объеме или на его поверхности (рис. 1.42). Наиболее распространенными способами иммобилизации являются захват биомолекул в растущую пленку полимера или их электростатическое удерживание на его заряженной поверхности. Кроме того, возможны ковалентная модификация мономеров (сшивка с биологическими компонентами) или пришивка биополимера к покрытию. Поверхностную иммобилизацию (ковалентную и электростатическую) можно проводить в условиях, отличающихся от условий электрополимеризации. Это позволяет уменьшить потери биопрепарата, поскольку электрополимеризацию часто проводят в присутствии сильных минеральных кислот, оказывающих денатурирующее действие на белки и нуклеиновые кислоты.

Денатурированные в процессе электрополимеризации белки удаляют из модифицирующего слоя полимера гидролизом в растворе соляной кислоты при ее достаточно высокой концентрации. После этого электрод выдерживают в растворе нативного фермента, замещающего поры удаленных молекул инактивированного фермента, повторяющие его размеры и форму (рис. 1.43). Такой способ напоминает метод изготовления полимерного слоя с «моле-



**Рис. 1.43.** Иммобилизация фермента (Е) в порах электрополимеризованного анилина (А) путем замены инактивированных при полимеризации молекул фермента

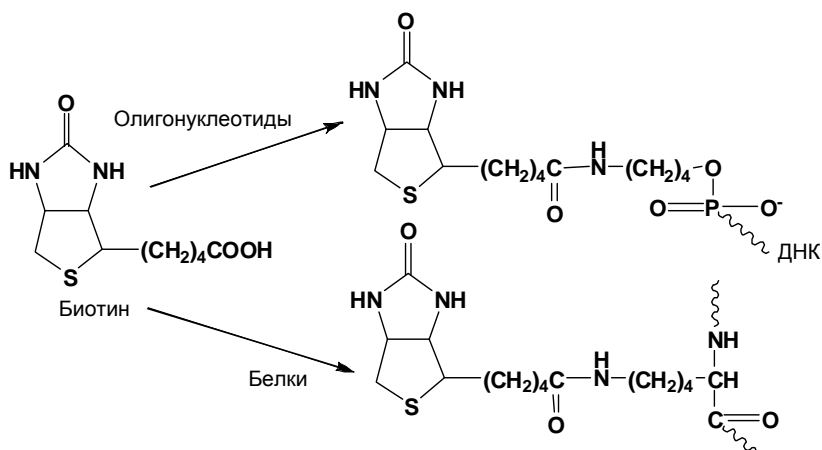
кулярными отпечатками» определяемого соединения, рассмотренный в разд. 1.2.3.

На стадии электрополимеризации при иммобилизации белков и нуклеиновых кислот в качестве медиаторов вводят *о*- и *м*-фенилендиамины, *п*-аминофенол, тионин, фенотиазиновые и феноксазиновые красители, пиррол, тиофен, анилин и их замещенные. В качестве заместителей в мономеры чаще всего вводят гидроксидные, карбоксильные и аминогруппы. Они обеспечивают требуемое гидрофильное микроокружение биоконпонентов и участвуют в ковалентном связывании молекул медиаторов электронного переноса. Этот же прием позволяет увеличить емкость поверхностного слоя полимера по отношению к биологическим компонентам. Так, при использовании в качестве мономеров пирролов с додецильными заместителями, содержащими четвертичные аммониевые основания, в поверхностном слое полимера можно иммобилизовать более 60 % фермента, присутствовавшего в растворе.

При проведении электрополимеризации предпочтение отдают мономерам, обладающим в полимерной форме электропроводностью, поскольку такие материалы выполняют функцию медиаторов электронного переноса, что улучшает отклик биосенсора за счет лучшего контакта электрода с активными центрами биомолекул и снижения перенапряжения. Большинство таких полимеров имеют положительный заряд и анионообменные свойства, что позволяет включать в слой полимера молекулы белков, глобулы которых заряжены отрицательно, а также нуклеиновые кислоты.

**Аффинная иммобилизация** – относительно новое направление в создании биосенсоров. В этом методе используются специфические взаимодействия между рецепторными участками природных биохимических компонентов. Несмотря на обратимый характер таких взаимодействий, называемых аффинными, прочность связывания, а главное специфичность взаимодействия обеспечивают надежное пространственно ориентированное закрепление биоконпонентов на поверхности электрода.

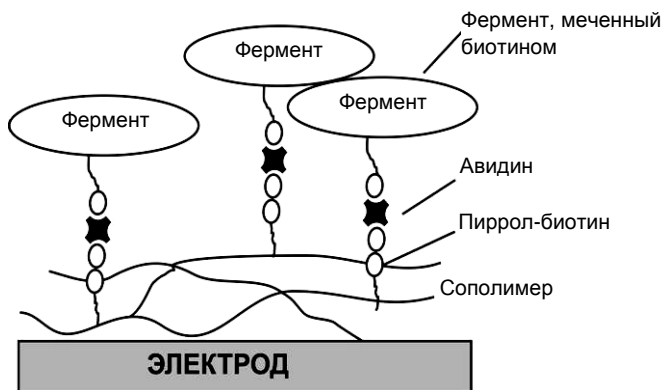




**Рис. 1.44.** Получение биотинированных биологических компонентов для аффинной иммобилизации

Один из наиболее распространенных способов аффинной иммобилизации – использование прочного (константа связывания  $\sim 10^{15}$ ) комплекса биотина с белками авидином или стрептавидином, которые имеют четыре потенциальных центра связывания, что позволяет использовать их в качестве своеобразного мостика для связи биокомпонента с электродом. Обычно биотин ковалентно пришивают к нерастворимому носителю, далее обрабатывают авидином (стрептавидином), после чего образовавшийся нерастворимый комплекс отмывают от избытка белка и обрабатывают исследуемым биопрепаратом. В настоящее время выпускаются коммерческие мембраны и носители, а также препараты ферментов, используемые в иммуноанализе, которые содержат в своем составе биотин. Примеры биотинирования белков и нуклеиновых кислот приведены на рис. 1.44.

Биотинирование белков чаще всего осуществляют путем присоединения карбоксильной группы биотина к остаткам лизина и других аминокислот. К олигонуклеотидам биотин присоединяют через терминальный фосфатный остаток с помощью промежуточного спейсера. Метод авидин-биотинового связывания сочетают с другими способами иммобилизации. Например, пирролсодержащие производные биотина совместно с незамещенным пирролом применяют для получения в условиях электрополимеризации поверхностной пленки, удерживающей через авидиновые мостики биотинированные белки и ферменты (рис. 1.45). Достоинство метода – универсальность способа функционализации. Используя один и тот же полимер, варьированием биотинированных компонентов можно получить различные электроды.



**Рис. 1.45.** Иммобилизация фермента с помощью авидин-биотинового связывания на электрополимеризованном покрытии

С помощью авидин-биотинового связывания можно также проводить иммобилизацию кофакторов. Модифицированный электрод обрабатывают апоферментом – белковой частью фермента. Вхождение иммобилизованного кофактора в состав апофермента приводит к восстановлению ферментативной активности и прочной пришивке реконструированного фермента к электроду. Такие ферментные системы получили название реконструированных.

При аффинной иммобилизации используются и другие белок-специфичные взаимодействия. Так, конканавалин А специфически связывается с маннозными остатками ферментов, обеспечивая иммобилизацию, не затрагивающую активного центра фермента. При создании иммуносенсоров часто применяют аффинную иммобилизацию антител на протеине А, обладающем высоким сродством к иммуноглобулинам G. В настоящее время выпускаются коммерческие препараты протеинов А, в том числе рекомбинантных, в сочетании с сорбентами для аффинной хроматографии или индикаторными ферментами для иммуноферментного анализа. Иммобилизация протеина А на поверхности электрода позволяет селективно накапливать антитела или их конъюгаты с ферментами, что обеспечивает селективный сигнал при иммунных взаимодействиях (определение специфических антигенов).

Конъюгаты антител и ферментов применяют для иммобилизации последних на носителях, модифицированных антигенами. С помощью такого подхода – стандартного приема в иммуноферментном анализе – можно модифицировать электрод сразу несколькими ферментами или, наоборот, получить локальные домены с иммобилизованными антителами против различных антигенов на одном носителе. Это открывает возможности для создания мульти-сенсорных устройств, а также миниатюрных сенсоров с автомати-

зированной процедурой иммобилизации специфичных биокomпонентов на микроэлектронных преобразователях сигнала.

К аффинной иммобилизации можно отнести также связывание гистидиновых остатков в аминокислотной последовательности белка с комплексами  $Ni^{2+}$ . Для этого к концевому аминокислотному фрагменту белка ковалентно присоединяют 4–6 гистидиновых фрагментов. В качестве носителя используют силикагель, модифицированный комплексом  $Ni^{2+}$  с N-нитрилотриуксусной кислотой. Далее силикагель закрепляют на поверхности электрода или вносят в угольную пасту. Аналогичным образом иммобилизуют ДНК или одноцепочечные олигонуклеотиды.

Особый интерес представляют способы иммобилизации одноклеточных микроорганизмов и включение в состав биосенсоров животных и растительных тканей. При создании микробных электродов применяют, как правило, диализные мембраны или микрореакторы на основе пористых стекол, агарозы, керамических и полиакриламидных носителей с микроорганизмами, удерживаемыми на поверхности или в порах в сорбированном виде. Для этого через носители пропускают суспензии клеток. Далее их отмывают от недостаточно прочно удерживаемых нежизнеспособных клеток микроорганизмов. Для иммобилизации клеток используют и мембраны, применяемые в измерительных устройствах, например тефлоновые или целлофановые мембраны кислородного электрода.

Разработаны УПЭ, содержащие в качестве одного из компонентов клеточные культуры. Операционные и механические характеристики таких электродов, как правило, уступают классическим УПЭ из-за высокого содержания воды в клетках. Интересно, что даже инактивированные клетки, не способные к делению, сохраняют определенную ферментативную активность в УПЭ. Например, термически инактивированные клетки используются в составе УПЭ для измерения концентрации этанола, окисляющегося под действием микробальной алкогольоксидазы. Конечно, время жизни такого микробного сенсора весьма невелико.

Второй по распространенности метод иммобилизации одноклеточных организмов – включение в гели на основе альгината кальция, коллагена, диатомитов и декстринов. Иммобилизация достигается суспендированием культуры клеток в растворе носителя с последующим желированием и формированием мембраны на гладкой поверхности (стекло, поверхность покровной мембраны преобразователя сигнала, сам электрод). Если включение в гель не обеспечивает постоянства характеристик мембраны (в результате набухания, частичного растворения и т. д.), операцию можно сочетать с последующей обработкой глутаровым альдегидом или другими сшивающими реагентами, упомянутыми выше.

Тканевые материалы обычно закрепляют в виде тонкого слоя на поверхности рабочего электрода. Иногда ткань вводят в пасту

УПЭ либо применяют для этих целей пористые угольные электроды. Например, введение тканей картофеля, грибов или баклажанов, содержащих полифенолоксидазу, в микропоры углеродного электрода позволяет получить электрод для определения пирокатехинов и катехоламинов.

Современное развитие биосенсорики позволяет подобрать подходящие методы иммобилизации практически для любых биологических компонентов. Выбор какого-то конкретного метода проводят исходя из многих факторов. Важнейшими среди них являются условия получения сигнала-отклика и требуемые операционные характеристики биосенсора. Не существует идеального метода иммобилизации, применимого для всех без исключения биоконпонентов в составе модифицирующего слоя. Так, адсорбция дает хорошие результаты при измерениях в неводных средах, но зачастую не обеспечивает требуемой воспроизводимости сигнала в водной среде из-за частичного смыва модифицирующего слоя с поверхности электрода. Ковалентное связывание стабилизирует третичную структуру биополимеров, но ограничивает подвижность отдельных звеньев молекул, что может привести, например, к снижению активности иммобилизованных ферментов или изменению специфичности связывания субстратов.

Для генерирования сигнала решающее значение имеют стерическая доступность активных центров биологических компонентов и способы сочетания электродных и биохимических процессов на преобразователе сигнала. Большее значение имеет проницаемость поверхностного слоя для низкомолекулярных соединений – субстратов, ионов индифферентного электролита и др. Важна также доступность для определяемых соединений и вспомогательных компонентов (медиаторов электронного переноса, кофакторов ферментов, стабилизаторов и др.) потенциальных центров связывания в биомолекулах. Эти параметры определяют время отклика электрода и сопротивление поверхностного слоя. В ряде случаев они могут влиять на электрохимическую обратимость электродного процесса и скорость переноса электрона. Важной характеристикой является устойчивость иммобилизованного биоматериала при многократных измерениях в стационарных условиях и в потоке.

Процесс иммобилизации всегда изменяет характеристики биохимической реакции, протекающей с участием иммобилизованного компонента. Часто ковалентная модификация, присутствие органических реагентов, в том числе носителя, ограничение доступа реагентов снижают эффективность биокаталитических процессов. Степень и характер этого влияния – предмет специального исследования, составная часть разработки и оптимизации конструкции биосенсора.

Очень часто иммобилизация раздвигает границы функционирования биохимических компонентов. Примером может служить

оригинальная разработка отечественных ученых, предложивших проводить иммобилизацию ряда ферментов в нафине, причем осаждение поверхностного слоя проводится из апротонного растворителя. Традиционно считается, что органические растворители подавляют ферментативную активность. Однако исследования показали, что в области малых концентраций воды воздействие растворителей на фермент обратимо. Этим способом получены новые модифицирующие материалы и на их основе разработаны ферментные сенсоры для измерения концентрации глюкозы.

Иммобилизация повышает также термическую стабильность белков, их устойчивость к действию денатурирующих реагентов и ионизирующего излучения. Варьируя природу и толщину слоя носителя, способ физического или ковалентного связывания биологического компонента, можно влиять также на параметры устойчивости биосенсора, дрейф сигнала при периодическом или непрерывном измерении, чувствительность и селективность измерений в объектах сложного состава. Все это делает процедуру иммобилизации биоконпонентов неотъемлемой частью развития электрохимического анализа, теоретических и практических аспектов биосенсорики.

## Глава 2

# Формирование сигнала-отклика на модифицированных электродах

Поведение модифицированных электродов в растворах и их отклик на определяемое вещество по сравнению с обычными электродами заслуживают особого рассмотрения, поскольку амперометрический сигнал на таких электродах в общем случае зависит от их конструкции и области применения, а также от условий регистрации. К настоящему времени накоплен большой объем информации, поэтому обсуждение всех особенностей поведения модифицированных электродов довольно затруднительно. Ниже будут рассмотрены лишь наиболее важные результаты исследований в этой области и основные направления практического применения модифицированных электродов.

### 2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Предпосылки для создания модифицированных электродов появились в 1920-х годах, когда был разработан первый универсальный преобразователь сигнала – стеклянный рН-метрический электрод, впоследствии составивший основу различных сенсоров. Однако импульсом в развитии исследований по модифицированным электродам послужили работы Кларка, предложившего кислородный электрод на основе платины, покрытой газопроницаемой мембраной, и применивший его впоследствии для измерения содержания глюкозы в крови (см. рис. 1.17, с. 67).

Для характеристики электродов служат общие для всех индикаторных (рабочих) электродов параметры: селективность, чувствительность, предел обнаружения, точность, время отклика, рабочий диапазон, срок эксплуатации и др. Среди них самой важной характеристикой является *селективность* – способность электрода реагировать только на определенное химическое вещество и не реагировать на все остальные, присутствующие в растворе. Обычно под селективностью понимают отношение концентраций определяемого вещества и мешающих компонентов, при которых это вещество может быть определено количественно. Следует заметить, что электроды, дающие отклик только на одно вещество, встречаются

очень редко. Проще создать электрод, отклик которого превышает отклики возможных примесей.

*Чувствительность* электрода характеризуется либо минимальной концентрацией определяемого вещества, либо его способностью реагировать на изменение концентрации последнего, которое можно зафиксировать количественно. На практике обычно проверяют отклик электрода на увеличение концентрации вещества, поскольку гораздо проще повысить его концентрацию в эталонном растворе, чем уменьшить ее. Кроме того, чувствительностью часто называют наклон линейной части концентрационной зависимости сигнала электрода (наклон градуировочного графика). Чем он больше, тем выше точность измерения концентрации вещества при заданной точности измерения сигнала-отклика.

Важно также знать достоверно определяемое с заданной доверительной вероятностью  $P$  нижнее значение концентрации  $C_{\min, P}$  определяемого вещества – *предел обнаружения*:

$$C_{\min, P} = \frac{y_{\lim} - y_{\phi}}{\alpha},$$

где  $y_{\lim}$  – предельно малое значение сигнала-отклика определяемого вещества, которое можно измерить достоверно;  $y_{\phi}$  – среднее значение этого параметра в фоновом растворе;  $\alpha$  – коэффициент чувствительности, характеризующий восприимчивость сигнала-отклика к изменению концентрации определяемого вещества.

Для нахождения  $y_{\lim}$  используют формулу

$$y_{\lim} = y_{\phi} + KS_{\phi},$$

где  $K$  – коэффициент, характеризующий доверительную вероятность;  $S_{\phi}$  – стандартное отклонение фонового сигнала. Коэффициент  $K$  может принимать значения 2, 3, 10 и выше (но обычно 3). Чем больше  $K$ , тем надежнее измерение концентрации определяемого вещества.

Таким образом,  $C_{\min, P}$  определяется не средним уровнем фонового сигнала  $y_{\phi}$ , а размахом колебаний последнего относительно среднего уровня, т. е. величиной  $S_{\phi}$ :

$$C_{\min, P} = \frac{KS_{\phi}}{\alpha}.$$

Для сопоставления возможностей модифицированных электродов иногда удобнее характеризовать их *нижней границей* определяемых концентраций  $C_n$ , которую можно определить по данной методике в конкретном объекте с заранее заданным относительным стандартным отклонением  $S_r$ . Существует несколько способов установления  $C_n$ . Чаще всего за  $C_n$  принимают ту минимальную

концентрацию, которая соответствует значению  $S_r = 0,33$ . За нее принимают также точку пересечения линейного участка градуировочной кривой и базовой линии, соответствующей области концентраций, в которой сигнал-отклик не наблюдается. С практической точки зрения важно знать, в каком диапазоне измеряемый сигнал линейно зависит от концентрации определяемого вещества (*рабочий диапазон*).

Заметим, что оценка аналитических возможностей различных электродов только по пределу обнаружения или по нижней границе определяемых концентраций не вполне однозначна, поскольку при этом не учитывается такой важный параметр, как время измерения  $t_n$ , увеличивая которое за счет  $N$ -кратного повторения измерений можно заметно снизить  $C_{\min, p}$  или  $C_n$ . Это обстоятельство следует учитывать еще и потому, что в большинстве современных приборов предусмотрен режим многократного получения и усреднения сигнала. Если, например, два электрода при единичном измерении имеют равные пределы обнаружения  $C_{\min 1}$  и  $C_{\min 2}$ , но при этом  $t_{n2} = N t_{n1}$ , то  $C_{\min 1}$  будет в  $\sqrt{N}$  раз меньше, чем  $C_{\min 2}$ .

В связи с этим в качестве параметра, характеризующего чувствительность электродов, целесообразно использовать произведение  $C_{\min}$  на  $t_n^{1/2}$  при единичном измерении. Поскольку при  $N$ -кратном измерении  $(t_n)_N = N t_n$ , а  $(C_{\min})_N = C_{\min} \sqrt{N}$ , то

$$C_{\min} t_n^{1/2} = (C_{\min})_N (t_n)_N^{1/2} \approx \text{const} = G_{\min}.$$

Величина  $G_{\min}$ , не зависящая от числа измерений  $N$ , по смыслу является *обобщенным пределом обнаружения*, который характеризует возможности электрода. Чем меньше  $G_{\min}$ , тем меньшие концентрации можно определить с помощью данного электрода в течение заданного времени.

На величину предела обнаружения оказывают влияние состав анализируемого раствора, способ получения модифицирующего слоя, физические параметры окружающей электрод среды (например, температура раствора) и др. Установить, какой из факторов является основным, достаточно сложно. Для этого требуются дополнительные исследования.

В реальных условиях применяемые для измерений электроды должны иметь достаточно короткое *время отклика*. Это время, необходимое для достижения постоянного сигнала электрода при внесении его в анализируемый раствор. Время отклика зависит как от характеристик измерительной аппаратуры, так и от особенностей процессов, протекающих на границе между поверхностным чувствительным слоем электрода и раствором. Совершенствование конструкции электрода и оптимизация условий нанесения модифицирующего покрытия преследуют помимо прочего задачу минимизации времени отклика.



Электрод характеризуется также *временем регенерации* – временем возвращения электрода в исходное состояние после контакта с анализируемым раствором. Суммирование времени отклика и времени регенерации дает *продолжительность измерения*.

В зависимости от конструкции электрода и состава поверхностного слоя время отклика и продолжительность измерения меняются. Так, для модифицированных электродов, содержащих медиаторы электронного переноса, время отклика составляет несколько секунд. Нанесение на электрод более сложных слоев, включающих полимерные компоненты, газопроницаемые мембраны, а также присутствие в конструкции внутренних растворов сравнения, полимерных электродов, газовых зазоров и т. п. увеличивают время отклика до десятков секунд и минут. Для электродов на основе ферментов, нуклеиновых кислот и антител время отклика обычно составляет минуты, а для микробных биосенсоров – 20 мин и более. Но это скорее исключение, чем правило. Исходя из общих соображений, приемлемое для практических целей время отклика составляет от десятков секунд до минуты.

Время эксплуатации (*время жизни*) электрода – это время, в течение которого электрод обеспечивает количественное определение вещества в пробах определенного состава. В отличие от физических сенсоров – датчиков температуры, влажности и т. п. – для модифицированных электродов постоянство градуировки – редко достижимый идеал, поскольку она довольно часто требует периодической проверки по стандартным растворам. Поэтому для оценки времени жизни (времени эксплуатации) электрода имеют значение только два параметра – диапазон определяемых концентраций и наклон концентрационной зависимости. Значение последнего параметра должно оставаться постоянным в течение всего периода эксплуатации или изменяться в фиксированных пределах. Так, для биосенсоров считается допустимым снижение наклона концентрационной зависимости в два раза.

Следует различать время жизни модифицирующего слоя и время эксплуатации электрода в целом. Например, эксплуатация кислородного электрода Кларка предполагает периодическую замену газопроницаемой мембраны, прилагаемой производителем с инструкцией по ее замене. Поэтому время эксплуатации мембраны существенно меньше, чем время эксплуатации электрода. Замена конструктивных элементов практикуется в тех случаях, когда устройство достаточно сложное и его полная замена при выходе из строя отдельных элементов нерентабельна. В современных электрохимических сенсорах, в которых широко используются интегральные электронные элементы, замена отдельных компонентов пользователем не предусматривается. В этом случае время жизни элементов и время эксплуатации электрода совпадают.

Важная характеристика электрода – *устойчивость сигнала*. Ее рассматривают в различных аспектах. Часто устойчивость сигнала характеризуют дрейфом – изменением сигнала в одном направлении в серии последовательных измерений, проводимых как в фоновом растворе, так и в стандартных растворах определяемого вещества. Если электрод предназначен для периодических измерений (в цикле измерение-регенерация), мерой устойчивости сигнала может служить метрологическая характеристика – погрешность, т. е. отклонение от среднего в серии измерений. В этом случае устойчивость сигнала характеризует достоверность полученных данных. Для характеристики устойчивости сигнала в последнее время используют термин *робастность* (надежность) электрода. Поэтому при обсуждении параметров электродов всегда необходимо указывать, о каких характеристиках идет речь.

Любой электрод, в том числе и модифицированный, должен обеспечивать требуемые *точность* и *правильность* измерений. Это означает, что случайные ошибки не должны превышать границ доверительного интервала, а результат анализа должен быть воспроизводимым и близким к истинной величине. Особенно важно контролировать эти параметры в случае модифицирования электродов биоматериалами, поскольку различия в свойствах отдельных партий биоматериалов могут быть причиной систематических ошибок. Для биологических материалов данные параллельных измерений могут отличаться от нормального распределения, что требует использования нестандартных способов оценки метрологических характеристик электродов.

Построение градуировочных графиков по серии стандартных растворов определяемого вещества позволяет установить диапазон концентраций, соответствующий линейной области. Поскольку линейная аппроксимация полученных данных предпочтительна как с точки зрения метрологической оценки, так и минимизации погрешности при заданном числе измерений, используются различные приемы, позволяющие расширить линейную область. Для этого концентрационные зависимости преобразуют в других координатах (так называемые *анаморфозы*), позволяющих перейти от интегральных к дифференциальным функциям и др. В совокупности такие приемы называются методами линеаризации градуировочных зависимостей. Расчет параметров линейной части графика по методу наименьших квадратов позволяет установить как наклон зависимости, характеризующий чувствительность, так и минимальную и максимальную определяемые концентрации. Следует заметить, что все математические процедуры обработки сигнала применимы и к нелинейным аппроксимациям. Однако в последнем случае требуется больше данных для подбора аппроксимирующей функции и достижения необходимой точности измерений. Если

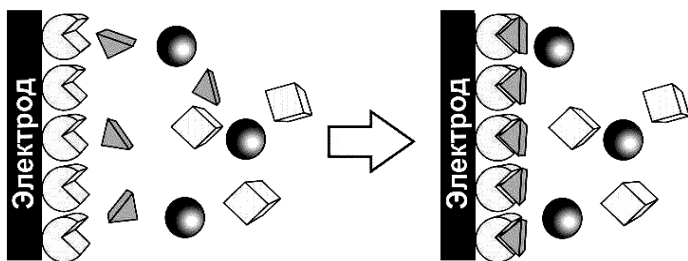
тщательно поддерживать постоянство условий регистрации аналитического сигнала, то это требование вполне выполнимо.

Во многих случаях можно обойтись без построения градуировочной кривой, а использовать *метод стандартной добавки* или многократных стандартных добавок, либо так называемый метод Грана. В методе стандартной добавки концентрацию вещества находят путем добавления в раствор аликвотной части стандартного раствора, содержащего определяемый компонент. При этом сначала измеряют величину сигнала-отклика  $y_x$  в анализируемом растворе, а затем регистрируют его изменение  $y_{(x+\Delta x)} - y_x$  как функцию изменения концентрации  $\Delta C$  при добавлении к этому раствору стандартного раствора определяемого вещества. Число молей последнего в добавке должно быть близко к числу молей этого вещества в анализируемом растворе, чтобы повысить его концентрацию приблизительно вдвое. Концентрацию определяемого вещества  $C_x$  рассчитывают по формуле

$$C_x = \Delta C \frac{y_x}{y_{(x+\Delta x)} - y_x}.$$

Существуют различные приемы, минимизирующие погрешность определений. Один из них – введение в анализируемый раствор нескольких добавок и построение графика зависимости отклика электрода от прироста концентрации. Неизвестную концентрацию  $C_x$  определяют как точку пересечения полученной прямой с осью абсцисс. Этот способ превосходит по точности и воспроизводимости метод однократной добавки, но трудоемок.

Современные электроаналитические приборы способны хранить в памяти значения откликов, полученных для градуировочных растворов, сравнивая их со значениями для анализируемого раствора, и рассчитывать концентрацию определяемого вещества по заданному алгоритму с выдачей ее на дисплей прибора. Такие приборы позволяют своевременно выявлять и устранять грубые погрешности, корректировать наклон градуировочного графика, а также учитывать поправку холостого опыта. В более сложных измерениях, требующих повышенной точности, применяют компьютеры, контролирующие алгоритм собственно аналитического определения и обрабатывающие полученные данные. На экране дисплея можно отобразить также функцию погрешностей, по виду которой судят об отклонении градуировочного графика от прямолинейной зависимости и выбирают те его участки, которые наиболее близки к линейности. Следует помнить, что автоматизация количественных измерений с использованием алгоритмов, жестко заданных в программе управления прибора, требует определенных навыков оператора. В частности, необходимо отслеживать форму сигнала, его разрешение, способ обработки, в некоторых случаях –



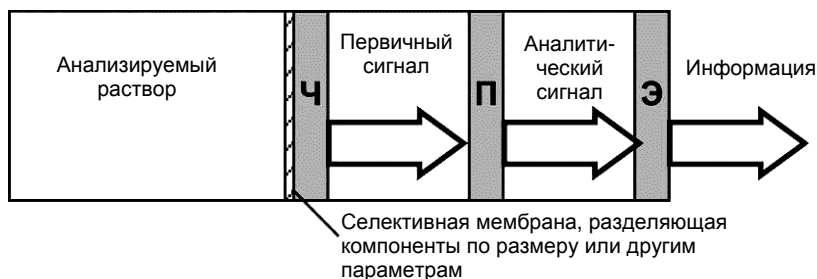
**Рис. 2.1.** Принцип действия электрода с биохимическим распознающим элементом

наклон базовой линии в непосредственной близости от сигнала и др. Наличие примесей, в том числе электрохимически активных, способно в заметной степени изменить параметры вольтамперограмм, причем неодинаково в разных диапазонах концентраций определяемого соединения. Все это влияет на результаты математической обработки вольтамперограмм, а значит, и на точность измерений с помощью градуировочного графика или метода добавок.

Для получения точных и воспроизводимых результатов первостепенное значение имеет постоянство условий эксперимента в серии измерений, выполняемых для построения градуировочного графика и последующего анализа раствора неизвестного состава. В каждом конкретном случае оно достигается путем выбора оптимальных условий на всех стадиях, начиная от подготовки пробы и кончая обработкой полученных данных.

Поскольку электрод передает информацию о содержании определяемого вещества в растворе, очевидным является тот факт, что передача этой информации связана с передачей энергии. При этом необходимо различать электрод и преобразователь (*транзьюсер*) физических или химических изменений на электроде в сигнал-отклик. В модифицированных электродах в качестве аналитического сигнала обычно служит электрический сигнал, величина которого является функцией концентрации определяемого вещества.

Среди электрохимических транзьюсеров выделяют три основных типа: потенциметрические, вольтамперометрические и кондуктометрические. Полевые транзисторы обычно рассматривают как вариант потенциметрических сенсоров, поскольку формирование сигнала в них не связано с фарадеевскими процессами. В то же время для функционирования полевых транзисторов в отличие от «классических» ион-селективных электродов необходим источник управляющего сигнала, причем в ряде схем измеряется постоянноточковый сигнал, как в амперометрических сенсорах. К кондуктометрическим системам относятся электроды, для которых измеряют характеристики электрохимического импеданса.



**Рис. 2.2.** Схема работы электрохимического сенсора

Ч – чувствительный (модифицирующий) слой; П – преобразователь сигнала (транзьюсер); Э – электронный (регистрирующий) блок

Кроме транзьюсера электрод должен содержать также *распознающий элемент*, определяющий его способность селективно реагировать на один или несколько компонентов среди множества других веществ (рис. 2.1), а также устройство для передачи тем или иным способом сигнала-отклика.

В настоящее время вместо термина «электрод» все чаще используют термин «сенсор» (рис. 2.2). В общем случае *сенсор* – это устройство, дающее прямую информацию о составе окружающей его среды в непрерывном режиме и с малым временем отклика. Он может работать как в лаборатории, в режиме off-line, так и внутри установки, в режиме on-line, и быть встроен в системы накопления или отображения информации, а также оповещения и даже ликвидации аварийных ситуаций. Многие сенсоры могут работать автономно, т. е. без вмешательства человека. Из вышесказанного следует, что к сенсорам можно отнести модифицированные электроды, не требующие специализированных стадий измерения, таких как концентрирование, химическая или физико-химическая обработка пробы, смена растворов и т. д., в которых процесс взаимодействия компонентов пробы с модифицирующим слоем и генерирование сигнала совмещены во времени и пространстве.

Более сложные устройства, включающие сенсоры, – *сенсорные анализаторы*. Это полноценные приборы, предназначенные для определения какого-либо вещества в определенном диапазоне его концентраций, иногда в определенном объекте контроля. Помимо сенсоров такие приборы могут включать стационарные или проточные ячейки, дополнительные смесители, устройства дозирования, магистрали для подачи пробы и реагентов, их разбавления и смешения. Обработка данных измерений может проводиться микропроцессорами, встроенными в них, с поправками на температуру, электропроводность, с возможностью сохранения градуировок и результатов измерений в стандартных растворах. Сенсорные анализаторы, как правило, специализированы под достаточно узкий

круг задач, что находит отражение в особенностях программного обеспечения, заложенных алгоритмах обработки результатов измерений и аппаратурных способах минимизации мешающего влияния компонентов пробы. Высокая специализация сенсорных анализаторов снижает требования к квалификации обслуживающего персонала, особенно в части пробоподготовки и собственно измерения. Однако следует помнить, что это не универсальные приборы. Возможности внешнего воздействия на режимы измерения в сенсорных анализаторах весьма ограничены. Это же касается и компьютерной обработки данных.

Универсальные анализаторы имеют, как правило, специализированное программное обеспечение, позволяющее выполнять сложную математическую обработку измерительной информации с помощью методов хеометрики. Они включают не только нелинейные методы статистической оценки результатов, но и алгоритмы многопараметрической обработки данных, включая методы распознавания образов, многофакторный анализ, искусственные нейронные сети. Последние необходимы при работе с группой сенсоров, обладающих различными характеристиками чувствительности и селективности сигнала. Анализ полученного массива данных и его сопоставление с результатами измерений в растворах стандартных образцов позволяет решать более сложные задачи, выходящие за рамки традиционного химического анализа. Это построение эмпирических моделей отклика с выявлением факторов, влияющих на параметры модели, определение компонентного состава в условиях отсутствия или неполного разделения сигналов отдельных компонентов, решение задач экспертной оценки, при которой объекты анализа классифицируют в соответствии с критериями качества. Примерами таких задач может служить контроль качества продуктов питания для выявления контрафактной продукции, анализ сточных и технологических вод для установления их потенциальной опасности (токсичности), задачи фармакокинетики, медицинской диагностики, криминалистики и ряд других. Некоторые из таких систем на основе потенциометрических сенсоров под названием «электронный нос» выпускаются промышленностью для контроля газовой фазы. Аналогичный им «электронный язык» для контроля жидкостей может содержать как потенциометрические, так и амперометрические сенсоры.

По характеру взаимодействия с исследуемыми объектами сенсорные анализаторы подразделяются на пассивные и активные. Первые только воспринимают информацию об объекте, вторые же, воздействуя на объект через специальные устройства, позволяют автоматически изменять его параметры. Активные сенсорные системы широко применяются в научных исследованиях.

Наряду с сенсорами для контроля физических параметров применяются *датчики* – устройства, воспринимающие внешние

воздействия и реагирующие на них изменением электрических сигналов. Назначение датчиков – реакция на физическое воздействие и преобразование его в электрический сигнал. Другими словами, датчик – это преобразователь физической величины (часто не электрической) в электрический сигнал.

## 2.2. ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОДАХ

Как отмечалось выше, далеко не все вещества проявляют электрохимическую активность в доступной области потенциалов. Кроме того, электродные реакции многих из них протекают с большим перенапряжением с образованием необратимых, плохо выраженных поляризационных кривых. Поэтому усилия исследователей направлены на разработку таких электродов, которые обеспечивают условия обратимого восстановления (окисления) определяемых веществ в доступной области потенциалов. Один из подходов к решению проблемы – использование посредников (*медиаторов*), облегчающих перенос электрона с электрода на деполаризатор (или наоборот). Схема процесса приведена на рис. 2.3.

Частицы  $A$  и  $A^*$  являются компонентами обратимой редокс-системы, способными к последующей химической реакции с субстратом  $S$ . Это обстоятельство позволяет исключить или уменьшить влияние таких факторов, как определенная ориентация электроактивного вещества к поверхности электрода, воздействие поля последнего, шероховатости, чистоты поверхности и т. д. При этом в электрохимическую реакцию вовлекаются вещества, которые не реагируют при потенциале  $E_{A/A^*}$ . Кроме того, в присутствии медиатора остаточный ток имеет меньшую величину, чем при восстановлении (окислении)  $S$  в отсутствие медиатора. Отношение сигнал/шум возрастает, а значит увеличивается чувствительность определений.

Следует заметить, что при записи полной вольт-амперной кривой пара сопряженных пиков окисления-восстановления медиатора  $A/A^*$  предшествует по потенциалам пику прямого (немедиатор-

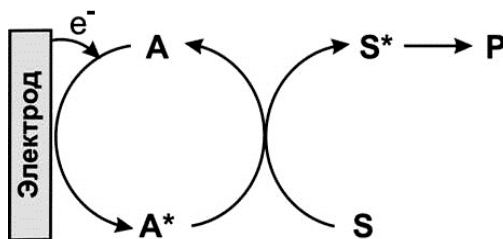
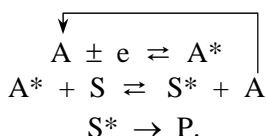


Рис. 2.3. Схема электродной реакции с участием медиатора электронного переноса  $A$

ного) превращения анализируемого вещества на электроде. В некоторых случаях этот пик может отсутствовать, если эффективность медиатора настолько высока, что все определяемое вещество реагирует только с ним и не участвует в обмене электронов с электродом. Поскольку в ходе реакции, представленной на рис. 2.3, изменяется отношение стационарных концентраций медиатора  $A/A^*$  по сравнению с раствором в отсутствие субстрата  $S$ , симметричный изначально катодно-анодный сигнал медиатора становится несимметричным с преобладанием тока регенерации активной формы медиатора, как это показано на схеме



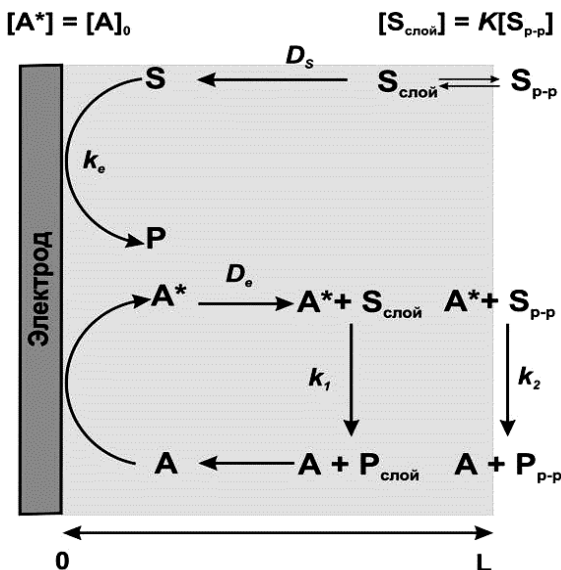
Экспериментально наблюдаемый прирост тока активной формы  $A$  в присутствии субстрата  $S$  по сравнению с током  $A$  в его отсутствие является аналитическим сигналом определяемого вещества. По своей природе он является каталитическим током, подчиняющимся общим закономерностям поведения каталитических токов в вольтамперометрии. В предельном случае, когда скорость обмена электроном между  $A^*$  и  $S$  высока, сигнал медиатора становится формально необратимым, поскольку в процессе превращения  $A^*$  в  $A$  преобладает химическая стадия.

Для рационального проектирования электродов, модифицированных медиаторами, необходимо знать, каковы, во-первых, механизм и кинетика соответствующих окислительно-восстановительных реакций и, во-вторых, – электрохимические свойства медиаторов. Кроме того, необходимо иметь представления о свойствах модифицированных электродов. Только тогда можно с уверенностью предсказать влияние модификатора на кинетику и термодинамику редокс-реакций с его участием.

На рис. 2.4 в общем виде представлена модель модифицированного электрода. В этой модели предполагается наличие медиаторной пары  $A/A^*$ , иммобилизованной равномерно в слое толщиной  $L$  на поверхности электрода. Медиатор реагирует с присутствующим в растворе субстратом  $S$ , в результате чего образуется продукт  $P$ . Затем медиатор электрохимически восстанавливается (окисляется) и форма  $A^*$  реагирует с еще одной молекулой субстрата и т. д. Величины констант скоростей этих реакций определяют характеристики электрода в целом.

Протекающие на электроде процессы весьма разнообразны; здесь проявляются транспортные стадии и редокс-реакции, любая из которых может лимитировать скорость электродного процесса. Следует заметить, что скорость переноса электрона через границу





**Рис. 2.4.** Обобщенная модель модифицированного электрода

$k_e$  – константа скорости переноса электрона на поверхности электрода;  $k_1$  – константа скорости редокс-реакции с медиатором в пленке;  $k_2$  – константа скорости редокс-реакции с медиатором на поверхности;  $K$  – константа распределения субстрата в пленке

раздела поверхность электрода/слой модификатора достаточно велика и зависит от потенциала электрода. В переносе электронов от электрода к деполаризатору внутри слоя участвуют центры  $A$  и  $A^*$ . Частично скорость переноса заряда связана также с диффузией молекул субстрата  $S$  внутри слоя или с движением ионов, если в состав модифицирующего слоя входит ионообменник. Перенос электронов может происходить и по проводящей цепи полимера, например поливинилферроцена или политиофена. Коэффициент диффузии  $D_e$  характеризует суммарную скорость движения электрона в слое модификатора.

Для протекания реакции в модифицирующем слое субстрат должен проникнуть в этот слой и диффундировать в нем. Поведение субстрата в слое характеризуется константой распределения  $K$  и коэффициентом диффузии  $D_s$ . При этом возможно протекание трех типов редокс-реакций, каждая из которых характеризуется своей константой скорости. Первый тип – реакция субстрата с медиатором на внешней стороне модифицирующего слоя (константа скорости  $k_2$ ). Второй – та же реакция внутри слоя ( $k_1$ ). И наконец, редокс-реакция может протекать непосредственно на поверхности электрода без участия медиатора ( $k_e$ ). Различие между первыми

двумя случаями обусловлено различиями в сольватации частиц на поверхности и внутри слоя, а также специфическими взаимодействиями с компонентами модифицирующего слоя. Если субстрат представляет собой достаточно сложную молекулу, например, органическое вещество с несколькими функциональными группами или потенциальными редокс-центрами, различие в скорости переноса электрона может быть обусловлено требованиями определенной взаимной ориентации медиатора и субстрата. При этом матрица модификатора может как способствовать, так и мешать достижению указанной ориентации.

Внутри модифицирующего слоя могут протекать два процесса. Первый из них характеризует превращение  $A$  в  $A^*$  и перемещение последнего к границе раздела слой модификатора/раствор ( $D_e$ ). Второй процесс соответствует переходу субстрата  $S$  в модифицирующий слой из раствора и его диффузии в нем ( $D_s$ ). Превращение  $S$  в продукт реакции  $P$  происходит тогда, когда субстрат и медиатор встречаются внутри слоя. Область, где это происходит, называется реакционной зоной. Расположение реакционной зоны и ее толщина определяются скоростью переноса обеих частиц в слое и скоростью редокс-реакции. Если скорость переноса электронов в слое модификатора значительно выше, чем скорость диффузии субстрата ( $D_e \gg D_s$ ), то реакция протекает вблизи границы раздела слой модификатора/раствор. Если же, наоборот, субстрат диффундирует через слой модификатора значительно быстрее, чем переносится электрон ( $D_e \ll D_s$ ), то реакционная зона располагается вблизи границы раздела электрод/слой модификатора.

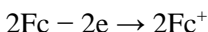
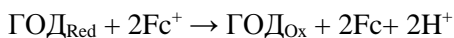
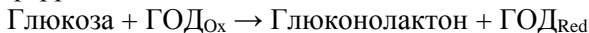
Теоретически возможен случай, когда концентрация компонентов окислительно-восстановительных превращений изменяется и за пределами модифицирующего слоя. Это происходит, если скорость превращения субстрата настолько велика, что толщина реакционной зоны становится больше толщины модифицирующего покрытия. В этом случае различают два варианта диффузионного контроля – внешний, когда скорость процесса определяется переносом субстрата к границе мембрана/раствор, и внутренний, когда концентрация субстрата за пределами модифицирующего слоя принимается постоянной, а внутри слоя она изменяется. Различить внутри- и внешнедиффузионный контроль можно с помощью дополнительного конвективного переноса субстрата. Если раствор перемешивать, то замедленность диффузии субстрата к границе поверхностный слой/раствор компенсируется. Это приводит к увеличению регистрируемого тока. Если же речь идет о внутридиффузионном контроле, перемешивание раствора не изменит скорости редокс-превращения определяемого вещества на электроде.

Для обычных макроэлектродов условия внешнедиффузионного контроля реализуются в том случае, когда толщина покрытия, содержащего медиатор, мала по сравнению с расстоянием, которое

проходит активная форма медиатора  $A^*$  до взаимодействия с субстратом  $S$ . В условиях стационарного состояния в мембране постоянно присутствует определенное количество  $A^*$ , а значит, концентрация  $S$  на внешней границе модифицирующего слоя будет отличаться от  $S_0$ .

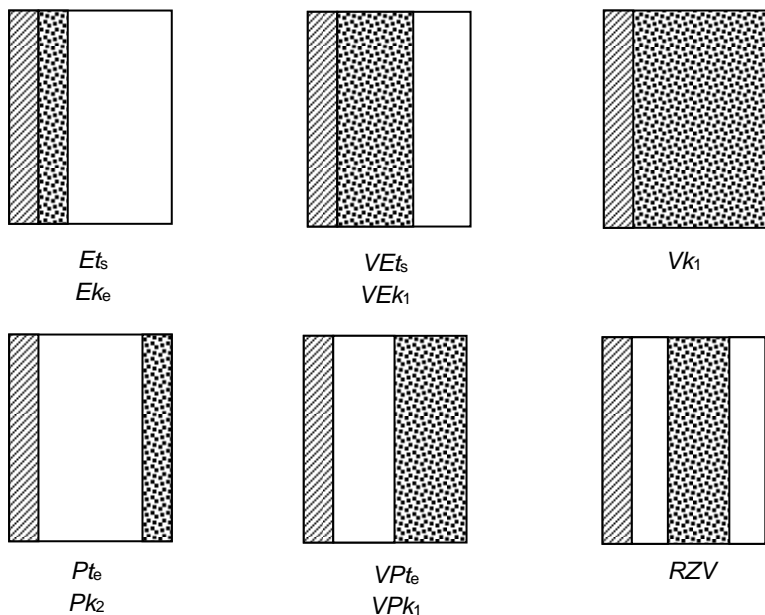
Поскольку модифицирующее покрытие по своим реологическим характеристикам значительно отличается от воды, коэффициенты диффузии субстрата и медиатора в мембране заведомо меньше, чем в водном растворе, что позволяет в большинстве случаев пренебрегать торможением процесса за счет медленной диффузии реагентов в растворе. Из этого в целом выполняющегося утверждения есть два важных исключения. Первое – реакция в микрогетерогенных условиях, когда субстрат и медиатор находятся в различных фазах в дисперсном состоянии. Это суспензии и эмульсии типа вода в масле, когда медиатор, не растворимый в воде, присутствует в органической фазе, а субстрат – в водной. Из-за высокого отношения площади поверхности раздела фаз к их объему внешнедиффузионный контроль электронного обмена становится скоростьюпределяющим. Сюда же относятся случаи использования высокопористых носителей, таких как ксерогели, пенополиуретан, силикагель и др. Явления массопереноса в таких системах достаточно подробно рассматриваются в хроматографии.

При существенном вкладе внешнедиффузионного контроля перенос электрона может потребовать введения в систему дополнительного водорастворимого медиатора электронного переноса, осуществляющего функции связующего между нерастворимым в воде медиатором и водорастворимым субстратом. К таким двойным медиаторным системам относится большинство ферментных электродов, включающих в качестве медиатора оксидоредуктазы. Последние необходимы для каталитического превращения субстрата, но скорость их прямого обмена электронами с электродом настолько мала, что для реализации замкнутого каталитического цикла требуется второй, неселективный, но высокоактивный медиатор. Примером может служить реакция окисления глюкозы, катализируемая глюкозооксидазой (ГОД). За скоростью процесса, а значит, и концентрацией субстрата – глюкозы – следят по току окисления ферроцена (Fc) в соответствии со схемой






Данная схема лежит в основе действия большинства коммерческих глюкометров.

Вторым примером является электрод, в котором медиатор переноса электрона электростатически или ковалентно связан с поверхностью преобразователя сигнала без дополнительного носите-



**Рис. 2.5.** Типы реакционных зон в пленке модификатора

$E$  – электрод;  $V$  – объем модификатора;  $P$  – поверхность модифицирующего слоя;  $VE$  – слой у электрода;  $VP$  – слой у поверхности модификатора;  $RZV$  – реакционная зона в объеме модификатора;  $t_s$  – перенос субстрата;  $t_e$  – перенос электрона;  – электрод;  – модификатор;  – реакционная зона

ля. При этом толщина реакционного слоя уменьшается до размера молекулы медиатора, так что каждая молекула субстрата, диффундирующая к электроду, вступает с ним в реакцию. В этом случае транспортные процессы не влияют на общую скорость реакции, что проявляется на форме вольтамперограмм медиатора и концентрационной зависимости сигнала.

Эффективным медиаторным процессом является такой процесс, в котором весь медиатор вовлечен в реакцию переноса электрона. Это трудно осуществимо и возможно лишь в тех случаях, когда электроды покрыты высокопористыми электропроводящими пленками толщиной 1 мкм или менее. Если медиатор иммобилизован в инертной матрице, диаметр пор поверхностного слоя должен быть не менее чем на порядок больше диаметра молекул субстрата, чтобы не создавать диффузионных ограничений транспорту последнего к медиатору.

При рассмотрении механизмов откликов модифицированных электродов можно выделить десять из них, обусловленных шестью возможными вариантами расположения реакционных зон в зависимости от места их локализации (рис. 2.5). В обозначениях меха-

низмов под рисунками прописные буквы указывают области локализации реакционных зон, а строчные – характеризуют природу скоростьопределяющих стадий. Так, например, комбинация  $VPt_e$  означает, что реакционная зона расположена вблизи поверхности модифицирующего слоя и ее толщина определяется транспортом электронов через этот слой. Если константа скорости реакции субстрата с субстратом  $k$  в слое модификатора равна нулю, то субстрат достигает поверхности электрода (реакционная зона  $Ek_e$ ), и наоборот, при большой величине  $k$  зона сужается до размеров слоя, в котором встречаются реагирующие частицы (тип  $RZV$ ).

Для реакционных зон, локализованных на поверхности модификатора (типы  $Pk_2$  и  $VPk_1$ ), различают два случая. В зоне, локализованной по типу  $Pk_2$ , имеет место гомогенная реакция, протекающая с высокой скоростью ( $k > 10^4$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>). При этом толщина модифицирующего слоя не имеет существенного значения. Однако его электропроводящие свойства зависят от толщины пленки. Поэтому при изготовлении ХМЭ лучше использовать тонкие покрытия или даже монослои модификатора. Зона  $VPk_1$  реализуется для толстых покрытий электрода. Поскольку концентрация электрокаталитических центров в слое намного превышает таковую в растворе, при достаточной скорости массопереноса субстрата в слое ( $D_s \sim 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с) константа скорости гомогенной реакции медиатора с субстратом в нем может быть заметно меньше, чем в растворе ( $k > 10$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>).

В качестве медиаторов электронного переноса обычно используются низкомолекулярные соединения, характеризующиеся большой подвижностью редокс-равновесия. Чаще всего это соли и комплексы переходных металлов, а также органические молекулы с системой сопряженных двойных связей, обеспечивающих стабилизацию окисленной формы медиатора, – хиноны, органические соли, красители и т. п. На сегодняшний день одним из лучших редокс-медиаторов является ферроцен –  $\eta^5$ -бис(циклопентадиенил)-железо, в молекуле которого ион  $Fe^{3+}$  заключен между двумя циклопентадиенильными кольцами с образованием так называемой «сэндвичевой» структуры. С электрохимической точки зрения ферроцен представляет собой классическую редокс-пару ( $E^\circ = 165$  мВ относительно НКЭ), на физические и химические свойства которой можно влиять введением заместителя в любое из колец молекулы (табл. 2.1).

Выбор медиатора представляет собой ответственную задачу, поскольку он определяет эффективность электрокатализа и операционные характеристики электрода. Существуют несколько критериев, которыми руководствуются при выборе медиатора.

*Термодинамический* – стандартный окислительно-восстановительный потенциал  $E^\circ$  медиатора должен обеспечивать термодинамически самопроизвольный перенос электрона в системе меди-

**Таблица 2.1. Редокс-потенциалы производных ферроцена и константы скорости переноса электрона на глюкозооксидазу**

Заместитель	$E^\circ$ , В	$k_s \cdot 10^{-5}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>
1,1'-Диметил	0,100	0,8
Ацетил	0,142	—
Незамещенный ферроцен	0,165	0,3
Амидопентиламидопиррол	0,200	2,07
Амидопропилпиррол	0,215	0,75
Винил	0,253	0,3
Монокарбоксилат	0,275	2,0
1,1'-Дикарбоксилат	0,290	0,3
Метилтриметиламин	0,387	5,3
Поливинил	0,435	—

атор/субстрат, т. е. данный критерий устанавливает необходимость отрицательного изменения свободной энергии в результате редокс-превращения. Перенос электронов в этом случае обусловлен уменьшением перенапряжения по сравнению с прямым электронным переносом. Облегчение окисления (восстановления) субстрата при взаимодействии с медиатором может быть вызвано целым рядом причин, среди которых чаще всего упоминают влияние на реакционную способность медиатора и субстрата энергий сольватации электрона и компонентов окислительно-восстановительной реакции, стерических факторов, двойного электрического слоя, взаимодействия с растворителем и компонентами раствора, облегчающее дальнейшее превращение продуктов электронного переноса. Главная проблема при использовании указанного критерия — отсутствие информации об истинных значениях  $E^\circ$  субстратов. Обычно руководствуются эмпирическим правилом: медиаторный перенос электрона возможен, если разность редокс-потенциалов превращения медиатора и субстрата не превышает 300–400 мВ. Для близких по природе и структуре медиаторов эффективность катализа растет с уменьшением  $\Delta E_{AS} = E_{S/S^*} - E_{A/A^*}$ .

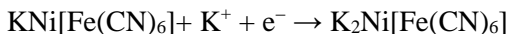
*Кинетический* — скорость переноса электрона в системе А/А\* должна быть выше, чем скорость переноса электрона в системе субстрат/электрод. Например, преимущества органических комплексов переходных металлов как медиаторов электронного переноса обусловлены, помимо прочего, еще и тем, что в отсутствие первичной гидратной оболочки окисление (восстановление) центрального иона протекает быстрее, нежели в виде аква-иона. Для того чтобы активность внутрисферных комплексов была высокой, в качестве лигандов выбирают соединения, способные к обратимому переносу электрона, — дипиридил, фенантролин и др. Скорость

переноса электрона выше, если число переносимых электронов для молекулы субстрата и медиатора одинаково. Последнее условие называют также правилом эквивалентности. Кинетический критерий указывает на предпочтительное превращение тех веществ, которые образуют неустойчивые промежуточные соединения  $S^*$ , т. е. тех, которые быстрее всего превращаются в продукт Р.

*Химический* – окисленная и восстановленная формы медиатора должны быть стабильны в условиях измерения и не вступать во взаимодействие с компонентами раствора, поверхностным слоем электрода, олигомеризоваться и т. д. На практике прежде всего следует учитывать возможность протекания реакций гидролиза катионов металлов и окисления органических медиаторов с участием молекулярного кислорода. Иммобилизация медиатора в составе поверхностного слоя снижает влияние конкурентных химических реакций вследствие диффузионных ограничений, но не исключает их полностью. Это ограничивает время жизни электрода и устойчивость его сигнала. Для подавления гидролиза в раствор вводят стабилизаторы, например лиганды малого объема, не мешающие обмену электронами атома металла с субстратом, – аммиак, цианиды, фториды. Особое внимание следует уделять кислотности среды. Многие медиаторы в процессе окисления в водной среде выделяют ионы водорода, а в процессе восстановления поглощают их. Вследствие этого их потенциал, а значит, и реакционная способность зависят от рН. Как правило, снижение рН увеличивает активность медиаторов-окислителей. Тем не менее зависимость потенциала медиатора от рН считается скорее недостатком, чем достоинством. Это связано с тем, что изменение рН в ближайшем окружении медиатора достаточно трудно контролировать даже в буферных средах. Гидролиз ионов металлов, адсорбция белков, частиц глины и других природных компонентов проб, имеющих собственные буферные свойства, изменение ионной силы раствора, ионизация функциональных групп полимерной матрицы приводят к изменению рН, а значит, и активности медиатора. Это оказывает неблагоприятное влияние на селективность катализируемой реакции и сигнал электрода. Зависимость от рН редокс-потенциала медиатора накладывает ограничения на условия функционирования электрода, а также на природу субстратов и их редокс-реакций. Последнее наиболее очевидно для органических медиаторов и субстратов, участвующих в реальных биохимических процессах. Например, уже упоминавшаяся реакция ферментативного окисления глюкозы сопровождается переносом двух ионов водорода на каждую молекулу субстрата.

Несколько реже встречаются ограничения, связанные с переносом других ионов. Например, редокс-активность берлинской лазури и других металлоцианатов зависит от присутствия ионов калия. Это свойство используется для определения содержания по-

следних в биодизельном топливе с помощью электрода, модифицированного смешанным ферроцианидом никеля-калия. Сопреженный ток реакции



зависит от концентрации ионов калия в диапазоне от  $4 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. По той же причине определение биохимических компонентов в ферментативных реакциях с помощью электродов, модифицированных металлоцианатами, рекомендуется проводить при постоянной концентрации ионов калия.

В общем, протекание медиаторных реакций возможно при соблюдении следующих условий:

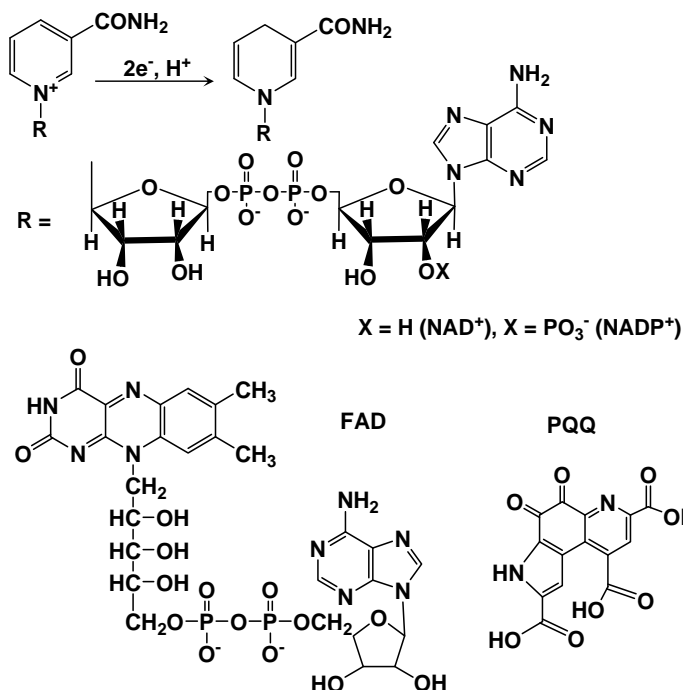
- окисление или восстановление субстрата должно протекать термодинамически обратимо;
- скорость реакции, приводящей к образованию конечных продуктов, должна быть достаточно высокой, так что активная форма медиатора не должна исчезать в конкурентных реакциях;
- поток вещества в зону электродной реакции, как правило, должен определяться скоростью диффузии.

Механизм реакции  $\text{A}^* + \text{S} \rightleftharpoons \text{A} + \text{S}^*$  может быть различным. Если редокс-пара  $\text{A}/\text{A}^*$  выполняет только функцию переносчика электронов, то имеют дело с редокс-катализом или с гомомедиаторной системой. В этом случае обмен электронами между  $\text{A}^*$  и  $\text{S}$  происходит по внешнесферному механизму. Если же в ходе реакции медиатор связывает субстрат в аддукт  $\text{A}^*\text{S}$ , который затем распадается с регенерацией  $\text{A}$ , то имеют дело с химическим катализом или с гетеромедиаторной системой. В этом случае перенос электрона, как правило, осуществляется по внутрисферному механизму.

Электрокатализ на химически модифицированных электродах в настоящее время применяется для определения многих неорганических и органических веществ. В основном такие электроды используются для определения биологически активных соединений – лекарственных препаратов, витаминов, сахаров, пестицидов, органических токсикантов и др. Другая причина интереса – химические источники тока, включая мини-реакторы, работающие на принципах электрокатализа.

Применение медиаторов – универсальный способ получения сигнала-отклика в ферментных биосенсорах, поскольку в обычных условиях многие белки не проявляют электрохимической активности даже при наличии в молекулах потенциальных центров редокс-превращений. Существуют три различных объяснения этого факта. Во-первых, белок может необратимо адсорбироваться на электроде, препятствуя переносу электрона. Во-вторых, перенос электрона



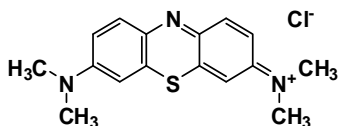


**Рис. 2.6.** Кофакторы, применяемые в ферментных электродах

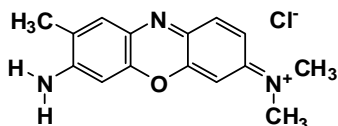
от электроактивного центра может быть стерически затруднен. И, в-третьих, отсутствие тока может быть обусловлено низкими коэффициентами диффузии белковых молекул.

В большинстве случаев применение медиаторов позволяет снизить перенапряжение переноса заряда и повысить обратимость электродного процесса. В частности, они применяются в электрокаталитических реакциях регенерации активных форм кофакторов – никотинамиддинуклеотида (NADH), флавинаденидинуклеотида (FADH<sub>2</sub>), пирролохинолинихинона (PQQ) и др. (рис. 2.6). Известны более 250 оксидоредуктаз, за превращениями которых можно следить электрохимически по редокс-реакции NADH.

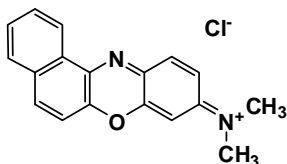
В обычных условиях электроокисление NADH протекает с трудом, причем продукты реакции адсорбируются на электроде. Для этой системы предпринимались многочисленные попытки модифицирования электродов тепловой обработкой, внедрением в поверхностный слой частиц металла, прикреплением органических модификаторов. Так, адсорбция на графите 7-диметиламино-1,2-бензфеноксазина способствует более легкому переносу электрона с участием NADH благодаря образованию комплексов с переносом заряда. Однако большинство кофакторов не дают сигналов окисле-



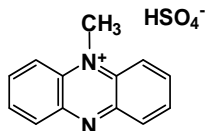
Метиленовый синий



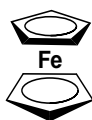
Толуидиновый синий



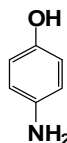
Мелдоло синяя



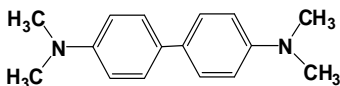
Феназинметосульфат



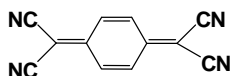
Ферроцен



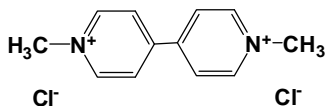
*p*-Аминофенол



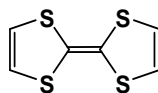
Тетраметилбензидин



Тетрацианохинодиметан



Метилвиологен



Тетратиафульвален

**Рис. 2.7.** Медиаторы электронного переноса, применяемые в ферментных электродах

ния (восстановления) на твердых электродах либо перенос электрона происходит необратимо, что не позволяет реализовать цикл каталитического превращения субстрата в присутствии фермента.

Эффективными катализаторами окисления кофакторов являются производные феноксазина и фенотиазина (метиленовый синий, метиленовый зеленый, азур А, азур В, бриллиантовый синий и др.), металлоцианаты, тетратиафульвален, тетрацианохинодиметан, производные виологена (рис. 2.7). Кроме того, медиаторными свойствами обладают некоторые белки и белковые комплексы, например,

**Таблица 2.2. Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых природных и синтетических медиаторов при pH 7**

Природные	$E^\circ$ , В	Синтетические	$E^\circ$ , В
Цитохром <i>a</i> <sub>3</sub>	0,29	Гексацианоферрат(III)	0,45
Цитохром <i>c</i> <sub>3</sub>	0,24	2,6-Дихлорфенол	0,24
Убихинон	0,10	Индофенол	0,24
Цитохром <i>b</i>	0,08	Ферроцен	0,17
Витамин К <sub>2</sub>	–0,03	Феназинметосульфат	0,07
Рубредоксин	–0,05	Метиленовый синий	0,04
FAD/FADH <sub>2</sub>	–0,23	Фталоцианин	–0,02
FMN/FMNH <sub>2</sub>	–0,23	Феносафранин	–0,23
NAD <sup>+</sup> /NADH	–0,32	Бензилвиологен	–0,36
NADP <sup>+</sup> /NADPH	–0,32	Метилвиологен	–0,46
Ферридоксин	–0,43		

цитохромы. Редокс-характеристики наиболее распространенных медиаторов, используемых в ферментных электродах, приведены в табл. 2.2.

В некоторых случаях медиаторы, как и ферменты, добавляют в анализируемый раствор. Сейчас такой способ введения медиатора имеет скорее теоретическое значение, например, при изучении электрохимии белков или для оценки редокс-потенциалов ферментов. С позиций практического применения введение медиаторов в анализируемый раствор существенно усложняет процедуру анализа, поскольку требует проведения дополнительных стадий.

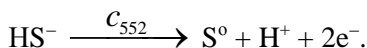
Большее распространение в ферментных электродах нашли способы введения медиаторов в состав электродного вещества или в поверхностный слой. Для этого применяют весь арсенал рассмотренных выше методов модифицирования электродов. Приведем лишь некоторые примеры. Так, металлоцианаты синтезируют непосредственно на электроде нанесением реагентов или электрохимически. Органические медиаторы включают в состав полимеров, осаждаемых из органического растворителя. Последующее нанесение фермента поверх слоя медиатора стабилизирует электрохимические характеристики электрода, препятствуя вымыванию медиатора в раствор. Физическая адсорбция может сочетаться с предварительной обработкой электрода полярными или ионообменными компонентами, электростатически стабилизирующими медиатор. Например, в случае положительно заряженных фенолтиазинов для этого применяют нафийон, фосфат циркония, хитозан, цеолиты и глины.

Введение медиаторов осуществляют путем их полимеризации на электроде (производные фенотиазина и феноксазина, фенолы) либо включением в состав мономеров, подвергаемых электрополимеризации (производные пиррола или анилина, содержащие в боковой цепи ферроцен). Могут использоваться и бифункциональные реагенты, образующие ковалентные связи с медиатором и функциональными группами на поверхности электрода или инертного носителя.

Носителями медиаторов могут служить и биологические компоненты. В частности, с помощью глутарового альдегида можно ковалентно связать медиатор, содержащий аминогруппу, с глобулой белка. В результате в молекуле фермента появляется второй окислительно-восстановительный центр, обеспечивающий связь между электродом и активным центром, находящимся глубоко внутри белковой глобулы. Описаны природные аналоги таких «двухцентровых» молекул. Так, метилгидроксилаза *n*-крезола содержит FAD и гем, что обеспечивает окисление *n*-крезола до *n*-гидроксibenзальдегида за счет внутримолекулярного переноса электрона на периферийный участок молекулы:

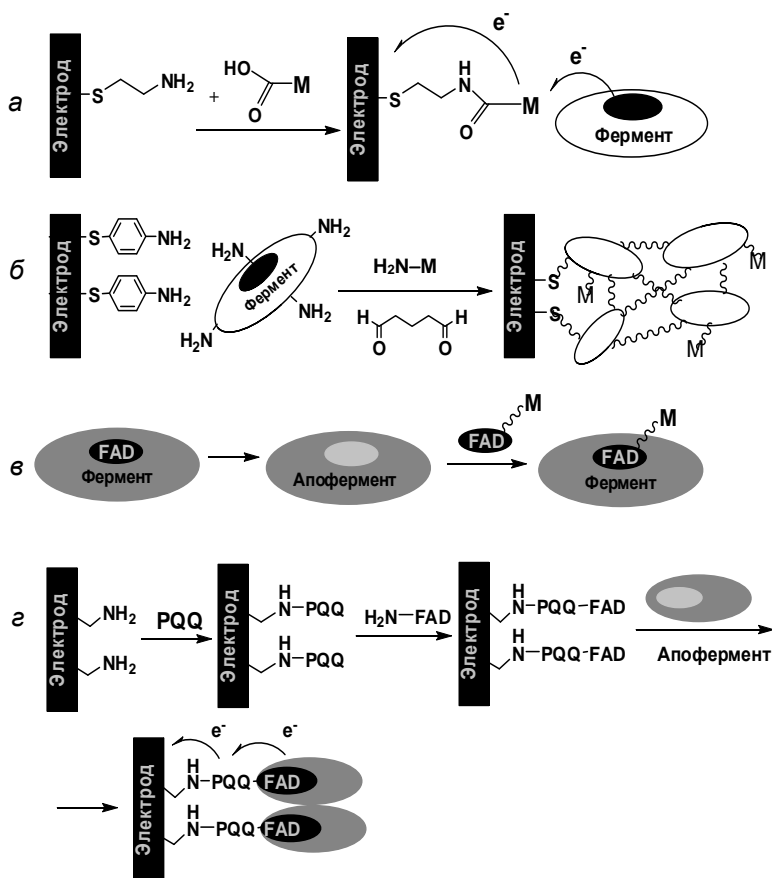


Цитохром *c*<sub>552</sub> содержит FAD и две ковалентно связанные геминные группы, осуществляющие биоэлектрокатализ окисления гидросульфид-ионов до серы:



К медиаторным иногда относят процессы, протекающие на электродах, модифицированных электропроводящими полимерами (полианилин, полипиррол, политиофен), а также на электродах, покрытых гетерогенными частицами (металлоцианаты, фуллерены, углеродные нанотрубки и др.). В данном случае правильнее говорить о медиаторных процессах, в которых участвуют модификатор и редокс-центр фермента. Реализация электронного переноса достигается при сближении соответствующих редокс-центров (например, при включении фермента в слой электропроводящего материала или при совместной иммобилизации фермента и медиатора в инертном носителе или в углеродном материале) и в результате благоприятной ориентации молекулы белка относительно молекулы медиатора.

На рис. 2.8 приведены основные способы обеспечения необходимой дистанции и координации между ковалентно иммобилизованными медиаторами и активными центрами ферментов. К ним относятся: адсорбция фермента поверх слоя ковалентно присоединенного к электроду медиатора М (рис. 2.8, *а*), включение медиатора и фермента в пленку белка посредством кросс-сшивки глутаровым альдегидом (рис. 2.8, *б*), ковалентная пришивка медиатора



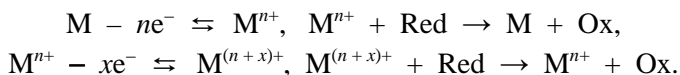
**Рис. 2.8.** Способы включения медиаторов электронного переноса в состав электрода (объяснения в тексте)

к кофактору фермента и создание так называемых реконструированных ферментных систем с дополнительным центром переноса электронов, доступным для обмена электронами с электродом (рис. 2.8, в), пришивка медиатора и фермента к одному линкеру (рис. 2.8, г).

При всем разнообразии ферментов и медиаторов, применяемых для модифицирования электродов, при определении органических соединений предпочтение отдают медиаторам на основе оксидов и комплексов металлов. По сравнению с органическими медиаторами они отличаются большей стабильностью, в том числе при эксплуатации электродов при высоких температурах и в присутствии агрессивных жидкостей, исключающих применение био-

логических компонентов. Кроме того, указанные медиаторы дешевле и проще в применении.

Электрокаталитические реакции, протекающие на таких электродах, упрощенно описываются уравнениями:



Перенос электронов и в этом случае осуществляется через редокс-превращение катализатора, причем его редокс-потенциал должен быть близок к потенциалу протекания основной электродной реакции. С помощью данного механизма объяснена каталитическая активность оксидов кобальта и иридия в реакции выделения кислорода, оксидов рутения – в реакции выделения хлора, оксидов меди и марганца – в реакциях электроокисления хлорорганических соединений и др.

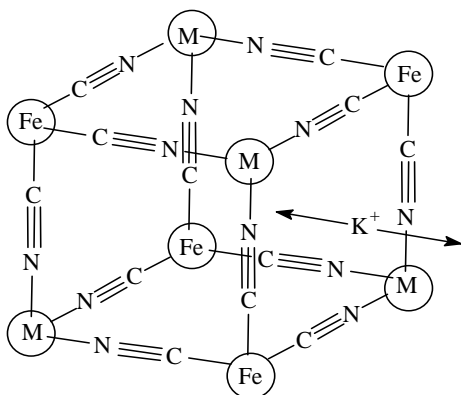
Большинство реакций металлсодержащих катализаторов включает в себя стадию адсорбции электроактивного вещества на поверхности электрода, а некоторые – стадию редокс-превращения адсорбированных частиц, например,



По такому механизму протекает окисление метанола. Поэтому модифицирование электрода металлами, имеющими сродство к кислороду, ускоряет реакцию.

Следует заметить, что для многих металлов природа электрокаталитического эффекта полностью не выяснена. Существуют два основных подхода к трактовке каталитического действия металлов при окислении органических соединений. В первом случае активирующее действие металла связывают с возникновением на электроде центров, облегчающих адсорбцию активных форм кислорода, например OH-радикалов, а во втором – с тормозящим действием атомов металла на процесс образования хемосорбированных частиц, выступающих в качестве «каталитических ядов». В целом, очевидно, следует учитывать оба процесса.

В последние десятилетия основные исследования по каталитическому действию металлов направлены на разработку и изучение свойств электродов, покрытых неорганическими пленками из гексацианометаллатов (ГЦМ) – полиядерных неорганических соединений общей формулы  $\text{M}^{\text{A}}_a[\text{M}^{\text{B}}(\text{CN})_6]_b \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , где  $\text{M}^{\text{A}}$  и  $\text{M}^{\text{B}}$  – ионы переходных металлов в различной степени окисления, относящиеся к внешней и внутренней координационным сферам соответственно. Такие пленки имеют высокую каталитическую активность и стабильность электрохимического отклика. Модифицированные ими электроды применяются в химических сенсорах или в амперометрических детекторах в проточных методах анализа.



**Рис. 2.9.** Структура кристаллической решетки гексацианоферратов

Гексацианометаллаты переходных металлов – типичный пример неорганических полимеров, неподвижные редокс-центры которых могут обмениваться электронами, что обеспечивает проводимость пленок. При этом изменение локальной плотности заряда в объеме пленки компенсируется изменением концентрации противоионов, сорбирующихся на пленке из контактирующего с ней раствора электролита. Такой процесс соответствует смешанному ионно-электронному типу проводимости.

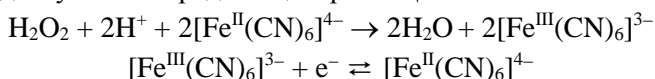
Среди медиаторов на основе гексацианометаллатов наибольший интерес вызывают гексацианоферраты (ГЦФ) металлов, прежде всего из-за их высокой каталитической активности, не говоря уже о доступности и простоте синтеза. ГЦФ имеют гранецентрированную кубическую трехмерную кристаллическую структуру с повторяющимися мостиковыми фрагментами  $-\text{NC}-\text{Fe}^{\text{III}}-\text{CN}-\text{M}-\text{NC}-$  (рис. 2.9). В них атомы углерода координированы к ионам железа, а атомы азота – к ионам другого переходного металла. Железо и ион металла находятся в узлах решетки, а противоions  $\text{K}^+$  и молекулы воды – в полости ионного канала куба.

Электрохимические свойства гексацианоферратов переходных металлов, осажденных на поверхности электрода, зависят от структуры и состава пленки, природы металла во внешней координационной сфере комплекса. Состав фонового электролита (природа и концентрация катиона и аниона, pH) также влияет на электрохимические характеристики пленок. Редокс-потенциалы ГЦФ смещаются в анодную область в зависимости от природы ионов щелочных металлов, участвующих в электродном процессе в качестве противоионов, в ряду:  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$ . Обычно это связывают с геометрическими размерами гидратированных ионов. Чем больше радиус гидратированного иона, тем меньше его подвижность в пленке. Например, подвижность катионов калия в пленке

ГЦФ кобальта меньше, чем катионов натрия, так как ионный радиус  $K^+$  (1,33 Å) больше, чем ионный радиус  $Na^+$  (0,95 Å).

Гексацианоферраты хорошо зарекомендовали себя в качестве медиаторов при электрокаталитическом окислении анионов ( $NO_2^-$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $SO_5^{2-}$ ,  $S_2O_8^{2-}$ ), нейтральных молекул ( $H_2O_2$ ,  $NH_2OH$ ,  $N_2H_4$ ,  $SO_2$ ) и органических соединений (допамина, аскорбиновой кислоты, гидрохинона, NADH, глутатиона, цистеина), а также при восстановлении  $CO_2$ ,  $H_2O_2$  и др. В комбинации с ферментами ГЦФ могут быть использованы в составе электродов для определения пероксида водорода, глюкозы и др. Высокую каталитическую активность к восстановлению пероксида водорода они сохраняют даже в угольной пасте, что позволяет работать в диапазоне потенциалов от  $-0,2$  до  $0$  В, в котором практически не протекают нежелательные реакции. Благодаря этому свойству берлинская лазурь получила название «искусственной пероксидазы».

Поскольку пероксид водорода высвобождается в реакциях с участием большого количества оксидоредуктаз, пленки ГЦФ часто включают в состав ферментных электродов для снижения рабочего потенциала и повышения чувствительности. Например, в сочетании с нафтоном, обеспечивающим иммобилизацию глюкозооксидазы, электроды, модифицированные ГЦФ, позволяют определять от  $10^{-6}$  до  $\sim 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л глюкозы. Для этого на поверхность модифицированного ГЦФ стеклоуглеродного электрода наносят каплю раствора смеси глюкозооксидазы с нафтоном. После высушивания образуется слой иммобилизованного фермента. Содержание глюкозы определяют по скорости реакции ее окисления кислородом. Фактически глюкоза окисляется с участием флавинадениндинуклеотида (FAD), который входит в состав глюкозооксидазы. При этом образуется пероксид водорода, который восстанавливается на электроде с участием редокс-центров ГЦФ:



Возникающий при восстановлении  $H_2O_2$  ток служит сигналом отклика, по которому определяют концентрацию глюкозы.

Особенностью рутения является его способность к образованию высоких степеней окисления и легкость связывания с кислородом. Лучшая адсорбция кислородсодержащих частиц на рутении по сравнению с платиной является одной из причин широкого использования рутения как модификатора электродов. Для определения органических веществ и биомолекул применяют электроды, модифицированные пленками из гетеровалентных оксидов рутения, перекрестно-связанных с цианометаллатами ( $RuO-MCN$ ,  $M = Fe$  и  $Ru$ ). Такие электроды, находят применение в качестве детекторов в проточно-инжекционном анализе при определении спиртов, альдегидов и нитрозаминов.



Наряду с пленками гексацианометаллатов переходных металлов для модифицирования электродов применяются также композитные пленки из органических полимеров и осадков благородных металлов и их соединений. В частности, использование в качестве матрицы полимерных пленок позволяет получать ультрадисперсные осадки металлов платиновой группы с диаметром кристаллитов 3–5 нм и с большой удельной поверхностью (60–100 м<sup>2</sup>/г), что способствует их высокой каталитической активности, а также химической и физической устойчивости осадков. Электрокаталитические свойства таких пленок зависят от способа получения композита, его состава и структуры поверхности. Комбинирование материалов, использование разных способов нанесения пленок на поверхность электрода и различных вариантов включения в их состав медиаторных систем позволяет управлять каталитической активностью. Число каталитических систем на основе благородных металлов, включенных в иммобилизованные на поверхности электрода полимерные пленки, постоянно растет. Основная проблема, ограничивающая применение подобных электродов, связана с возможностью отравления металла-катализатора.

Следует заметить, что в литературе приводятся противоречивые сведения о влиянии полимерной матрицы на каталитическую активность платиновых металлов. Так, при иммобилизации частиц платины и палладия в ионообменные полимеры с ростом дисперсности наблюдается ингибирование реакции окисления метанола, а реакция окисления муравьиной кислоты, наоборот, ускоряется. Уменьшение размера частиц Pt и Pd при включении этих металлов в пленку полианилина сопровождается увеличением каталитической активности при окислении метанола, этиленгликоля и глицерина за счет того, что полимерная пленка препятствует отравлению металлов каталитическими ядами.

Электроды, полученные модифицированием стеклогуглерода частицами серебра и золота, также проявляют каталитическую активность при электроокислении спиртов и альдегидов. Химическое осаждение золота осуществляют в присутствии сильных восстановителей (гипофосфита или борогидрида натрия, боранов, гидразина и др.). Электрохимическое осаждение проводят путем электролиза, используя гальваностатический, потенциостатический или потенциодинамический режимы.

Бинарные системы и более сложные металлические композиции нередко имеют повышенную каталитическую активность по сравнению с индивидуальными металлами. Более высокую каталитическую активность биметаллов объясняют двумя причинами: бифункциональным эффектом, в котором каталитические свойства элементов оказывают синергетическое действие, проявляющееся в более высокой каталитической активности композита по сравнению с активностью каждого из элементов в отдельности, и лиганд-

ным или электронным эффектом, в котором каждый из элементов изменяет электронные свойства другого, что способствует их более высокой каталитической активности. Так, бинарные системы М–Pt, полученные осаждением Ru, Pd, Rh, Os и Ag на платиновые электроды, проявляют более высокую каталитическую активность по сравнению с платиной. В частности, бинарные системы Pt–Ru, Pt–Rh, Pt–Ir проявляют высокую каталитическую активность по отношению к СО.

Создание бинарных систем на основе платины позволило оптимизировать электрокаталитические процессы окисления метанола и этанола в кислой среде, при этом система Pt–Ru признана лучшим катализатором в реакциях такого типа. Роль рутения заключается в обеспечении реакции кислородом для окисления адсорбированных на атомах платины спиртовых фрагментов. В качестве катализаторов используются также бинарные системы на основе золота и других *p*- и *d*-элементов.

При включении биметаллов в полимерные пленки наблюдается изменение свойств катализаторов. Например, электрокаталитическая активность системы Pt–Ru возрастает при ее электроосаждении в матрицу полианилина, тогда как при осаждении частиц Pt–Ru в пленку нафiona наблюдается снижение каталитической активности при окислении метанола. Рутений и олово, осажденные совместно с микрочастицами платины в пленку полианилина, проявляют более высокую электрокаталитическую активность как при окислении этиленгликоля, так и при окислении оксида углерода. При окислении муравьиной кислоты на электродах, покрытых полимерными композитами на основе полипиррола, полианилина и политиофена, наибольший каталитический эффект имеет композит политиофен–Pt–Pb.

Число медиаторов электронного переноса, способных эффективно ускорять окисление (восстановление) органических субстратов, весьма значительно. Практически любое соединение может быть вовлечено в электродные процессы с участием правильно подобранных медиаторов. Исключение составляют только наиболее устойчивые к окислению классы органических веществ – алканы, кетоны, фторорганические соединения, короткоцепочечные алкилароматические соединения и др. Но и в этом случае можно подобрать системы, обеспечивающие электрохимический отклик, например, при использовании электрохимически генерируемых окислителей, биохимических систем на основе оксидоредуктаз или цитохромов, путем замены воды на ионные жидкости. В некоторых случаях появление тока в присутствии медиатора наблюдается даже тогда, когда в его отсутствие определяемое соединение не дает пиков на вольтамперограммах.

Введение медиатора в состав электрода позволяет сократить число стадий измерения, упростить процедуры, а также использо-

вать его многократно. Иммобилизация медиатора на поверхности и тем более в объеме электрода, как правило, снижает эффективность его взаимодействия с субстратом, однако в большинстве случаев это незначительно сказывается на аналитических характеристиках электродов. Поскольку процесс переноса электрона сопровождается изменением заряда медиатора, обычно он сопряжен с химическими стадиями – переносом кислорода или ионов водорода. По этой причине независимо от состава электродного вещества и способа модифицирования окислительно-восстановительные процессы протекают на поверхности электрода, на которой отсутствуют диффузионные ограничения переноса заряда (иона). Исключение – реакции в пористых электродах, в которых могут участвовать молекулы кислорода, остающиеся в порах электрода или сорбированные на его поверхности.

В последнее время наблюдается тенденция перехода от объемной модификации электродов к нанесению медиаторов в составе поверхностного слоя, что позволяет сократить расход реактивов, а в ряде случаев – повысить скорость переноса электрона и селективность сигнала-отклика относительно немодифицированного электрода. Поверхностное модифицирование применяется, прежде всего, для трудно растворимых медиаторов, вымывание которых в процессе эксплуатации незначительно. Объемная модификация сохраняет значение для тонкопленочных планарных электродов, а также в тех случаях, когда низкая растворимость модификатора осложняет получение однородной пленки на поверхности электрода. Правда, в настоящее время получены производные классических медиаторов, обеспечивающие их более простое включение в состав поверхностного слоя. Например, вместо малорастворимых фталоцианиновых или порфириновых комплексов  $\text{Co}^{2+}$ , которые обычно включают в углеродные пасты, применяют их водорастворимые сульфопроизводные. При этом формирование слоя медиатора проводят путем электрополимеризации или включения его в полиэлектролитные комплексы.

Несмотря на многообразие медиаторов, применяемых для окисления и восстановления органических и неорганических соединений, проблема выбора лучшей медиаторной системы остается нерешенной. Поэтому продолжается поиск новых материалов, способов изготовления электродов, которые, с одной стороны, обладали бы высокой каталитической активностью, а с другой, – стабильностью сигнала-отклика.

## **2.3. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ НА ПОВЕРХНОСТИ И В ОБЪЕМЕ ЭЛЕКТРОДА**

Радикальный способ повышения отношения сигнал/шум в вольтамперометрии – концентрирование определяемого вещества на

электроде. Полученный концентрат подвергают затем электрохимическому превращению. В этом случае электродный процесс протекает фактически не на «голом» электроде, а на электроде, «модифицированном» концентратом определяемого вещества. Поскольку содержание последнего в концентрате на несколько порядков выше по сравнению с раствором, величина сигнала-отклика резко возрастает. При этом существенно повышается чувствительность метода, так как величина тока не ограничена скоростью диффузии определяемого вещества к поверхности электрода. Этот подход используется, в частности, в инверсионной вольтамперометрии (ИВА).

Многообразие электрохимических, химических и адсорбционных реакций, используемых для предварительного концентрирования определяемых веществ в объеме или на поверхности электрода, обеспечивает возможность определения большого числа различных элементов и соединений с весьма высокой селективностью и низким пределом обнаружения. Первоначально инверсионную вольтамперометрию применяли только для анализа растворов в двух вариантах, различающихся агрегатным состоянием концентрата: ИВА амальгам и ИВА твердых фаз. Затем ее стали использовать в исследовании твердых веществ, локальном анализе металлических покрытий, элементном и фазовом анализе сплавов, порошковых и композиционных материалов. Сочетание предварительного концентрирования с нестационарными методами измерения сигнала позволяет достичь пределов обнаружения для ряда элементов и органических соединений на уровне  $10^{-5}$  мкг/мл и ниже.

В методе инверсионной вольтамперометрии большое значение имеет выбор рабочего электрода. В принципе здесь применяют те же типы электродов, что и в других вольтамперометрических методах, хотя требования к воспроизводимости поверхности, пожалуй, заметно выше. До последнего времени наибольшее распространение имели стационарные ртутные электроды разнообразной конструкции. Преимуществом ртутных электродов перед электродами из других материалов является высокое перенапряжение катодного выделения водорода и хорошая воспроизводимость характеристик поверхности. К числу недостатков относят токсичность ртути и низкий потенциал ее анодного растворения, что ограничивает рабочую область потенциалов, а значит, и область применения. Ртутные электроды используются главным образом для определения металлов, образующих амальгаму.

Следствием желания сократить применение токсичной ртути стала разработка пленочных ртутных электродов, получаемых на различных подложках. Пленка ртути формируется *in situ* при наложении соответствующего потенциала в растворах, содержащих ионы  $Hg^{2+}$ . Вследствие существования «индукционного периода» об-

разования зародышей новой фазы ртути на поверхности подложки (обычно графита) электрод не сразу приобретает нужные свойства. Индукционный период тем больше, чем меньше концентрация ртути в растворе. Задержка во времени должна приниматься во внимание прежде всего в присутствии компонентов, способных к сильному взаимодействию с поверхностью графита. При этом часть определяемого с помощью ИВА металла может выделяться непосредственно на поверхности электрода, а не в амальгаму и, следовательно, не будет участвовать в формировании сигнала-отклика.

Электроды из благородных металлов применяются редко. Это обусловлено весьма низким перенапряжением выделения водорода на электродах из платины, золота, серебра, иридия, родия, палладия, а также на электродах из сплавов этих металлов. Другим ограничением является образование оксидных слоев на поверхности указанных электродов или растворение металлов при положительных потенциалах (например, для золота при  $0,9 \div 1,0$  В). Осложняющим обстоятельством является взаимодействие материала электрода с выделяющимися металлами с образованием интерметаллидов, что служит источником систематической погрешности.

В настоящее время в инверсионной вольтамперометрии все чаще применяются электроды, изготовленные из стеклоуглерода и импрегнированного графита, а также толсто- и тонкопленочные УПЭ, в том числе модифицированные (см. разд. 1.1). При этом исчезают проблемы, связанные с применением токсичных и неудобных ртутных электродов и с обновлением поверхности электрода, поскольку пленочные УПЭ достаточно дешевы и могут применяться как разовые. Диапазон рабочих потенциалов этих электродов довольно широк. При определении ионов металлов электроды модифицируют ртутью, золотом, висмутом или органическими соединениями.

С целью увеличения продолжительности «жизни» и автоматизации измерений разработан электрод с заменяемой поверхностью. Его отличительной особенностью является то, что собственно электродом служит гибкий электропроводящий материал, рабочая поверхность которого заменяется по мере необходимости.

Для концентрирования определяемых веществ на электроде в ИВА используются электрохимические или химические реакции, которые в зависимости от природы определяемого компонента и электрода можно сгруппировать следующим образом.

1. Процессы разряда–ионизации металлов на поверхности ртутного или твердого электрода. Содержание определяемого вещества находят по величине анодного тока растворения металла, выделяющегося на электроде при электролизе исследуемого раствора.

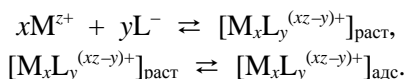
2. Образование малорастворимых химических соединений на поверхности электрода. Они могут возникать в ходе химической

реакции материала электрода с определяемыми ионами. При обратном цикле поляризации указанные соединения растворяются и дают соответствующий сигнал. Этот способ применяется в основном для инверсионно-вольтамперометрического определения анионов:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ , а также  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{VO}_3^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  и  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Нижняя граница определяемых концентраций для различных анионов лежит в пределах от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$  моль/л в зависимости от растворимости осадков. Другой путь образования малорастворимых соединений – введение в раствор реагентов, которые образуют на поверхности электрода осадки с ионами металлов. В этом случае при электролизе ионы определяемого вещества восстанавливаются или окисляются на электроде до степени окисления, в которой они взаимодействуют с реагентом по реакции, приводящей к образованию осадка. Образовавшиеся соединения затем электрохимически окисляют или восстанавливают и измеряют ток. Этим способом определяют Cu, Hg, Tl, Fe, Ni, Co, Mn, V, Mo, W, Re.

3. Третий тип электродных процессов включает стадию адсорбции, что предполагает наличие в растворе поверхностно-активных веществ, способных образовывать на поверхности электрода комплексные соединения с определяемыми ионами. В другом случае комплексные соединения образуются *in situ* в растворе и затем адсорбируются на электроде. В обоих случаях при регистрации вольтамперограмм происходит восстановление или окисление адсорбированного на электроде вещества. Его концентрирование может происходить и в отсутствие тока, т. е. при разомкнутой цепи. Адсорбционные процессы используются для концентрирования и определения как неорганических, так и органических веществ.

Благодаря адсорбционному концентрированию с помощью ИВА удастся определять щелочные и щелочноземельные металлы, элементы подгруппы алюминия и иттрия, не говоря уже о традиционных для ИВА Cu, Pb, Cd, Zn и др. (табл. 2.3). Как правило, адсорбционное концентрирование связано с применением поверхностно-активных лигандов, вводимых в анализируемый раствор. В принципе, лиганды должны быть электрохимически неактивными, но электроактивные лиганды также можно использовать, если их электродные потенциалы заметно отличаются от потенциалов восстановления (окисления) образующихся комплексных соединений.

В общем виде процесс адсорбционного концентрирования иона  $\text{M}^{z+}$  на поверхности индикаторного электрода можно представить схемой



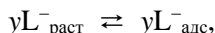
На стадии накопления устанавливается равновесие адсорбат  $\rightleftharpoons$  адсорбирующееся вещество, которое смещено в сторону, обеспечи-

**Таблица 2.3. Органические лиганды, применяемые для определения элементов методом ИВА**

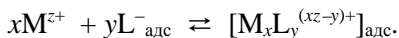
Лиганд	Элемент
2-(5-Бром-2-пиридилазо)-5-диэтиламинофенол	Bi, Cu, Fe, Nb, Tl, V
8-Гидроксихинолин	Cd, Cu, Mo, Pb, U, In
2,5-Димеркапто-1,3,4-тиадиазол	Al, As, Cd, Ni, Se, Zn
Диметилглиоксим	Co, Ni, Pd
Катехол	Cu, Fe, Ge, Ga, Sb, Sn, U, V
о-Крезолфталексон	Ge, La, Pr
Купферон	Sm, Tb, Tl
4-(2-Пиридилазо)резорцин	Bi, Tl, U
Солохром фиолетовый RS	Al, Ba, Ca, Cs, Dy, Fe, Ga, Ho, K, Mg, Mn, Na, Rb, Sr, Tl, V, Y, Yb, Zr, Hf
Тиоцианат	Cu, Nb, Tc
Тимолфталексон	Ba, Ca, Mg, Sr

вающую концентрацию определяемого компонента. Количество адсорбата на электроде зависит от концентрации  $M^{z+}$  и от времени выдерживания электрода в растворе. Обычно используются растворы, в которых  $C_L \gg C_M$ .

Возможен и другой механизм адсорбционного концентрирования. В этом случае адсорбируется лиганд:

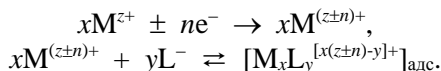


который взаимодействует с ионами  $M^{z+}$  на электроде:



Затем регистрируются токи окисления (восстановления) адсорбированных комплексов.

Если ион металла не образует с реагентом электрохимически активный комплекс, а продукт его электрохимического превращения образует такой комплекс, то процесс адсорбционного концентрирования описывается следующими стадиями:

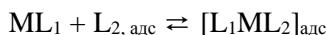


Следует заметить, что этот процесс может осуществляться по механизму, являющемуся комбинацией двух последних, т. е. ионы  $M^{(z\pm n)+}$  образуют комплексы с адсорбированными на электроде лигандами.

**Таблица 2.4. Лекарственные соединения, определяемые методом адсорбционной инверсионной вольтамперометрии**

Вещество	pH	$E_{\text{нак}}$ , В	$E_p$ , В
Адриамицин	4,5	–0,50	–1,12
Атропин	12,7	–0,70	–1,35
Берберин	2,0	–0,85	–1,13
Бромазепам	5,0	–0,60	–0,92
Виагра	2,0	–0,80	–1,06
Гестоден	4,5	–0,80	–1,30
Допамин	1,0	–0,20	–0,45
Карнозин	9,6	0,0	–0,45
Кокаин	9,0	0,50	0,92
Кодеин	14,0	–0,70	–1,12
Лорметазепам	3,0	–0,50	–0,80
Метамитрон	2,0	0,0	–0,50
Новобиоцин	11,6	–1,0	–1,38
Окситетрациклин	2,0	–0,50	–1,06
Парацетамол	4,7	–0,10	–0,55
Рифамицин	3,5	–0,15	–0,90
Стрептомицин	12,0	–1,20	–1,58
Фамитидин	2,0	–0,95	–1,20
Эритромицин	4,7	–1,0	–1,25

Кроме того, в присутствии лиганда  $L_1$ , который образует неза-  
ряженный комплекс с ионом металла, и второго лиганда, который  
является гидрофобным и прочно адсорбируется на электроде, мо-  
жет наблюдаться синергетическая адсорбция:



В этом случае второй лиганд  $L_2$  реагирует с комплексом  $ML_1$  с об-  
разованием на поверхности электрода гидрофобного смешанно-  
лигандного комплекса  $[L_1ML_2]$ .

К адсорбционному варианту концентрирования можно отнести  
и способ, связанный с адсорбцией органических соединений. В  
настоящее время накоплен обширный материал об электрохимиче-  
ских превращениях органических веществ на ртутном, графитовом,  
стеклоуглеродном и других электродах в условиях инверсионной  
вольтамперометрии. Примеры лекарственных органических соеди-



нений, которые могут быть определены этим методом, приведены в табл. 2.4. Этот перечень далеко не исчерпывающий.

Другой метод концентрирования определяемых веществ на электроде основан на использовании специфических свойств модифицированных электродов, которые проявляются за счет других, неадсорбционных сил. Накопление определяемого вещества в этом случае происходит не в результате адсорбции, а вследствие процессов экстракции, сорбции, мембранного разделения, ионного обмена или ковалентного связывания. Анализируемый компонент из водного (органического) раствора концентрируется на поверхности или в объеме электрода с помощью иммобилизованных жидких, твердых или полимерных экстрагентов, сорбентов и полупроницаемых мембран.

Экстракционное извлечение металлов или органических соединений в объем электрода связующим, содержащим экстрагент или без него, формально имеет аналогию с обычной жидкостной экстракцией и в случае сольватного механизма может быть изображено схемой ( $S$  – экстрагент):



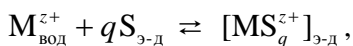
Частицы определяемого вещества концентрируются из разбавленных растворов в химически модифицированный слой электрода вследствие образования между экстрагентом и экстрагируемым компонентом сравнительно прочных химических связей. Экстракция может протекать не только по сольватному, но и гидратно-сольватному механизму либо при катионном или анионном обмене, а также вследствие сочетания этих механизмов.

При выборе модификатора и условий концентрирования следует руководствоваться известными закономерностями процессов экстракции, причем в качестве модификаторов можно использовать большинство реагентов, рекомендованных для экстракционного извлечения ионов металлов и органических соединений и действующих избирательно при определенных условиях (рН раствора, маскирующие вещества, растворители, ионная сила и т. п.). Сенсорная часть такого электрода должна содержать определенное количество экстрагента, обеспечивающее его устойчивую работу в течение требуемого времени.

По сольватному механизму с образованием донорно-акцепторных связей осуществляется концентрирование ионов металлов с

помощью нейтральных органических экстрагентов: фосфорорганических соединений (фосфиноксиды, аминфосфонаты, дифосфонаты и др.), органических сульфидов и сульфоксидов, тиакраун- и краун-эфиров, каликсаренов и тиакаликсаренов и др. Аналогично, но с образованием водородных связей, извлекаются многие органические соединения. По ионообменному механизму происходит экстракция ионов металлов и их комплексов карбоновыми и фосфорорганическими кислотами, меркаптопроизводными, аминоалкилсульфидами, алкиламинами и др.

При выдерживании ХМЭ в анализируемом растворе происходит экстракция определяемого компонента в объем электрода:



которую можно охарактеризовать константой экстракции

$$K_{\text{э}} = \frac{[MS_q^{z+}]_{\text{э-д}}}{[M^{z+}]_{\text{вод}} [S]_{\text{э-д}}^q}.$$

Если комплекс  $[MS_q^{z+}]_{\text{э-д}}$  достаточно устойчив, то из этого соотношения следует, что

$$[MS_q^{z+}]_{\text{э-д}} = K_{\text{э}} [M^{z+}]_{\text{вод}} [S]_{\text{э-д}}^q,$$

т. е. регистрируемый на электроде ток пропорционален константе экстракции иона металла и его концентрации в растворе:

$$i_p = bAK_{\text{э}} [M^{z+}]_{\text{вод}} [S]_{\text{э-д}}^q t v,$$

где  $b$  – константа;  $t$  – время накопления;  $A$  – площадь электрода;  $v$  – скорость сканирования потенциала.

При модифицировании электродов хелатообразующими экстрагентами, например 2,2-дипиридилом, диметилглиоксимом, дитизоном, диэтилдитиокарбаматом натрия, экстракция сопровождается образованием исключительно прочных комплексов. В табл. 2.5 приведены экстрагенты-модификаторы, применяемые для изготовления электродов.

Специфические комплексообразователи, такие как диметилглиоксим, хелаты и поданды, целесообразно использовать в том случае, если предполагается определение ионов металлов в сильноминерализованных средах, в том числе в присутствии значительных количеств других электроактивных ионов. Для повышения селективности измерений после стадии накопления определяемого иона электрод переносят из пробы в раствор фонового электролита и проводят катодное восстановление накопленных в объеме электрода ионов. В этом случае условия накопления иона металла и последующего измерения аналитического сигнала могут существенно отличаться по pH, ионному составу раствора и присутствию

**Таблица 2.5. Модификаторы, применяемые для экстракции и сорбции определяемых веществ в объем электрода**

Экстрагент	Определяемое вещество	Сорбент (ионообменник)	Определяемое вещество
2,2-Дипиридил	Co	Цеолиты	Ag, Hg
Диэтилдитиокарбамаат натрия	Pb	Глины Амберлиты	Ag Au, Ir
Дитизон	Au	Сепиолит	Тетраметрин
Меркаптаны	Bi	Силикаты	Нитросоединения
Триалкилфосфаты	Au	Морские водоросли	Cu, Ag
Алкилфосфиноксиды	Au	Лишайники	Pb
Нефтяные сульфиды	Hg	Карбохромы	Нитросоединения
Диметилглиоксим	Ni	Силикагели	Хлорфенолы
Триэтаноламин	Ag	Ионообменные смолы	Au
Тиакраун-эфиры	Ag		
Краун-эфиры	Hg, Pb	Водоросли	Cu, Ag
1,10-Фенантролин	Fe, Co	Диатомиты	Фенолы

дополнительных маскирующих реагентов. Такой прием снижает влияние мешающих ионов на регистрируемый сигнал.

Заметим, что время накопления определяемого иона не оказывает заметного влияния на чувствительность измерений. Это связано с тем, что число центров связывания металла на поверхности электрода ограничено, так что регистрируемый ток достаточно быстро приходит к насыщению. При регистрации вольтамперограммы одновременно регенерируется экстрагент-комплексобразователь, освобождая центры связывания для последующих измерений. Поэтому в некоторых случаях удается проводить последующие измерения без механического обновления поверхности электрода. К сожалению, недостаточная механическая прочность угольных паст и неизбежное подтекание электролита в поры поверхностного слоя ограничивает число таких измерений.

Конечно, модифицирование электрода экстрагентами не исключает сорбционного накопления ионов металлов и органических соединений на его поверхности. Данный процесс не оказывает заметного влияния на измерение сигнала, если концентрация определяемого иона существенно превышает концентрацию других электрохимически активных ионов, а накопление и измерение проводится в одном и том же растворе. Однако при проведении измерений в присутствии избытка мешающих ионов, как и при смене раствора, неспецифическая сорбция может в значительной степени искажать вольтамперограммы и, следовательно, повышать предел обнаружения.

Помимо собственно адсорбции для модифицированных УПЭ характерно насыщение поверхностного слоя раствором электролита, как за счет капиллярных эффектов, так и в результате частичного вымывания водорастворимых компонентов и частиц углерода и модификатора. Для улучшения аналитических характеристик этот слой рекомендуется удалять между измерениями. Его толщину оценить достаточно трудно, поскольку она определяется конкретными условиями приготовления пасты и самого электрода. Обычно считается достаточным удаление 0,1–0,2 мм поверхностного слоя. Близкий результат может дать полировка электрода, модифицированного затвердевшей при нормальной температуре пастой. Полировка сопровождается частичным удалением и уплотнением поверхностного слоя пасты. Более подробно способы обработки поверхности УПЭ рассмотрены в гл. 1.

В случае концентрирования определяемых веществ на селективных сорбентах, входящих в состав объемно-модифицированного электрода или иммобилизованных на его поверхности, избирательность определений достигается не только подбором модификатора, но и регулированием условий сорбции.

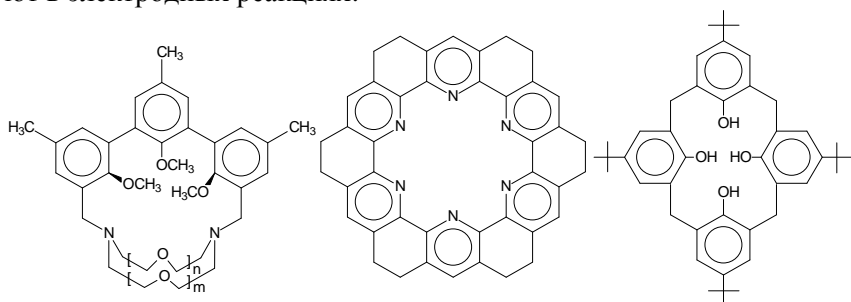
В отличие от жидкостной экстракции в процессах твердофазной экстракции (сорбции) более широко используются электростатические взаимодействия определяемых ионов с ионообменниками, иммобилизованными в материале УПЭ или диспергированными в полимерную пленку. Схему процесса можно представить следующим образом:



Аналитический сигнал, зависящий от концентрации деполяризатора  $[\text{RH}_{x-z}\text{M}]_{\text{ТВ}}$ , линейно связан с  $[\text{M}^{z+}]_{\text{вод}}$  и зависит также от концентрации электроактивных участков на поверхности электрода. Селективность определений на таких электродах может достигать очень высоких значений ( $10^4$ – $10^7$ ), особенно для ионообменников с гидрофобными свойствами. Однако при их применении всегда следует иметь в виду ограничения, сокращающие диапазон определяемых концентраций: эффект насыщения и матричный эффект модифицирующего слоя. Насыщение проявляется в том, что все ионогенные группы сенсорного слоя могут быть заняты и аналитический сигнал не будет зависеть от концентрации анализируемого компонента. Поэтому важно знать емкость модифицирующего слоя, т. е. число сорбирующих центров, которому соответствует максимальный ток. Матричный эффект обусловлен тем, что при повторном применении электрода слой сорбента может изменять свои характеристики (редокс-потенциал, скорость обмена и пр.). Для уменьшения этого эффекта следует использовать тонкие слои модификатора.

При модифицировании электродов для определения органических соединений в состав электродного вещества включают сорбенты, обладающие гидрофобными свойствами. Поскольку многие органические соединения гидрофобны, сорбция на таких сорбентах способствует удалению гидратной оболочки и снижению энергии активации переноса электрона. В частности, эффективность сорбционного накопления пестицидов, фенолов, полиароматических углеводородов настолько высока, что позволяет снизить определяемые концентрации в 100 раз и более по сравнению с немодифицированными электродами. При этом также повышается селективность определений, поскольку снижаются токи полярных и заряженных соединений.

Примеры специфических взаимодействий, позволяющих концентрировать на электроде органические вещества, достаточно ограничены. Наряду с представленными в табл. 2.5 в некоторых случаях для этого используются макроциклические соединения, которые взаимодействуют с органическими лигандами и участвуют в электродных реакциях:



Так, калексарены способны селективно связывать некоторые моносахариды и аминокислоты, которые затем окисляются в присутствии каталитических количеств оксидов  $\text{Cu(I/II)}$ ,  $\text{Fe(II/III)}$  и других переходных металлов. По своей структуре они похожи на чашу, внутренний диаметр которой подходит для молекул «гостей» определенного размера. Использование природных и синтетических макроциклических соединений оказалось весьма интересным именно по той причине, что они проявляют исключительно высокую селективность по отношению к молекулам ряда органических веществ.

Разработаны электроды для определения анионов «гостей». Они состоят из липофильных молекул циклодекстринодержавщих полиаминов, иммобилизованных на стеклоуглеродном электроде в виде пленки Ленгмюра–Блодже. Молекулы полиаминов находятся в протонированной форме и связывают анионы «гостей» в комплексы. Концентрацию анионов определяют по токам окисления маркеров –  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  или  $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]^{2+}$ . Так, для фталатов

нижняя граница определяемых содержаний уменьшается в ряду: *m*-изофталат > *n*-терефталат > *o*-фталат. Аналогичный ряд установлен и для нуклеотидов: АТФ<sup>4-</sup> > АДФ<sup>3-</sup> > АМФ<sup>2-</sup>, где АТФ, АДФ и АМФ – три-, ди- и монофосфаты. В присутствии циклодекстринов заметно ускоряется перенос электронов и при окислении NADH.

Наряду с циклодекстринами для модифицирования электродов применяются открытоцепочечные нейтральные соединения, например, построенные на принципе сочетания донорных концевых групп с 2-метилпиридилэфирными фрагментами, или антибиотиками, которые образуют псевдоциклические структуры. Псевдоциклическая конформация стабилизируется за счет взаимодействия концевых групп антибиотика с молекулами «гостей». В частности, хорошо известны псевдоциклические структуры монензина и нигерицина.

Для повышения избирательности определений применяют также разделение с помощью мембран. Если поверхность электрода покрыть слоем пористого полимера, через «сито» которого способны пройти только молекулы малого размера, то этот электрод будет иметь специфическую селективность. В частности, с помощью электрода, покрытого пленкой ацетилцеллюлозы, определяют гидропероксид в присутствии других электроактивных веществ (аскорбиновая кислота, белки и др.).

Ток отклика электрода, поверхность которого покрыта пористой мембраной, меньше по сравнению с током на обычном электроде такого же размера:

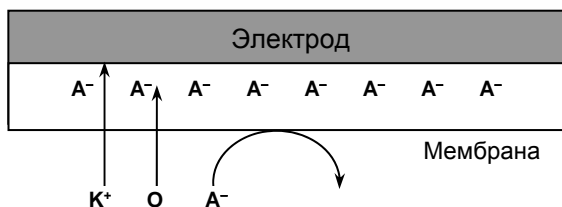
$$i = i_0 \frac{1}{1 + P_{p-p} / P_m},$$

где  $i$  и  $i_0$  – токи на покрытом мембраной и «голом» электродах соответственно;  $P_{p-p}$  и  $P_m$  – коэффициенты проницаемости электроактивного вещества в растворе и в мембране.

Видно, что величина аналитического сигнала на электроде, покрытом пористой мембраной, зависит от проницаемости раствора  $P_{p-p} = D/\delta$  и мембраны  $P_m = \alpha D_m/\delta_m$ . Отношение  $P_{p-p}/P_m$  называется числом Био и определяет ток  $i$ . Таким образом, массоперенос деполаризатора к электроду, покрытому мембраной, определяется его коэффициентом диффузии в мембране  $D_m$ , толщиной мембраны  $\delta_m$  и коэффициентом распределения электроактивных частиц между мембраной и раствором  $\alpha = [A]_m/[A]_{p-p}$ .

Однако наибольшее распространение в вольтамперометрии получили мембраны, действующие селективно по зарядам частиц, а не по их размерам. Так, при использовании катионообменных мембран типа нафiona большинство анионов не дают аналитического сигнала, тогда как отклик нейтральных молекул снижается на 2/3, а отклик катионов остается прежним. Схему электрода можно

изобразить следующим образом, где  $A^-$  – анион,  $K^+$  – катион, О – нейтральный субстрат:



Сами по себе такие мембраны не электроактивны, но они демонстрируют высокую избирательность по отношению к большим гидрофобным катионам, например, к метилвиологену ( $MB^+$ ), ферроценилметилтриметиламмонiu ( $FcA^+$ ) и комплексам рутения  $[Ru(NH_3)_4]^{3+}$ ,  $[Ru(dipy)_3]^{2+}$ , по сравнению с одно- и двухвалентными неорганическими ионами. Пленка полимера обеспечивает извлечение больших катионов из водной фазы и их концентрирование на электроде. Так, покрытый мембраной из нафiona стеклогуглеродный электрод находит применение для определения протонированной формы допамина в присутствии отрицательно заряженных молекул аскорбата, которые отталкиваются от поверхности электрода и не мешают определению.

Другой тип селективности по зарядам реализуется при покрытии электродов анионообменными мембранами. Например, поли-(4-винилпиридин) применяется для модифицирования электродов при определении анионов. С разделением по зарядам можно сочетать разделение по размерам, используя двойное покрытие – пленку ацетилцеллюлозы поверх слоя анионообменной или катионообменной мембраны. Применение многослойных мембран повышает селективность отклика. В табл. 2.6 приведены данные о некоторых мембранах, применяемых для модифицирования электродов.

Для модифицирования электродов применяются также гидрофобные вещества. Среди них особый интерес вызывают липидные мембраны. Электроды, модифицированные липидными мембранами, дают селективный отклик только на присутствие гидрофобных веществ, содержащих электроактивные группы. Гидрофильные вещества не проникают через такие мембраны и не концентрируются на электроде.

Инверсионную вольтамперометрию применяют и для изучения редокс-свойств твердых микрочастиц, закрепленных на электродной поверхности. Для этих целей можно использовать твердые электроды практически любого вида. Электрод с иммобилизованными микрочастицами помещают в раствор электролита и регистрируют вольтамперограмму либо проводят исследования другими электрохимическими методами.

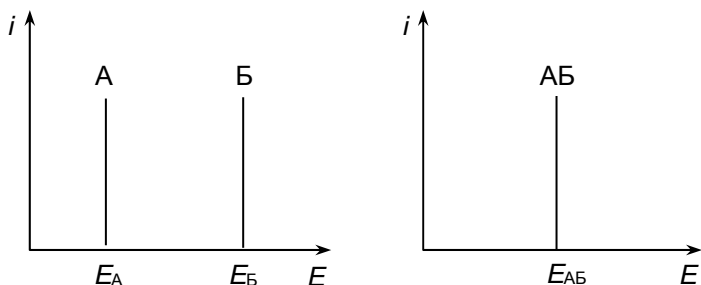
**Таблица 2.6. Мембраны, применяемые для модифицирования электродов**

Мембрана	Определяемое вещество	Мембрана	Определяемое вещество
Нафийон	Катехоламины Катехолы Ионы металлов	Полианилин Полисульфонаты	Фенол Катехолы Ионы металлов
Поливинилпиридин	Аскорбиновая кислота Мочевая кислота	Поли-(3-метил-тиофен)	Производные фенола
Ацетилцеллюлоза	Аскорбиновая кислота Гидропероксид Тиоцианаты	Нафийон/коллаген Нафийон/ацетил-целлюлоза Ацетилцеллюлоза/ поливинилпиридин	Глюкоза Допамин [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup>

Перед закреплением твердых частиц на электроде и после электрохимических измерений электрод необходимо тщательно очистить. Наиболее эффективна очистка неорганическими или органическими растворителями, такими как концентрированные кислоты при изучении оксидов металлов либо ацетон или ацетонитрил при изучении металлоорганических соединений. Можно проводить механическую очистку электрода с помощью лезвия или жесткой ткани, абразивного порошка. Полировка поверхности электрода бумагой также достаточно эффективна. После любого метода очистки поверхность электрода во избежание загрязнений рекомендуется тщательно промыть фоновым растворителем.

Существуют два основных требования к соединениям и материалам, которые можно исследовать этим методом: они должны быть нерастворимыми в растворе электролита и электроактивными, т. е. иметь способность окисляться или восстанавливаться в доступной области потенциалов. Важно, что практически нет ограничений относительно электропроводности. Даже изоляторы, подобные белому фосфору, можно изучать этим методом, поскольку в ходе электрохимической реакции, которая протекает на границе раздела фаз микрочастица/раствор, переносится достаточное количество зарядов, чтобы получить измеримые токи. Различают три типа веществ: те, которые не электроактивны, те, которые разлагаются необратимо в ходе электрохимических реакций, и те, которые могут обратимо восстанавливаться и окисляться. Последние способны обмениваться электронами с электродом и ионами – с раствором. Это свойство характерно, прежде всего, для соединений, которые могут обмениваться ионами благодаря особенностям кристаллической решетки.





**Рис. 2.10.** Примеры сигналов-откликов соединений А и Б, образующих твердый раствор АБ

ИВА твердых фаз обычно применяют для их идентификации, поскольку вольтамперограммы твердых фаз – это специфические «отпечатки» даже в тех случаях, когда природа сигналов не очевидна. Конечно, такое применение ИВА возможно лишь при сравнении вольтамперограмм с результатами исследования образцов с хорошо установленными фазами. Форма и соотношение сигналов зависят от состава фазы, количественного соотношения и природы электроактивных компонентов. Этим методом удобно и быстро можно установить состав сплавов или металлосодержащих соединений типа сульфидов, определить их соотношение в смеси.

ИВА применяется также в анализе твердых растворов. Она позволяет дать ответ на два основных вопроса: во-первых, состоит твердый раствор из одной фазы или представляет собой (механическую) смесь двух различных фаз, и, во-вторых, в случае твердого раствора из одной фазы – каков ее состав. На эти вопросы более или менее успешно можно ответить с помощью многих аналитических методов, например рентгеновской дифракции или инфракрасной спектроскопии. Однако преимущество вольтамперометрии иммобилизованных микрочастиц в том, что эти ответы для большинства образцов можно найти в течение минуты, причем даже для отдельных микрочастиц.

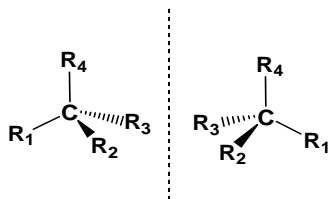
На рис. 2.10 дано схематическое изображение электрохимических сигналов двух соединений А и Б и твердого раствора АБ. При этом могут протекать как процессы окисления, так и восстановления. Это могут быть реакция восстановления, приводящая к необратимому распаду вещества, или обратимая промежуточная электрохимическая реакция. Термодинамически устойчивый твердый раствор дает один вольтамперометрический пик, тогда как смесь отдельных соединений дает два сигнала. Если изучать серию соединений различного состава в условиях строгого термодинамического контроля электрохимического отклика (применение малых скоростей сканирования), то можно обнаружить непрерывное сме-

шение сигнала по оси потенциалов при переходе от соединения А к соединению Б. Величина смещения нелинейна по двум причинам – из-за энтропии смешения и возможной неидеальности системы. Из-за энтропии смешения отклонение от линейности небольшое; например, для твердого раствора с соотношением А к Б 1:1 в случае одноэлектронной электродной реакции отклонение от линейности составляет приблизительно 0,018 В.

Приведенные примеры показывают, сколь огромны резервы в применении химически модифицированных электродов. Появление электродов, в которых избирательное концентрирование определяемого компонента осуществляется непосредственно на электроде, во многом способствовало возрождению вольтамперометрии как одного из основных методов современной аналитической химии.

## 2.4. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ В ЭНАНТИОМЕРНОМ АНАЛИЗЕ

Большинство низкомолекулярных соединений, участвующих в процессах метаболизма в живых организмах (промежуточные продукты метаболизма, питательные вещества, регуляторы и др.), присутствуют в виде оптически активных форм – энантиомеров. Например, аминокислоты, входящие в состав природных белков, имеют L-конфигурацию. Хотя в природных объектах присутствуют и D-изомеры аминокислот, в основном бактериального происхождения, они не участвуют в белковом синтезе и зачастую проявляют токсические свойства при попадании в живые организмы. Напротив, сахара в процессе биосинтеза образуются в D-конфигурации. В молекулах таких соединений имеются хиральные центры, например, атомы углерода в  $sp^3$ -гибридизации, не совместимые в трехмерном пространстве, но совпадающие при зеркальном отображении:



Помимо хиральных центров оптически активные молекулы могут иметь и другие элементы хиральности – оси и плоскости. Все оптически активные вещества вращают плоскость колебаний поляризованного света при его прохождении через раствор (явление кругового дихроизма).

Если оптически неактивные вещества или эквимольные смеси оптических изомеров, так называемые рацематы, ослабляют

интенсивность светового потока, но сохраняют плоскость поляризации света, то оптически активные изомеры поворачивают эту плоскость на определенный угол, причем разные изомеры вращают плоскость в противоположных направлениях — по часовой стрелке или против нее. Направление вращения плоскости поляризации используют для характеристики энантиомеров с помощью *R/S*-обозначений. Соответствующими буквами обозначают и хиральные центры молекул. Отметим что, в биохимии и ряде других областей науки традиционно используются принятые ранее обозначения оптически активных изомеров — *L/D* и (+)/(-).

Вопрос, почему большинство биологически активных соединений присутствует в живых организмах в виде оптически чистых форм и каким образом произошел отбор соответствующих изомеров, до сих пор остается до конца не выясненным. Заметим, что в классической химии физико-химические свойства оптических изомеров считают одинаковыми. Различия проявляются в достаточно специфичных условиях, например в реакциях с другими оптически чистыми веществами, в процессах, протекающих на границе раздела фаз или при использовании в качестве реакционной среды систем, характеризующихся высокой степенью упорядоченности на наноуровне, например биологических кристаллов, жидкокристаллических систем и т. д.

Одним из следствий этого является высокая степень зависимости биологической активности большинства синтетических и природных соединений (лекарственные препараты, пестициды, пищевые добавки и т. д.) от их энантиомерного состава. Ограниченные возможности промышленного органического синтеза, как и недооценка влияния энантиомерного состава на биологическую активность веществ, привели к тому, что в течение длительного времени биологически активные вещества выпускались и использовались в виде рацемических смесей, что, несомненно, сказывалось на их эффективности и приводило к побочным эффектам. Однако в последние годы ситуация изменилась. Освоение новых каталитических систем, способов темплатного синтеза и последующего разделения оптических изомеров сделали такие вещества практически доступными. Более высокая их стоимость по сравнению с рацемическими аналогами компенсируется высокой эффективностью применения.

Появление широкого круга энантиомерных препаратов, как и задачи контроля хиральных компонентов в процессе их производства и медико-биологического применения, требуют развития соответствующих аналитических методов определения отдельных энантиомеров как в смесях оптически активных изомеров, так и в объектах произвольного состава на фоне оптически неактивных соединений. Хроматографические методы и капиллярный электрофорез с применением хиральных неподвижных фаз, несмотря на их

эффективность, зачастую недостаточно экспрессны и относительно дороги для использования в рутинном анализе, особенно вне стационарных лабораторий. Все это обуславливает значительный и постоянно растущий интерес к развитию других методов энантиомерного анализа, в том числе на основе модифицированных электродов.

Для получения энантиодифференцированного сигнала-отклика электрода требуется взаимодействие определяемого хирального соединения (одного или в смеси энантиомеров) и хирального энантиочистого реагента, так называемого *селектора*. Такое взаимодействие определяется наличием в молекуле селектора как минимум трех центров связывания, взаимное расположение которых и характеристики взаимодействия с одним из энантиомеров определяют селективность распознавания. Универсального селектора, как и способа его синтеза и применения, не существует из-за сложности молекулярного распознавания отдельных энантиомеров. Каждый селектор имеет свою область распознавания, часто ограниченную одним конкретным соединением, которая определяется экспериментально.

Не вдаваясь в детали механизма реализации энантиоселективности взаимодействия, отметим, что есть два типа такого взаимодействия – кинетический и термодинамический. В первом случае речь идет о разной скорости взаимодействия селектора с отдельными энантиомерами, во втором – о различиях в сродстве реагентов, выражающихся в различных константах равновесия взаимодействия определяемого вещества и селектора. В общем случае можно ожидать проявления этих же механизмов при формировании сигнала-отклика энантиоселективного электрода, когда селектор иммобилизован на его поверхности. Гетерогенные условия реакции вносят свои особенности в характеристики связывания энантиомеров. Поэтому параметры селективности электрода могут не совпадать с характеристиками разделения тех же энантиомеров в гомогенных условиях.

Помимо эффективности распознавания отдельных энантиомеров, внимание уделяют и робастности сигнала-отклика, т. е. его устойчивости во времени и в присутствии переменных количеств компонентов анализируемого образца. Робастность связана с природой селектора и его микроокружения, включая особенности строения поверхности электрода. Поскольку реакции взаимодействия селектора и энантиомера определяются пространственным соответствием и взаимной ориентацией взаимодействующих групп, требования постоянства состава матрицы и микроокружения селектора для энантиоселективных электродов выражены более жестко, чем для модифицированных электродов в целом.

В соответствии с химической природой процесса распознавания энантиомеров можно выделить комплексы включения, поли-

меры с молекулярными отпечатками, элементы живых систем и их аналоги, а также селекторы на основе неорганических и органических кристаллических структур.

Как уже отмечалось, образование комплексов включения – супрамолекулярных структур типа «гость-хозяин» – во многом определяется стерическим соответствием молекул, т. е. стереоселективностью процесса. При использовании хирального «хозяина» можно с различной степенью эффективности разделять энантиомерные молекулы «гостя». К такому типу селекторов относятся циклодекстрины и макроциклические антибиотики.

Полимеры с молекулярными отпечатками, о которых шла речь выше, получают, проводя процесс полимеризации мономера или смеси мономеров в присутствии определяемого соединения. В результате в структуре полимера образуются поры, по размеру и форме подобные молекулам определяемого энантиомера. Подробно эти вопросы рассмотрены в разд. 1.2.3. После удаления энантиомера такие полимеры приобретают способность к специфической сорбции тех соединений, которые использовались для порообразования. Применение энантиомеров на стадии формирования пор в материале или в составе мономерной смеси, подвергаемой полимеризации, позволяет получить гетерогенный селектор, специфически сорбирующий из раствора преимущественно один оптический изомер. Хотя полимерная матрица, содержащая хиральные полости, обеспечивает в основном стерическое распознавание энантиомера, эффективность сорбционного накопления определяется также электростатическими, донорно-акцепторными взаимодействиями и водородными связями между функциональными группами полимера и определяемого вещества.

Следует заметить, что полимеры с молекулярными отпечатками проявляют высокую робастность, обусловленную жестко детерминированными параметрами пор – «отпечатков», задаваемыми на этапе полимеризации. В процессе эксплуатации селективность связывания падает за счет увеличения среднего размера пор, сопровождаемого утратой их соответствия параметрам молекул определяемого соединения. Это происходит вследствие механического старения полимера и остаточной пластичности его структуры.

Аналогичные молекулярные отпечатки можно получить, сочетая сорбцию хирального реагента на поверхности электрода с последующим образованием тонкой пленки полимера в условиях его электрополимеризации (см. разд. 1.2.3). При этом оптически активный компонент может не только влиять на образование пор в полимере, но и менять регулярность строения пленки, что выражается в характеристиках ее взаимодействия с энантиомером, присутствующим в анализируемом растворе. В отличие от «классических» полимеров с молекулярными отпечатками, электрополимеризованные аналоги обеспечивают поверхностное двумерное рас-

познавание, когда реакция с энантиомером протекает не в объеме полимера, а на его поверхности.

Большую группу селекторов образуют ферменты и другие биомолекулы, избирательность действия которых с отдельными энантиомерами определяется предпочтением соответствующих стереоизомеров в биохимических реакциях. В этом случае процесс распознавания выражается в ускорении биохимической реакции или преимущественном связывании одного оптического изомера в присутствии другого.

Следует упомянуть также электрохимические способы распознавания энантиомеров, когда в качестве селекторов используются высокорегулярные неорганические и органические кристаллы – монокристаллы алмаза, кварца и некоторых других материалов. Модифицированные этими материалами электроды проявляют разную способность «чувствовать» *R*- и *S*-изомеры, что выражается в смещении соответствующих пиков окисления (восстановления) или в величинах регистрируемых токов. Иными словами, такие электроды обеспечивают разделение сигналов оптических изомеров. Их важным преимуществом является отсутствие выраженной специализации. Они обеспечивают определение оптических изомеров различных веществ, в том числе структурно достаточно далеких друг от друга.

Энантиоселективность сигнала-отклика на модифицированных электродах достигается за счет включения в состав модификатора селектора, сопряженного с электродом, на котором происходит регистрация его взаимодействия с определяемым веществом. Для иммобилизации селекторов применяют все известные технологии модифицирования электродов – использование полимерных носителей, включение в биологические мембраны, методы ковалентной пришивки и физического модифицирования металлических и графитовых электродов.

Для оценки селективности энантиоселективных электродов можно использовать общие подходы, справедливые для отклика любого электрода. Обычно селективность оценивают величиной коэффициента  $K_{ij}$ . Если значение этого коэффициента больше  $10^{-3}$ , говорят о мешающем влиянии другого компонента на определение энантиомера, если  $K_{ij} \sim 10^{-3}$ , мешающее влияние можно считать приемлемым, для  $K_{ij} < 10^{-3}$  мешающим влиянием другого энантиомера, можно пренебречь. Известно уравнение, связывающее величину тока  $i_t$  и  $K_{ij}$ :

$$i_t = b \left( C_i + \sum_{j=1}^N K_{ij} C_j \right),$$

где  $C_i$  и  $C_j$  – концентрации определяемого и мешающего компонентов;  $N$  – число мешающих компонентов;  $b = (n_e A F D_i) / \delta_i$ , где

$n_i$  – число электронов, переносимых на молекулу определяемого вещества;  $A$  – площадь поверхности электрода,  $\text{см}^2$ ;  $F = 96\,500$  Кл;  $D_i$  – коэффициент диффузии определяемого вещества,  $\text{см}^2/\text{с}$ ;  $\delta_i$  – толщина диффузионного слоя,  $\text{см}$ .

Селективность электродов оценивают двумя способами: методом смешанных растворов и методом отдельных растворов. В первом случае сначала регистрируют ток электродной реакции определяемого соединения  $i_i$ , а затем сравнивают его с током  $i_t$ , регистрируемым для раствора, содержащего оба энантиомера одновременно. Коэффициент селективности рассчитывают из соотношения

$$K_{ij} = \left( \frac{\Delta i_t}{\Delta i_i} - 1 \right) \frac{C_i}{C_j},$$

где  $\Delta i_t = i_t - i_b$ ;  $\Delta i_i = i_i - i_b$ ;  $i_b$  – остаточный (фоновый) ток в отсутствие обоих веществ.

В методе отдельных растворов регистрируют токи электрода в растворах, содержащих отдельно определяемый энантиомер и мешающий изомер. Коэффициент селективности рассчитывают по формуле

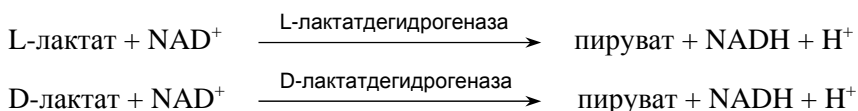
$$K_{ij} = \left( \frac{\Delta i_j}{C_j} \right) / \left( \frac{\Delta i_i}{C_i} \right).$$

Многие ферментативные реакции стереоселективны, причем избирательность превращения субстратов может наблюдаться даже в том случае, если природный субстрат оптически неактивен. Например, холинэстераза катализирует гидролиз ацетилхолина – вещества, не содержащего хирального центра. В то же время установлена стереоспецифичность его ингибирования фосфорорганическими соединениями, реагирующими с активным центром фермента. Микросомальные эстеразы с разной скоростью гидролизуют *R*- и *S*-изомеры сложных эфиров карбоновых кислот, в том числе лекарственных препаратов – миорелаксантов. Термофильные липазы проявляют выраженную стереоспецифичность реакций гидролиза сложных эфиров, содержащих ароматические и циклические алифатические фрагменты, а также их переэтерификации в органических растворителях.

Известна также стереоспецифичность оксидоредуктаз по отношению к органическим кислотам, аминокислотам и их производным. Эти реакции успешно применяются в аналитических целях для установления источника поступления соответствующего стереоизомера в организм человека, оценки качества продуктов питания и медикаментов, контроля чистоты соответствующих препаратов, получаемых в химическом синтезе. Особый интерес представляют те из них, которые реализованы в амперометрических ферментных электродах.

Так, молочная кислота (лактат-ион) присутствует в природных объектах в виде рацемата и L-изомера, который является конечным продуктом гликолиза и содержится в микроколичествах в крови и мышечной ткани. Его концентрация повышается при недостатке кислорода, например, при продолжительных мышечных сокращениях, поэтому лактат играет роль индикатора анаэробного состояния мышечной ткани. Высокий уровень L-лактата в желудочном соке является также косвенным признаком рака желудка.

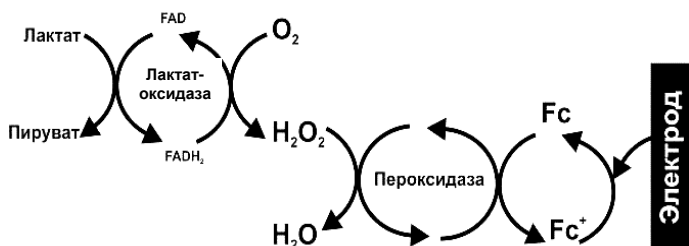
В процессе микробиологической конверсии сахаров образуется рацемическая смесь D- и L-форм молочной кислоты, которые накапливаются в кисломолочных продуктах, а также во фруктовых и овощных соках в результате действия бактерий. Присутствие D-лактата является индикатором микробного загрязнения пищевых продуктов, что используется для контроля процесса молочнокислого брожения. Селективное определение D- и L-изомеров молочной кислоты проводят с помощью электродов, в которых в качестве биологических компонентов используются D- или L-лактатдегидрогеназы. Оба фермента катализируют одну и ту же реакцию окисления молочной кислоты до пировиноградной, но с участием только одного из энантиомеров:



Основная проблема получения сигнала-отклика лактатного электрода при определении D- и L-изомеров молочной кислоты – необратимость электродной реакции регенерации кофактора NADH до  $\text{NAD}^+$ . Как и в других случаях, ее решают введением в систему медиатора электронного переноса. Медиатор может входить в состав поверхностного слоя электрода наряду с ферментом или присутствовать в растворе при измерении сигнала. В качестве медиаторов в лактатных электродах используются дипиридилные комплексы  $\text{Os}^{2+}$ , производные фенотиазина, ферроцианида, полианилина и *o*-фенилендиамин. Если L-лактатдегидрогеназа из мускульной ткани животных коммерчески доступна и используется для изготовления электродов достаточно давно, то D-лактатдегидрогеназа – сравнительно новый компонент ферментных электродов. Поэтому при создании соответствующих устройств основное внимание уделяется оптимизации условий иммобилизации фермента на электроде и измерения сигнала. При иммобилизации ферменты обычно включают в инертный полимерный носитель или в угольную пасту. В этих целях применяются и электрополимеризованные носители.

Максимальная активность ферментов наблюдается в нейтральной и слабощелочной средах. Диапазон определяемых concentra-





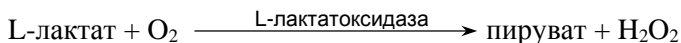
**Рис. 2.11.** Генерирование сигнала лактатного сенсора с участием пероксидазы и медиатора электронного переноса  
FAD – кофактор лактатоксидазы; Fc – поливинилферроцен

ций L-лактата с помощью ферментного электрода составляет  $n(10^{-5}-10^{-2})$  моль/л, D-изомера –  $n(10^{-4}-10^{-2})$  моль/л. Чувствительность определений можно повысить, используя для регенерации кофактора диафоразу или вводя в состав поверхностного слоя полимерные формы NADH.

Аналогичный способ определения D-лактата реализован в виде кремниевого микрочипа, рабочая поверхность которого импрегнирована нитридом кремния с иммобилизованной D-лактатдегидрогеназой и диафоразой. Микрочип позволяет определять присутствие  $5 \cdot 10^{-3}$ –15,5 ммоль/л субстрата. Чувствительность определений зависит от геометрии сенсорной части микрочипа и состава его поверхностного слоя.

Ферментные электроды на основе лактатдегидрогеназ проявляют высокую стереоспецифичность отклика. В присутствии 10-кратного избытка D-лактата сигнал на «целевой» субстрат – L-лактат – изменяется не более чем на 3 % по сравнению с контрольным опытом. Специфичность электрода для определения D-лактата еще выше; изменение тока в присутствии избытка L-лактата составляет менее 0,2 %.

Помимо лактатдегидрогеназы L-лактат можно определять с помощью лактатоксидазы – фермента, катализирующего окисление субстрата молекулярным кислородом с одновременным образованием пероксида водорода:



Концентрацию субстрата определяют по току окисления на платиновом электроде выделившегося пероксида водорода ( $E = 600$ – $650$  мВ отн. Ag/AgCl) либо по потреблению кислорода с помощью кислородного электрода Кларка. Потенциал электрода можно понизить введением в систему второго фермента – пероксидазы, иногда в сочетании с медиаторами электронного переноса. В качестве примера на рис. 2.11 приведена схема генерирования сигнала ферментного электрода, содержащего помимо лактатоксидазы

пероксидазу и медиатор – производное ферроцена. Все компоненты включены в состав композитного электрода на основе графита и тефлона.

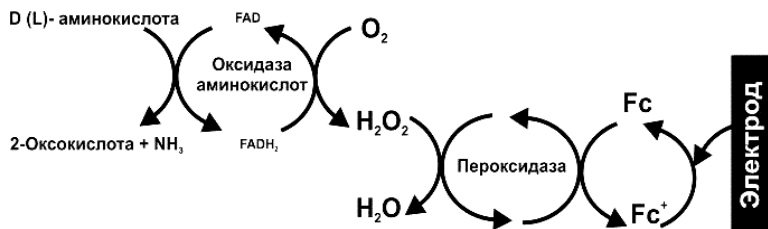
Известно большое число электродов на основе лактатоксидазы, включающих в качестве акцепторов электронов помимо производных ферроцена фенилендиамин, металлоцианаты и хиноны. Недостаточная стабильность лактатоксидазы может быть уменьшена включением ее в белковые пленки на основе альбумина.

Возможно также одновременное определение D- и L-лактатов с использованием двух ферментных электродов на основе УПЭ, один из которых содержит D-лактатдегидрогеназу, NADH и *o*-фенилендиамин, а второй – систему лактатоксидаза–пероксидаза.

Помимо электродов для определения энантиомеров молочной кислоты предложены электроды для определения D- и L-аминокислот с помощью соответствующих оксидаз с широкой и индивидуальной субстратной специфичностью. Процессы рацемизации аминокислот сопровождают некоторые технологии переработки пищевого сырья, а также его микробного загрязнения. Сигналы электродов на основе оксидаз аминокислот обусловлены анодным окислением образующегося пероксида водорода при сканировании потенциала в диапазоне от 450 до 800 мВ. Максимум активности ферментов приходится на щелочную область. Наибольший сигнал-отклик дают триптофан, метионин, лейцин и аланин.

Использование печатного графитового электрода, модифицированного частицами родия, позволяет не только понизить потенциал окисления пероксида водорода, но и повысить чувствительность определений аминокислот. В соответствии с чувствительностью определения L-аминокислоты располагаются в ряд: глицин > аланин > цистеин > фенилаланин > метионин > аргинин > аспарагин > глутамин. Для D-аминокислот последовательность следующая: валин > аланин > фенилаланин > метионин > аргинин. Значения коэффициентов селективности при определении D(L)-изомеров для всех соединений составляют  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ , за исключением D-аргинина. Для него сигнал электрода, содержащего соответствующую оксидазу, при замене D-аргинина на равное количество L-аргинина уменьшается всего в 3 раза. Чувствительность определений D-аминокислот повышается при использовании медиаторов электронного переноса, получаемых электрополимеризацией тиохинонов на золотом электроде. Установлен следующий ряд изменения чувствительности сигнала-отклика: пролин > фенилаланин > аланин > валин > лейцин.

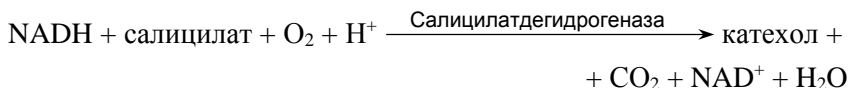
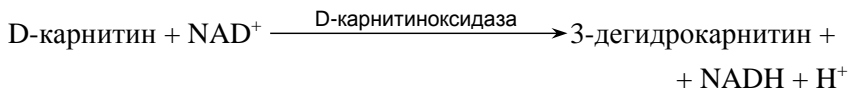
Предложен также электрод для селективного определения D- и L-аминокислот с использованием двухферментной системы оксидаза аминокислоты – пероксидаза. В переносе электрона в качестве медиатора участвует производное ферроцена. Общая схема функционирования такого электрода приведена на рис. 2.12.



**Рис 2.12.** Схема электрода для определения D- и L-аминокислот с участием оксидазы аминокислот, пероксидазы и медиатора электронного переноса на основе производных ферроцена (Fc)

Для определения D- и L-изомеров лизина применяют соответствующие оксидазы, выделенные из различных источников. Оксидазу L-лизина выделяют из *Trichoderma viride*, а оксидазу D-аминокислоты – из почки свиньи. Они имеют более высокую селективность к лизину по сравнению с другими L-аминокислотами (орнитин, аргинин и фенилаланин). Медиатором электронного переноса служит бензохинон.

Селективное определение D-карнитина проводят с использованием оксидазы из *Agrobacterium*. Разработан электрод, в котором за скоростью ферментативной реакции следят по количеству выделившегося NADH, вовлекаемого в ферментативную реакцию с салицилатдегидрогеназой:



Скорость последней реакции контролируют по количеству потребляемого кислорода. Такой электрод позволяет определять 10–600 мкмоль/л D-карнитина. Его применяют для контроля энантиочистоты препаратов L-карнитина (компонент состава для похудения), содержащих до 3 % D-изомера. Аналогичным образом, используя электроды со специфичными ферментами, можно проводить определение L- и D-пролина с помощью L- и D-пролин-дегидрогеназы, L-аланина с помощью аланиндегидрогеназы и др.

Иммобилизация оксидазы аминокислот совместно с ферментами, селективно взаимодействующими с продуктами их окисления, позволяет повысить селективность определений. Например, для определения D-аланина применяют биферментный электрод с оксидазой D-аминокислот широкого спектра действия и пируват-оксидазой. Поскольку единственным источником пирувата выступ-

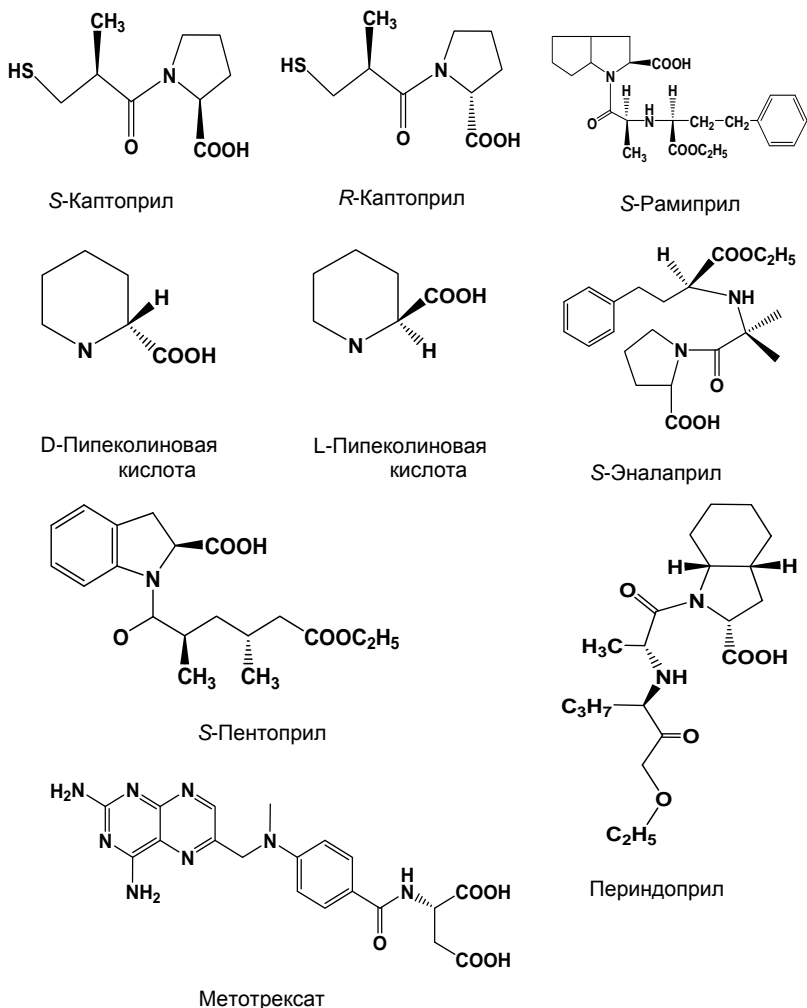
пает аланин, другие D-аминокислоты в соотношении от 1:1 до 20:1 к D-аланину практически не влияют на величину сигнала-отклика.

Разработано устройство, в котором электрод с иммобилизованной в пленке альбумина пируватоксидазой помещен в ферментный реактор, содержащий оксидазу D-аминокислот. В режиме ПИА при скорости потока 0,18 мл/мин и объеме инжестируемой пробы 50 мкл такое устройство позволяет определять от 0,1 до 1,0 ммоль/л D-аланина с пределом обнаружения 0,05 ммоль/л. Оно с успехом применяется для контроля аминокислотного состава компонентов рыбного соуса.

Оксидазы аминокислот применяются также для количественного определения энантиомеров или энантиомерной чистоты фармацевтических препаратов с гипотензивным действием, относящихся к производным пролина (рис. 2.13). В частности, они применяются для определения S-каптоприла. Каптоприл имеет в своем составе два хиральных центра и соответственно три оптических изомера, из которых только S-каптоприл соответствует требуемым биологическим свойствам. УПЭ, содержащий оксидазу L-аминокислот, позволяет определять от 2 до 100 мкмоль/л S-каптоприла с коэффициентом селективности  $1,1 \cdot 10^{-3}$ . Аналогично можно определять R-изомер, образующийся в качестве побочного продукта при промышленном производстве S-каптоприла. Для этого в состав угольной пасты вводят оксидазу D-аминокислот. Указанный способ контроля энантиочистоты каптоприла реализован в условиях ПИА. Зависимости тока окисления от концентрации субстрата линейны в диапазоне концентраций S-каптоприла от 0,4 до 1,6 мкмоль/л и R-каптоприла – от 0,12 до 0,95 мкмоль/л. Определению не мешают 100-кратные избытки второго изомера каптоприла, а также R-,S-пролина.

Аналогичная система ПИА с амперометрическим детектором реализована при определении других гипотензивных препаратов того же класса – S-эналаприла, S-рамиприла, S-пентоприла, а также R- и S-периндоприла. Диапазоны определяемых концентраций для S-эналаприла – 0,08–11,50, S-рамиприла – 0,12–0,60, S-пентоприла – 0,2–6,0 мкмоль/л, R- и S-периндоприла – 0,12–40 нмоль/л. Коэффициенты селективности изменяются от  $10^{-4}$  для R-изомера до 0,046 для R- и S-пролина. Устройство позволяет проводить до 30 анализов в час при относительной ошибке менее 1 %.

Метотрексат – производное глутаминовой кислоты с противоопухолевым действием – определяют с помощью электрода на основе оксидаз D- и L-аминокислот, аналогично каптоприлу. Чувствительность определений можно повысить, если использовать в сочетании с указанными ферментами глутаматоксидазу и пероксидазу. При этом для L-изомера предел обнаружения снижается с 4 нмоль/л до 6 пмоль/л (оксидаза и пероксидаза L-аминокислот) и 8 фмоль/л (те же два фермента и глутаматоксидаза).



**Рис. 2.13.** Лекарственные препараты – субстраты ферментных энантиоэлектродов

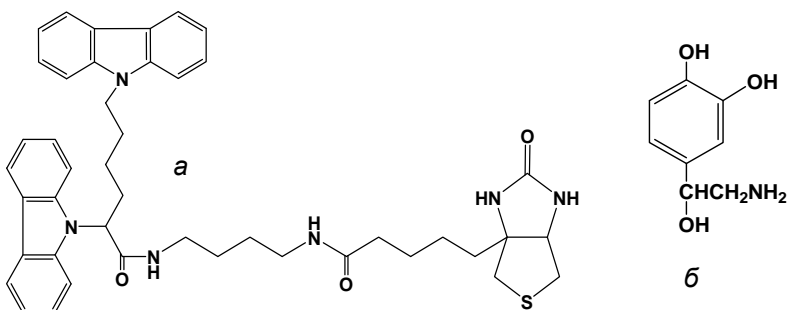
Разработан способ определения L- и D-изомеров пипеколиновой кислоты (L-2-пиперидинкарбоновой кислоты). Использован тот же подход, что и при определении лекарств на основе производных пролина – включение в угольную пасту оксидаз D- и L-аминокислот, в некоторых вариантах электродов совместно с пероксидазой. Значения коэффициентов энантиоселективности электродов составляют  $(0,15-68) \cdot 10^{-3}$  в зависимости от конструкции электрода и наличия в его составе пероксидазы. Наибольшую энантиоселек-

тивность по отношению к L-изомеру биферментный электрод имеет при измерении сигнала при 400 мВ, тогда как для D-изомера наилучший результат получен для моноферментного электрода с измерением сигнала в потенциостатическом режиме при 130 мВ.

Заметим, что оксидоредуктазы проявляют энантиоселективность по отношению не только к субстратам, но и к медиаторам переноса электронов. Так, L- и D-изомеры комплекса  $\text{Ru}^{2+}$  с 2-фенилпиридином и 1,10-фенантролином по-разному окисляются пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена. Соотношение констант скорости окисления медиаторов зависит от pH раствора. Аналогичным образом, R- и S-2-метилферроценкарбоновые кислоты, иммобилизованные на золотом электроде, проявляют различную электрокаталитическую активность в присутствии глюкозооксидазы. Окисление глюкозы в присутствии глюкозооксидазы на таком электроде протекает в 1,9 раза быстрее для S-энантиомера, чем для R-изомера. Хиральноселективный перенос электронов пока не находит широкого применения в анализе биообъектов. Тем не менее, он представляет несомненный интерес с точки зрения реализации тех или иных способов распознавания оптических изомеров.

Помимо ферментов в качестве природных селекторов используются иммуноглобулины, специфично связывающие L- и D-изомеры ряда фармацевтических препаратов и аминокислот. Однако несмотря на популярность иммуносепарации в различных вариантах хроматографии и электрофореза, соответствующие электроды практически не известны. Исключением является электрод для определения тиреоидных препаратов, применяемых при лечении заболеваний щитовидной железы – D-, L-тироксина (3,3',5,5'-тетраид-Л-тирина) и L-трийодтиронина. Сигнал L-изомеров регистрируют после их накопления на УПЭ, содержащем соответствующие моноклональные антитела. D-Тироксин определяют с помощью электрода на основе оксидазы D-аминокислот. В условиях ПИА данная система имеет практически абсолютную энантиоселективность; значение коэффициента селективности  $K_{ij}$  определения L-тироксина в присутствии D-изомера составляет  $1,5 \cdot 10^{-12}$ , а L-трийодтиронина в присутствии D-тироксина –  $1,2 \cdot 10^{-11}$ .

Биологический компонент может выполнять и роль маркера в процессе распознавания энантиомеров. При этом после энантиоселективного накопления на электроде энантиомер вступает в реакцию с биологическим компонентом, например ферментом, по которой и определяют его концентрацию. Так, при определении D-формы норадреналина для его энантиоселективного накопления на поверхности электрода применяют получаемое при анодной полимеризации в дихлорметане биотинное производное дикарбазола (рис. 2.14), которое имеет повышенную проницаемость для D-формы норадреналина. Определение норадреналина проводят по



**Рис. 2.14.** Биотиновое производное дикарбазола (а), применяемое при определении D-формы норадrenalина (б)

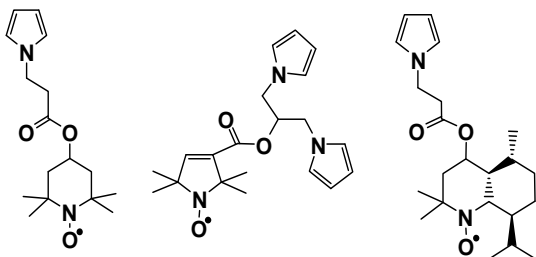
реакции его ферментативного окисления в присутствии тирозиназы, которую иммобилизуют на поверхности электрода путем авидин-биотинового взаимодействия.

Для энантиоселективного определения оптических изомеров применяют также электроды на основе электрополимеризованных покрытий с хиральными селекторами. В частности, в конце 1980-х годов были опубликованы работы, в которых обсуждались пути формирования хиральных центров, необходимых для придания специфических свойств поверхности электрода, на которой возможен энантиоселективный электросинтез. Показано, что в присутствии хемосорбированных молекул, обладающих соответствующей архитектурой, на платиновом электроде возможно энантиоселективное гидрирование хиральных  $\alpha$ -кетозэфиров. Асимметрический синтез и электрокатализ рассматриваются как процессы, взаимодополняющие друг друга и обеспечивающие необходимый выход одного из энантиомеров.

Хотя в настоящее время опубликовано большое число работ по стереоселективному электросинтезу органических соединений, следует учитывать, что соотношение получаемых изомеров редко составляет более чем 5:1, а режим электролиза не позволяет варьировать данное соотношение *in situ* в процессе получения. Это заставляет рассматривать условия стереоспецифичного электросинтеза скорее как свидетельство возможностей электрохимии в распознавании оптических изомеров. По той же причине аналогами существующих электрохимических энантиоэлектродов следует считать методы энантиоселективного разделения, где селектор обеспечивает накопление на электроде преимущественно одного изомера, а электродная реакция – его количественное превращение и генерирование сигнала-отклика.

Такой подход использован в способе энантиоселективного определения оптических изомеров 1-фенилэтанола на платиновом электроде, на поверхность которого с помощью электрополимери-

зации наносили слой полипиррола, содержащего нитроксильные радикалы, играющие роль медиаторов электронного переноса:



Полимеризацию проводили путем многократного циклирования электрода в растворе, содержащем пиррол и эти соединения. Если на «чистом» электроде 1-фенилэтанол окисляется при 1,5 В (отн. Ag/AgCl), то на модифицированном электроде окисление происходит при редокс-потенциале нитроксильных радикалов (~0,72 В). Хотя оба изомера окисляются в одной области потенциалов, ток окисления *S*-изомера фенилэтанола заметно выше. Метод использован для контроля оптической чистоты 1-фенилэтанола, в том числе в условиях ПИА.

Энантиоселективный синтез селектора на поверхности электрода в условиях электрополимеризации реализован и для полианилина. С этой целью в реакционную смесь помимо анилина вводят оптические изомеры камфоросульфоновой кислоты. В процессе электрополимеризации камфоросульфоновая кислота включается в растущую пленку полимера за счет протонирования полианилина и обеспечивает тем самым регулярность строения полимера, которая сохраняется и после его промывки водным раствором аммиака для удаления допирующего агента. Структуру хирального полианилина можно варьировать, вводя в его состав растворимые полиэлектролиты, обеспечивающие самосборку полимера за счет дополнительных кулоновских взаимодействий. В частности, добавки полиакриловой кислоты позволяют получить сферические частицы хирального полианилина, заметно отличающиеся по спектрам кругового дихроизма и по форме вольтамперограмм в зависимости от того, какой изомер камфоросульфоновой кислоты (*R*- или *S*-) вводят при электрополимеризации.

Электрод, покрытый хиральным полианилином, применяют для определения D- и L-фенилаланина методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. При этом (+)-изомер полианилина связывается преимущественно с D-изомером аминокислоты (пик окисления при +0,7 В отн. НКЭ), а (–)-изомер – с L-фенилаланином. Близость потенциалов пиков окисления фенилаланина, регистрируемых на разных металлических электродах (платина,



золото и др.), покрытых полианилином, позволяет сделать вывод о том, что полимер играет роль хиральной мембраны, обеспечивающей разделение деполяризатора на этапе его диффузионного переноса к электроду. Площадь пика пропорциональна концентрации фенилаланина в миллимолярном диапазоне концентраций.

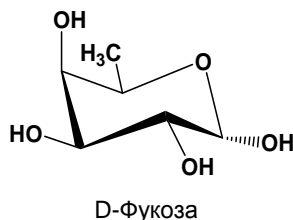
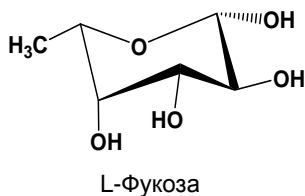
Для нанесения модификатора можно использовать технологию «молекулярных отпечатков» (см. разд. 1.2.3). Например, для модифицирования электрода ИТО (оксиды индия и олова на стекле) применяют суспензию природного катионообменного материала – монтморилловой глины. Частицы глины покрывают мономолекулярным слоем амфифильного комплекса  $\text{Os}^{2+}$ , содержащего 1,10-фенантролин (phen) и дипиридил с диоктадецильным заместителем. Модификацию частиц монтморилла проводят методом самосборки поверхностных слоев за счет электростатических взаимодействий и далее наносят их на электрод методом, аналогичным получению пленок Ленгмюра–Блодже. После осаждения частиц глины амфифильный комплекс  $\text{Os}^{2+}$  удаляют из поверхностного слоя промывкой хлороформом. Затем в образующиеся пустоты иммобилизуют оптически активный комплекс  $\lambda\text{-}[\text{Os}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2$ . За полнотой отмывки следят электрохимически по исчезновению пика восстановления/окисления  $\text{Os}^{3+}/\text{Os}^{2+}$  на циклической вольтамперограмме. В результате на электроде образуется наноразмерный слой оптически активного селектора, позволяющий определять оптические изомеры, окисляющиеся при взаимодействии с редокс-парой  $\text{Os}^{3+}/\text{Os}^{2+}$ . В частности, на таком электроде *S*-изомер 1,1'-(2-бис-нафтола) окисляется заметно быстрее по сравнению с *R*-изомером. В гомогенных условиях медиатор не проявляет стереоселективности при переносе электрона. Наблюдаемое различие в скорости электродной реакции для оптических изомеров обусловлено упорядоченной структурой монтмориллонита, обеспечивающей благоприятную координацию окисляющегося соединения относительно гетерогенного медиатора электронного переноса.

Субнаномолярные количества аминокислот, меченных наночастицами золота, разделяют сорбцией на частицах бычьего сывороточного альбумина, иммобилизованных в геле гидроксида алюминия, который получают методом золь-гель иммобилизации на поверхности стеклоглеродного электрода. Аналитическим сигналом служит ток анодного окисления золота, регистрируемый в режиме дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Для повышения чувствительности электрод обрабатывают свежеприготовленной смесью нитрата серебра и гидрохинона. При этом происходит осаждение на частицах золота коллоидного серебра, дающего более интенсивный сигнал в анодной области. Энантиоселективность электрода характеризуется соотношением токов анодных пиков, регистрируемых для D- и L-изомеров аминокислот. Для триптофана, фенилаланина, тирозина, лизина и пролина она изменяется в

диапазоне от 1,3 до 3,0. Метод имеет высокую чувствительность по отношению к аминокислотам. Например, для триптофана диапазон определяемых концентраций равен  $1,33 \cdot 10^{-12}$ – $1 \cdot 10^{-9}$  и  $1,33 \cdot 10^{-12}$ – $5 \cdot 10^{-12}$  моль/л для L- и D- изомеров соответственно с пределом обнаружения  $5 \cdot 10^{-13}$  моль/л.

Примером использования монокристаллических структур для энантиоанализа является электрод, содержащий в своем составе монокристаллы кварца или алмаза. Следует заметить, что алмаз как объект электрохимии достаточно подробно описан в литературе. Его химическая устойчивость, механическая прочность и электропроводность определяются качеством кристаллов, их микроструктурой и присутствием примесей. Допирование алмаза бором снижает сопротивление материала до 0,01 МОм/см. Полученный материал можно использовать для изготовления электродов, отличающихся широким диапазоном рабочих потенциалов и высокой устойчивостью в агрессивных средах. Мелкодисперсную пыль алмаза вводят в состав угольной пасты вместе со связующим (вазелиновое масло или жидкий парафин). Благодаря низким значениям остаточного тока модифицированные алмазные электроды позволяют определять до  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  моль/л деполаризатора.

Помимо высокой химической и электрохимической устойчивости алмазная пыль проявляет свойства селектора, позволяя разделять энантиомеры достаточно большой группы веществ. Так, применение синтетических алмазов в составе пастовых электродов позволяет раздельно определять L- и D-дезоксигалактозы (фукозы):



Указанные моносахариды присутствуют в продуктах растительного и микробиологического происхождения. В частности, L-фукоза входит в состав олигосахаридов грудного молока, в гликолипиды и гликопротеины, включая антигены крови. Изменение концентрации L-фукозы в сыворотке крови и моче является диагностическим признаком онкологических заболеваний, сопровождающихся повышением активности фукозилтрансферазы. На алмазных электродах оптические изомеры фукозы окисляются с образованием на вольтамперограммах двух раздельных пиков.

Природа алмаза влияет как на потенциал окисления фукозы, так и на величину остаточного тока, т. е. на предел обнаружения определяемого вещества. Наиболее подходящим материалом ока-

зался натуральный алмаз, на котором разность потенциалов пиков окисления L- и D-фукозы составляет 120 мВ, а значения остаточного тока – 0,9 и 17 мкА соответственно. По отношению сигнал/шум алмазные пастовые электроды существенно превосходят аналогичные стеклоуглеродные и угольно-пастовые электроды. Коэффициенты селективности  $K_{ij}$  изменяются в диапазоне от  $4 \cdot 10^{-4}$  до  $1,2 \cdot 10^{-3}$  в зависимости от содержания изомеров фукозы. Надежность определения одного изомера в присутствии другого составляет 99,5–99,7 % при их соотношении от 2:1 до 9:1. На основе такого электрода предложена методика совместного определения энантиомеров фукозы в сыворотке крови и моче человека в условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии.

Предложен также алмазный пастовый электрод для определения L- и D-пипеколиновых кислот при совместном присутствии. Соответствующие пики окисления проявляются на вольтамперограммах при 900 и 300 мВ отн. Ag/AgCl.

Помимо алмаза свойства хирального рецептора проявляют и монокристаллические металлические электроды, например платиновые. Для этого на поверхность электрода из растворов комплексов ионов меди с органическими или аминокислотами анодно осаждают оксид  $\text{Cu}^{2+}$ . Кристаллическая пленка CuO, образующаяся в щелочном растворе из (S,S)-тарtratного комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  при потенциале 0,4 В отн. НКЭ, отличается по своим кристаллографическим характеристикам от пленки, полученной из раствора комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  с (R,R)-тартратом. Таким образом, хиральность кристаллической формы CuO наследуется от хиральности матрицы комплексов  $\text{Cu}^{2+}$ . Циклические вольтамперограммы растворов тартратов S,S- или R,R-конфигурации на хиральном электроде, модифицированном CuO, содержат кривые разной формы, потенциалы пиков которых отличаются на 50–60 мВ. Хотя разность потенциалов пиков, соответствующих отдельным энантиомерам тартратов, невелика, она показывает, что подход к созданию хиральных кристаллических поверхностей электродов и их использование в электроаналитической химии имеет перспективы.

Электроокисление на хиральных поверхностях монокристаллов Au, Pt, Pt и др. используется для определения D-глюкозы. В общем случае можно утверждать, что на строго ориентированной кристаллической поверхности электрода будет наблюдаться различие в энергиях адсорбции энантиомеров определяемых соединений, что отражается на их электрохимических параметрах, например на положении и форме пиков на циклических вольтамперограммах.

Рассмотренные примеры использования модифицированных электродов для энантиоселективного определения различных органических соединений позволяют сделать вывод о том, что конечный успех при разработке таких электродов определяется в пер-

вую очередь свойствами селектора, обеспечивающего селективное связывание определяемого изомера с его последующим вовлечением в биохимическую реакцию, молекулярный комплекс либо превращение на электроде. Не случайно многие селекторы с равным успехом используются в составе амперометрических и потенциометрических сенсоров. Вместе с тем, ряд перспективных направлений энантиоразделения, включая использование иммунореагентов и полимеров с молекулярными отпечатками, только «нащупывает» области своего применения в сенсорных технологиях. То же можно сказать и об использовании для энантиомерного анализа электрохимических процессов, для которых разделение энантиомеров связано с изменением энергетических характеристик переноса электрона в результате взаимодействия энантиомеров с поверхностью монокристалла. Имеющиеся примеры таких электродов не вполне удовлетворяют требованиям количественного определения энантиомеров, особенно в смеси, и нуждаются в дальнейшем совершенствовании материалов электродов. В частности, многое может дать сочетание указанного подхода с методами мономолекулярной модификации электродов жидкокристаллическими непроводящими материалами либо липофильными самоорганизующимися слоями.

Говоря о перспективах энантиосенсоров, следует отметить, что практически все приведенные примеры так или иначе связаны с задачами фармацевтического анализа. Вместе с тем, имеются области применения энантиосенсоров в контроле пищевой продукции, экотоксикологии и медицине. Это свидетельствует о важности изучения энантиоселективных электродов и их практического применения для решения аналитических задач.

## **2.5. ЭЛЕКТРОДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦАМИ И ИОННЫМИ ЖИДКОСТЯМИ**

На рубеже веков аналитическая химия вышла на предельный уровень своих возможностей – детектирование единичной молекулы. Появились новые междисциплинарные научные направления, которые обозначают терминами с приставкой «нано». К ним относятся наноэлектрохимия и наноэлектроанализ. Основной особенностью нанонауки являются размерные эффекты, которые обуславливают принципиальные отличия между нано- и обычными макрообъектами. В публикациях последних лет размерные эффекты, их разнообразие и способы проявления обсуждаются весьма подробно. При этом следует отметить, что даже при отсутствии возможностей решения общей проблемы, ответы на некоторые частные вопросы уже получены. Появились понятия «наносенсор» (нано-биосенсор), «наноархитектура» (применительно к модифицирующим слоям сложного состава с высокой степенью упорядоченности), «наноструктура» (нанотрубки и др.), «наноэлектрод», «нано-

технология» и т. д. В этих терминах отражается одна из заметных тенденций в развитии электроаналитической химии – миниатюризация химического анализа. Она проявляется в последовательной смене пределов обнаружения (от микро- и нано- до пико- и фемтограммов) и в миниатюризации измерительных и детектирующих устройств. Объем информации непрерывно растет, но проблемы пока остаются.

Прежде всего это касается нижней границы нанохимии, в том числе наноэлектролиза. Полагают, что она скорее определяется здравым смыслом, чем строго количественными критериями, в частности тем, как соотносятся понятия «наночастица» и «нанореактор». Принципы методов электролиза и электролиза на микро- и ультрамикроэлектродах уже сами по себе предполагают существование микро- и нанореакторов. Простой пример – двойной электрический слой. Если, подобрав соответствующие оптимальные условия (состав раствора, pH, концентрация электроактивного вещества, размер электрода, потенциал, время электродной реакции и т. д.), провести восстановление или окисление вещества, то можно создать на поверхности электрода слой частиц (продуктов электролиза), размер которых будет определяться пределами 10–80 нм или несколько более. Расположение таких частиц, занимаемую ими площадь, геометрическую форму (адатомы, кластеры, кристаллиты, ансамбли и т. д.) исследуют, применяя физические методы – атомно-силовую и электронную микроскопию, рентгеновскую спектроскопию и др.

Для описания поведения электроактивных частиц в нанореакторах используются методы квантовой химии. Эти же методы применяются не только при исследовании поверхностных слоев модификаторов неорганического происхождения (адатомы и кластеры металлов, их оксиды и комплексы), но и слоев органических молекул и полимеров. К последним можно отнести слои ДНК, антител и ферментов, самоорганизующиеся ансамбли, в том числе и слои бифильных молекул, напоминающие мембраны живых клеток. В ходе электрохимической реакции в нанореакторах на поверхности электрода генерируется либо каталитический ток субстрата, либо сигнал его распознавания.

В настоящее время выявились два вектора развития исследований в этом направлении – «сверху вниз» и «снизу вверх». Методология создания модифицирующей поверхности на электроде с электрокаталитическим откликом или с откликом по типу распознавания органического субстрата отражает с позиций нанохимии движение «снизу вверх». Действительно, в ходе электродной реакции сначала появляются отдельные атомы металла или молекулы его оксида (комплекса). Затем идет их рост до некоторой оптимальной величины, при которой и проявляется наибольший эффект. Проводя электролиз на электродах, покрытых полимерными

пленками, можно регулировать размер частиц электрокатализатора, площадь, занимаемую ими на поверхности электрода, и число «посадочных мест». Каждую из таких частиц можно рассматривать как своего рода ультрамикроразмерный электрод с наноразмерами. Он генерирует свой ток, а вся совокупность наночастиц – суммарный каталитический ток, который выше, чем ток, возникающий на поверхности электрода со сплошной пленкой модификатора. При этом заметно возрастает отношение сигнал/шум.

Исследования показали, что использование наноразмерных частиц модификаторов заметно расширяет диапазон определяемых концентраций и отодвигает нижнюю границу. Например, модифицирование электрода наноразмерными частицами берлинской лазури расширяет диапазон амперометрического отклика на пероксид водорода до семи порядков определяемых концентраций.

Из сказанного выше следует, что для получения наночастиц на поверхности электрода, прежде всего, нужно правильно подобрать исходный реагент, или *прекурсор*. Прекурсор, из молекулы которого при электролизе возникает наночастица, может находиться в исходном растворе или быть иммобилизован в пленке на поверхности электрода. Например, наночастицы берлинской лазури как катализаторы на пероксид водорода, наночастицы металлов или их оксидов как электрокатализаторы на органические субстраты, наконец, наночастицы золота или висмута для электроконцентрирования в инверсионной вольтамперометрии – все они возникают в ходе электродной реакции. Наноструктурированные покрытия по технологии «снизу вверх» из отдельных молекул могут быть созданы и в ходе процессов самосборки.

Электрохимия, в частности вольтамперометрия, имеет многочисленные примеры, в которых возникающие на электроде частицы (реагенты) отличаются по своим параметрам (потенциалу пика, величине тока и др.) от «объемных» аналогов, т. е. тех, которые вступают в электродную реакцию за счет диффузии из глубины раствора. Вероятно, отличие в реакционной способности частиц *in status nascendi* и доставленных из глубины раствора связано с размерными эффектами, проявляющимися в нанореакторах, или с различной ориентацией относительно активных центров на поверхности электрода.

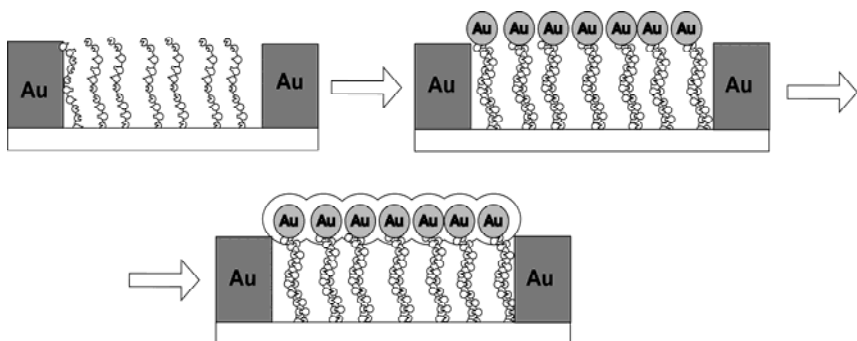
Другой подход в рамках наноэлектроанализа основан на применении не прекурсоров, из которых на электроде возникают наночастицы, а самих наноматериалов. Это естественный путь, при котором осуществляется переход от микроструктур к наноструктурам. История развития химических сенсоров в течение последних 10–15 лет показывает, что прогресс в создании новых устройств с амперометрическим откликом (собственно сенсоры, датчики, детекторы и т. д.), обладающих требуемыми операционными и аналитическими характеристиками, тесно связан с использованием

новых материалов. В настоящее время интенсивно развивается «нанотехнология» – научное направление, находящееся на стыке физики, химии, материаловедения и молекулярной биологии. Для химиков это направление не ново. Такие области, как коллоидная и супрамолекулярная химия, гетерогенный катализ уже более ста лет имеют дело с объектами нанометровых размеров – наночастицами металлов, наопленками, макромолекулами, кластерами. Несомненный интерес в плане развития методов электрохимического анализа, в том числе и вольтамперометрии, приобретает использование новых материалов, полученных методами нанотехнологии. Конструирование модифицированных электродов с применением уже готовых наночастиц позволяет повысить эффективность отклика, ориентированного, прежде всего, на определение биологических компонентов. Это связано с тем, что именно в этой области достигнуты наиболее реальные результаты.

Отметим еще раз, что нанохимия находится в стадии становления, поэтому постоянно возникают вопросы, связанные с понятиями и терминами. В частности, пока не сформулированы четкие различия между терминами «наночастица» и «кластер». Последний термин чаще используется для обозначения частиц, содержащих небольшое число атомов, а термин «наночастица» – для более крупных агрегатов размером от 1 до 10 нм с числом атомов от  $10^2$  до  $10^6$ . Изучение свойств наночастиц и путей их практического применения, в том числе для модифицирования электродов, составляет одно из направлений нанонауки.

Следует заметить, что с уменьшением размеров частиц понятие фазы теряет свое значение; границы между фазами, между аморфным и кристаллическим состоянием вещества определить довольно трудно. Обычные химические понятия такие, как «состав – свойство», «структура – функция» и др., дополняются представлениями о размере и структурной организации частиц, от которых зависят их свойства. Тем не менее несмотря на успехи нанохимии, пока невозможно заранее ответить на вопрос о влиянии на свойства наночастиц их размеров, поскольку частицы размером около 1 нм практически без энергии активации вступают в процессы агрегации с другими химическими соединениями, обуславливая получение веществ с новыми свойствами. Избыточная поверхностная энергия и высокая каталитическая активность наночастиц определяются в первую очередь некомпенсированностью связей поверхностных и приповерхностных атомов, что является причиной возникновения необычных явлений и реакций. Величины удельной поверхности наночастиц лежат в диапазоне 10–100 м<sup>2</sup>/г. Для них характерна и высокая степень дефектности кристаллической решетки.

В частности, это свойство наночастиц используется для закрепления на поверхности электрода «самоорганизующихся» моно-



**Рис. 2.15.** Планарный импедансометрический ДНК-сенсор, содержащий наночастицы золота

слоев рецепторов или модификаторов, отличающихся прочным контактом с носителем (см. разд. 1.2.1). Самоассоциация иммобилизованных молекул в различные наноархитектурные ансамбли обеспечивает преобразование содержащейся в них информации в сигнал-отклик.

Стратегия применения наночастиц в электрохимическом анализе в большинстве случаев сводится к нанесению их на поверхность электрода и модифицированию специфическими высокоселективными реагентами, в том числе биохимическими, либо в момент получения, либо сразу после него. Наночастицы могут выступать в роли компонентов поверхности электрода, повышающих селективность и/или чувствительность как сами по себе, так и в роли носителей модификаторов. В частности, немало исследований последних лет посвящено получению конъюгатов ДНК-Au, содержащих различное число олигонуклеотидов на одну наночастицу. Коллоидное золото успешно используется для увеличения абсолютного количества ДНК, приходящегося на ту же площадь электрода.

В качестве примера на рис. 2.15 приведена схема планарного ДНК-сенсора, содержащего наночастицы золота. Гибридизация с участием меченных наночастицами золота олигонуклеотидов приводит к образованию в зазоре между электродами самособирающегося электропроводящего слоя из частиц золота. При этом заметно снижается сопротивление сенсора, которое можно измерить импедансометрически.

Для иммобилизации наночастиц на электродной поверхности применяют плазменное напыление металла, химическое восстановление, физическую адсорбцию, введение мелкодисперсных нанопорошков в объем неорганических и полимерных матриц, ковалентное связывание и другие способы. В качестве модификаторов используются наночастицы как индивидуальных атомов – Au, Pt,



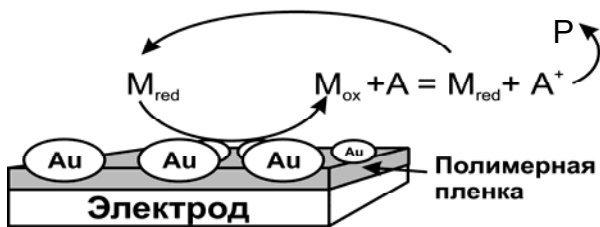
Pd, Rh, Os, Ag, Fe, Ni, Cu, Bi, так и бинарных сплавов или простых молекул – Pd-Rh, Pd-Ru, Rh-Ru, Pt-Ru, Pt-Os, Ru-Os, Au-Pd, Au-Rh, Au-Ru, Au-Pt, Au-Os, SnO<sub>2</sub>, ZnO, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, а также фуллерены и углеродные нанотрубки. Использование нестационарных методов, таких как импульсный электролиз и переменноточковая вольтамперометрия, способствует образованию нанодисперсных металлических покрытий. Число образующихся нанокристаллов (кластеров) можно оценить из временной зависимости регистрируемого тока:

$$i(t) = \frac{nF \pi (2DC)^{3/2} M^{1/2} Nt^{1/2}}{\rho^{1/2}},$$

где  $C$  – объемная концентрация,  $M$  – атомная масса,  $\rho$  – плотность,  $D$  – коэффициент диффузии иона металла;  $t$  – время электролиза.

Высокая каталитическая активность наночастиц снижает перенапряжение редокс-реакций многих веществ, которые на обычных электродах окисляются (восстанавливаются) необратимо. Например, электрохимическое определение допамина в присутствии аскорбиновой кислоты возможно на стеклоуглеродном электроде, покрытом монослоем наночастиц золота. Последние снижают потенциал окисления аскорбат-ионов, оказывая каталитическое действие, в то время как на золотом электроде указанный эффект не наблюдается. Это в свою очередь позволяет зарегистрировать пик окисления аскорбиновой кислоты в присутствии допамина. Электроды, модифицированные наночастицами Pt, Pd и Ir, применяются для определения глюкозы, гидразина, метанола, альдегидов. Наночастицы из биметаллов – Pt-Os, Au-Pd, Au-Ru, Au-Os – катализируют перенос электронов при определении допамина, адреналина, аскорбиновой и мочевой кислот. Активность нанокристаллов (кластеров) обусловлена изменением морфологии и энергии граничных орбиталей молекул субстратов, а также электронного состояния атомов металла в кластере. На проявление размерных эффектов могут влиять также условия проведения эксперимента.

Заметим, что использование наночастиц и наноструктур металлов встречает затруднение из-за метастабильности последних в нанокристаллическом состоянии. Это связано с увеличением удельной поверхности частиц по мере уменьшения их размеров до нанометровых, что приводит к возрастанию химической активности металла и усилению процессов агрегации. Для предотвращения коагуляции и для защиты от внешних воздействий осаждение наночастиц проводят в присутствии стабилизаторов, например поверхностно-активных веществ или соединений, способствующих образованию металлоорганических или металлокомплексных соединений, или же наночастицы включают в химически инертную матрицу, например в мембраны из глиозема и полимерных материалов.



**Рис. 2.16.** Схема электрода, модифицированного наночастицами золота, выполняющими роль каталитических центров

Среди металлов наиболее популярны наночастицы золота, получаемые обычно путем катодного или химического восстановления соответствующих солей. Например, потенциостатический электролиз тетрахлороауратов позволяет получить на стеклоуглеродных электродах наночастицы золота размером  $\sim 80$  нм. Кроме того, имеется большое число коммерческих препаратов, содержащих наночастицы золота, модифицированные органическими реагентами (обычно по тиольным группам). Их используют в различных вариантах иммуноанализа, поскольку перенос коллоидных частиц из раствора на поверхность носителя приводит к изменению цвета, что можно использовать для визуального детектирования реакции.

Золотые нанодисперсные электроды получили распространение при определении ароматических аминов и фенолов, склонных к полимеризации. На обычных гладких электродах это приводит к пассивации, а также к значительному увеличению потенциала окисления. Наноструктурированные покрытия золота обеспечивают более высокую обратимость процесса переноса электрона и снижают перенапряжение, что расширяет диапазон определяемых концентраций и повышает селективность определения дофамина и ряда других биологически активных соединений. На рис. 2.16 приведена схема электрода, модифицированного наночастицами золота, выполняющими роль каталитических центров.

Покрытие поверхности электрода наночастицами золота возможно не только на гладком золотом электроде, но и на стеклоуглероде и высокоориентированном пирографите. При этом степень заполнения поверхности остается небольшой – 30 % при катодном электроосаждении из водных растворов. Одним из способов повышения удельной концентрации наночастиц является использование линкеров, ковалентно связанных с поверхностью и удерживающих частицы второго и последующего слоев. Так, для формирования полислоев наночастиц золота для последующего определения монооксида азота применяют диметиламинопиридин. Достоинством данного реагента является то, что его можно отмыть из поверхностного слоя после осаждения наночастиц. Однако сле-

дует учитывать, что такая архитектура слоя снижает эффективность электрокатализа.

Особые свойства наночастиц золота проявляются и при включении их в пасту. Так, присутствие уже 0,006 % золота в нанодисперсном виде заметно улучшает характеристики УПЭ на основе графита при определении органических соединений. Такие электроды применяются для определения пероксида водорода, гидрохинона и допамина. Для снижения агрегации частиц в процессе приготовления пасты добавляют поверхностно-активные вещества, например альбумин.

Изменяя организацию наночастиц на поверхности электрода, их состав и окружение, можно управлять селективностью и чувствительностью. Большое значение имеет число слоев наночастиц, закрепленных на электроде, и природа сшивающих реагентов. В частности, чувствительность измерений при определении *n*-гидрохинона на электроде ИТО, модифицированном наночастицами золота, стабилизированными циклофанами дипиридила, возрастает с увеличением количества слоев на поверхности. При замене циклофанов на нециклический *N,N'*-диаминоэтил-4,4'-дипиридил сигнал *n*-гидрохинона исчезает. Отработанная на *n*-гидрохиноне схема детектирования успешно применена для определения дигидроксифенилуксусной кислоты, адреналина и допамина.

Другие металлы для получения в нанодисперсном виде требуют особых подходов, направленных на стабилизацию образующихся частиц и их защиту от агрегации и окисления. Так, для серебра предложен метод катодного осаждения с использованием растворимого анода в качестве источника серебра. Электролиз в однокammerной ячейке с алюминиевым катодом позволяет получить электрод, содержащий кластеры серебра, размер которых зависит от присутствия стабилизаторов (соли тетраалкиламмония) и условий электролиза. Получение коллоидных растворов кластеров серебра возможно как в результате химического восстановления, например с помощью  $\text{NaBH}_4$  в ацетонитриле, так и электрохимического. Предварительная модификация электрода поливинилпиридином стабилизирует наночастицы, способствуя уменьшению среднего размера кластеров.

Наночастицы серебра проявляют высокие электрокаталитические свойства в реакциях переноса электрона с некоторых белков и кофакторов, например гемоглобина. Соответствующие гибридные покрытия зарекомендовали себя при определении широкого круга низкомолекулярных субстратов. Например, при определении NO удается избежать мешающего влияния аскорбиновой кислоты, допамина, катехола, мочевой кислоты (электрод модифицировали наночастицами серебра и гемоглобином). Предложены модифицированные электроды на основе нанодисперсного серебра, осаждаемого поверх оксидов металлов (электрод ИТО), на стеклоуглероде и

пирографите. Хотя детали образования нанокластеров и условия их роста по сравнению с аналогичными частицами золота остаются зачастую невыясненными, в некоторых случаях наночастицы серебра имеют очевидные преимущества по сравнению с гладкими электродами и микрокристаллическим золотом. Например, вследствие более высокого отклика в условиях инверсионной вольтамперометрии серебряные наночастицы обеспечивают более высокую чувствительность определений в электрохимическом иммуноанализе. Electrodes с наночастицами серебра применяются также для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  с пределом обнаружения 1 мкмоль/л, сульфидов и тиолов.

Наночастицы платины получают путем химического (действием гидразина, борогидрида натрия) или электрохимического восстановления гексахлороплатинатов. Как и наночастицы золота, нанодисперсная платина привлекает внимание сочетанием высокой каталитической активности и устойчивости в широком диапазоне потенциалов. В сочетании с другими гетерогенными медиаторами электронного переноса ее применяют для увеличения электропроводности поверхностного слоя. Например, наночастицы платины и углеродные нанотрубки используются для получения амперометрического отклика на глюкозу, метанол, альдегиды и органические кислоты. Поскольку прямой контакт частиц металла и углеродных нанотрубок осложнен малой площадью их поверхности, используют предварительную модификацию нанотрубок нафтином с последующим осаждением гидрокolloидов платины. Аналогичным образом наночастицы наносят на углеродное волокно. Композиты наночастиц платины и углеродных нанотрубок на стеклоуглероде демонстрируют сверхвысокую чувствительность при определении пероксида водорода; предел обнаружения равен 25 нмоль/л, тогда как стеклоуглерод, покрытый только наночастицами платины, позволяет определять лишь 1,5 мкмоль/л пероксида водорода, а стеклоуглерод, модифицированный однослойными нанотрубками – до 150 нмоль/л.

Каталитическую активность наночастиц платины обычно контролируют с помощью модельных реакций – восстановления молекулярного кислорода и пероксида водорода. В последнее время большое внимание уделяется реакции окисления метанола в связи с перспективами его использования в топливных элементах. Как известно, эта реакция не протекает на углеродных материалах, но вполне осуществима на платине. Однако эффективность окисления уменьшается из-за адсорбции оксида углерода. Переход к нанодисперсной платине существенно снижает величину перенапряжения при окислении CO. Это позволяет реализовать процесс не только на Pt-электроде, но и на стеклоуглероде, модифицированном наночастицами платины. Дополнительное повышение эффективности электрокатализа наблюдается при совместном осаждении на элек-

трое платины и рутения, которые образуют смешанные кластеры с высокой каталитической активностью.

Наночастицы никеля в углеродной матрице, получаемые при микроволновом испарении металла, применяются для неферментативного определения сахаров. По сравнению с графитовым электродом, покрытым сплошной пленкой никеля, внедрение наночастиц позволяет повысить механическую и электрохимическую устойчивость покрытия, которое в обычных условиях достаточно легко отслаивается от электрода. Вторым преимуществом такого покрытия является присутствие наночастиц оксидов никеля, поскольку электрокатализ окисления сахаров связан с образованием оксидов  $\text{Ni}^{3+}$ , которые химически взаимодействуют с определяемыми соединениями. В данном случае они присутствуют в составе нанокластеров изначально.

Методы физического диспергирования позволяют получить наночастицы никеля размером до 2 нм, электрохимические – коллоидные растворы с агрегатами больших размеров. Стандартный способ получения наночастиц никеля основан на растворении никелевого анода с последующим восстановлением катионов никеля на платиновом катоде. В зависимости от условий наночастицы осаждаются на катоде или могут оставаться в коллоидном растворе. Ограничение роста зародышей достигается за счет введения в раствор стабилизаторов, например бромида тетраоксиламмония. Второй способ получения дисперсного никеля – совместное катодное выделение металла и водорода. Особенность данного способа – формирование нанокристаллов кубической решетки при полном отсутствии оксидов никеля.

Проблема ограничения процесса окисления имеет место и при формировании коллоидных растворов и наноразмерных покрытий меди. Стабилизация наночастиц меди достигается добавлением нафтона либо понижением температуры раствора при электролизе. Печатные графитовые электроды, модифицированные наночастицами меди, применяются для определения кислорода, дигидроксифенолов, глюкозы, аминокислот. Они же катализируют восстановление нитрат-иона с пределом обнаружения 1,5 мкмоль/л. Как и в случае никеля, действующим веществом в электрокаталитических процессах выступает смешанный оксид меди  $\text{CuO/Cu}_2\text{O}$ . Известны модифицированные электроды, содержащие в своем составе и другие нанодисперсные металлы, такие как, молибден, железо, хром, кобальт и др.

Перспективным направлением применения наночастиц в составе модифицирующих слоев является их включение в полимерные матрицы, получаемые как путем электрополимеризации, так и из растворов в органических растворителях. При этом наночастицы обуславливают электропроводимость слоя, а молекулы полимера выполняют функции их стабилизации и фиксирования. Электрон-

ный обмен между деполяризатором и электродом осуществляется в таких системах достаточно быстро. Изменяя последовательность модифицирования, можно закрепить на поверхности электрода наночастицы с иммобилизованными молекулами белков (ферменты, кофакторы, ДНК и др.) и медиаторов электронного переноса. В ряде случаев это позволяет обойти стерические ограничения переноса электрона с кофакторов белков и других органических соединений сложного строения. При этом беспрецедентно увеличивается скорость электронного обмена. Так, перенос электрона от глюкозооксидазы через наночастицу золота, закрепленную на полианилиновой пленке, и тиольный линкер осуществляется без дополнительных низкомолекулярных посредников со скоростью порядка  $5\,000\text{ с}^{-1}$ . При таком контакте сигнал сенсора нечувствителен к кислороду, что позволяет высокоселективно определять глюкозу. Предложен вариант, в котором фермент и наночастицы золота содержатся в объеме УПЭ.

Наночастицы могут непосредственно не участвовать в индикаторных реакциях на электроде, но менять физико-химические свойства окружающих молекул. Например, при иммобилизации полифенолоксидазы в полипиррольной матрице уменьшается ее специфическая активность. При добавлении к полимеру наночастиц глины (лапонита) чувствительность определений полифенолов возрастает на порядок.

Следует заметить, что в электродах на основе наносистем большое значение имеет процесс прохождения электрона через слои, пограничные между наночастицами и поверхностью электрода. При этом он может осуществляться за счет туннельного эффекта, что снижает активационный барьер и приводит к существенному увеличению скорости переноса электрона. Введение в состав двойного электрического слоя молекул, обеспечивающих туннельный эффект, позволяет получить оптимальное значение сигнала. Одним из необходимых условий этого является разработка методов синтеза нанопроводов, с помощью которых наночастицы присоединяются к электроду.

Относительно новый подход к использованию наночастиц в электрохимическом анализе – использование наночастиц в инверсионной вольтамперометрии с участием биологических молекул. Это реакции гибридизации ДНК, образование комплексов антиген-антитело и др. Наночастицы с короткоцепочечными олигонуклеотидами рассматриваются как основа для конструирования наноразмерных электронных устройств – молекулярных нитей, диодов и логических цепей на их основе.

Ковалентная пришивки наночастиц металлов (наноточки, разработанные и применяемые в оптических микроэлектронных устройствах) к ДНК или антителам позволяет регистрировать процессы разделения с участием этих молекул. Молекула ДНК сама по

себе электрохимически не активна. Поэтому ее «метят» наночастицами золота, серебра, железа, микросферами из магнитовосприимчивых материалов. В качестве сигнала-отклика служит электрохимический отклик металла-трейсера, регистрируемый на электроде.

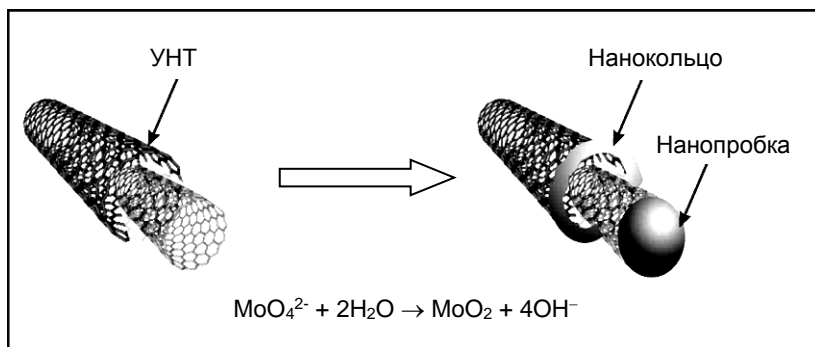
Существует несколько разновидностей этого метода. В одном из них молекулы ДНК модифицируют наночастицами металла, и после связывания с определяемой ДНК реакционную массу растворяют. Далее определяют содержание металла-трейсера. Обычно применяют наночастицы золота и серебра, которые присоединяют к ДНК с помощью стрептавидин-биотинового взаимодействия и наносят на поверхность пористых полистирольных гранул, содержащих хитозановые или полипиррольные поверхностные слои. Это позволяет определять пико- и наномолярные концентрации ДНК. Чувствительность определений можно повысить осаждением дополнительных количеств наночастиц золота или серебра после стадии гибридизации. В таком случае предел обнаружения снижается до пико- и фемтомолярных концентраций. В качестве трейсеров применяются также наночастицы сульфида кадмия. Их последующее растворение и определение ионов  $\text{Cd}^{2+}$  позволяет детектировать до 100 фмоль/л меченых олигонуклеотидов. Этот способ реализован в «лаборатории на чипе».

Заметим, что таким способом можно определять несколько компонентов одновременно. В этом случае для каждого из определяемых веществ подбирают свой вид наночастиц. Необходимое условие – пики ионов на вольтамперограммах не должны перекрываться. Например, в условиях инверсионной вольтамперометрии одновременно можно определять  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и, следовательно, четыре различные последовательности ДНК.

Определение ДНК возможно и без разрушения наночастиц. При этом сигнал-отклик возникает за счет непосредственного окисления золота на поверхности модифицированного графитового электрода при 1,25 В с последующим восстановлением  $[\text{AuCl}_4]^-$  при 0,4 В.

Аналогичным способом можно определять и некоторые белки. В этом случае вместо комплементарных полинуклеотидов используют антитела к определяемым антигенам, например пару иммуноглобулин G и антииммуноглобулин G. После обработки комплекса кислотой определяют концентрацию золота. Нижняя граница определяемых содержаний лежит в области пикомолярных концентраций.

Для повышения чувствительности определений на поверхность наночастиц золота перед стадией растворения химически или электрохимически осаждают серебро, количество которого пропорционально числу наночастиц золота. На таком принципе основан метод определения стрептавидина. Для этого на поверхности УПЭ закрепляют конъюгат альбумина и биотина, и после связыва-



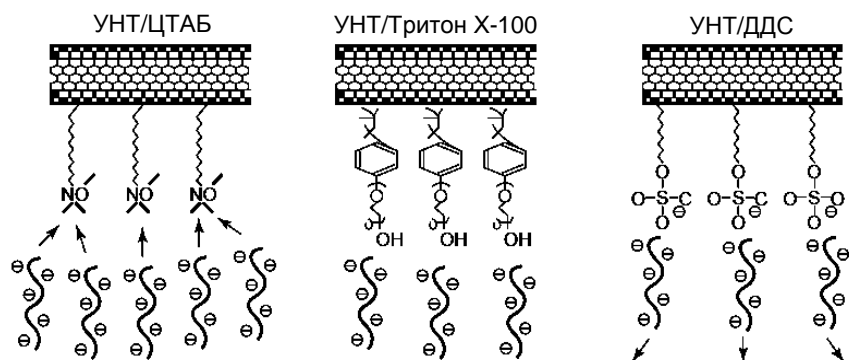
**Рис. 2.17.** Схема введения оксида молибдена в углеродную нанотрубку

ния последнего со стрептавидином проводят модифицирование наночастицами золота. На полученные сандвич-комплексы электрохимически осаждают серебро. С помощью данной методики удастся определять стрептавидин в диапазоне фемтомолярных концентраций.

Другим перспективным наноразмерным объектом являются углеродные нанотрубки (УНТ). Особенности строения углеродных нанотрубок (см. разд. 1.1.1) являются причиной того, что их свойства существенно отличаются от свойств фуллеренов. Фуллерены имеют небольшой внутренний объем, в котором могут поместиться лишь несколько атомов других элементов, тогда как у углеродных нанотрубок внутренний объем существенно больше. При этом металлы и их оксиды, вводимые в полости нанотрубок (рис. 2.17), могут служить маркерами в иммунохимических реакциях и ДНК-зондах. Инкапсулирование маркера внутри углеродной нанотрубки более желательно, чем его размещение на поверхности, хотя бы потому, что таким путем удастся избежать стадии пришивки маркера к молекуле белка.

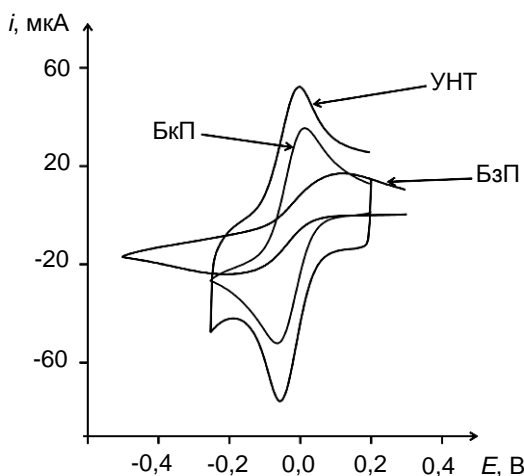
УНТ неспецифически сорбируют молекулы белков и других органических соединений, при этом на поверхности электрода образуются компактные упорядоченные структуры. Функциональные группы, образующиеся при обработке нанотрубок кислотами или полиэтиленоксидом, могут вовлекаться в реакции ковалентной пришивки или электростатического удерживания других модификаторов, включая ПАВ, водорастворимые белки, красители и т. д. (рис. 2.18). Нанотрубки применяются также в качестве носителей кофакторов ферментов, например NADH. Активные центры на боковых плоскостях углеродных нанотрубок, которые присутствуют в них на концах и вдоль оси в местах, где слои графита прерываются (см. рис. 1.6, с. 31), являются основной причиной усиления электрокаталитических эффектов при использовании УНТ (рис. 2.19).



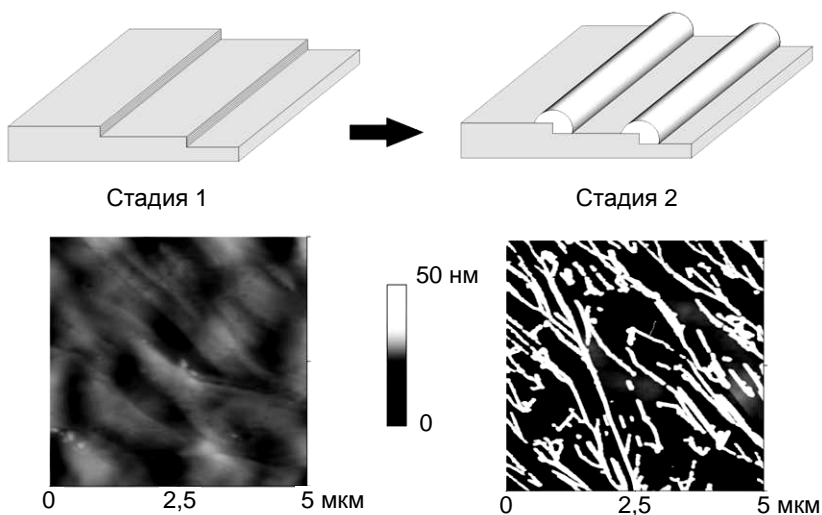
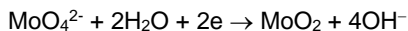


**Рис. 2.18.** Примеры электростатических взаимодействий между ПАВ, адсорбированными на поверхности УНТ, и отрицательно заряженными молекулами ДНК (ЦТАБ – бромид цетилтриметиламмония, ДДС – додецилсульфат)

Подтверждение роли боковых плоскостей в электрокатализе с участием УНТ получено в ходе экспериментов с электродами из высокоупорядоченного пирографита, для которого расстояние между ступенями больше обычного и может составлять 5–10 мкм. Наименьшее значение константы скорости переноса электрона  $k_s$  для ферроцианида соответствует пирографиту с наименьшим количеством дефектов поверхности.



**Рис. 2.19.** Циклические вольтамперограммы 1 ммоль/л феррицианид-иона в 0,1 моль/л водном растворе КСl на пирографите, модифицированном пленкой из углеродных нанотрубок: Бз – базисная плоскость; БкП – боковая плоскость; УНТ – углеродные нанотрубки



**Рис. 2.20.** Схема процесса получения нанопроводов на основе  $\text{MoO}_2$

Среди уникальных свойств углеродных нанотрубок следует отметить возможность регулирования их проводимости путем изменения структуры, так как углеродные нанотрубки типа «кресло» или «зигзаг» обладают металлическими или полупроводниковыми свойствами соответственно. Некоторые углеродные нанотрубки могут проводить электрический ток с плотностью до  $10^9 \text{ A/cm}^2$ , тогда как для металлов максимальная плотность тока составляет  $10^5 \text{ A/cm}^2$ . Огромные различия в проводимости и плотности тока позволяют использовать УНТ в качестве электродов при измерениях *in vivo*. Перспективны подходы, позволяющие организовывать наноструктуры с контролем проводимости на молекулярном уровне за счет введения молекул-вставок (спейсеров). Таким путем можно создавать трехмерные и двумерные наноматериалы с регулируемой проводимостью (нанопровода), которые формируются либо на основе нанотрубок, либо на основе наноканалов, заполненных наночастицами (рис. 2.20).

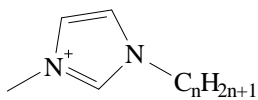
Следует заметить, что для появления и развития того или иного направления нанотехнологии необходимо наличие современной научной базы по синтезу, исследованию и испытанию наночастиц и наноматериалов, в том числе и их токсичности. В масштабе нанометров даже нетоксичное вещество может оказаться настоящим ядом. Такие риски вполне реальны, поскольку токсичность структур нанометровых размеров может заметно отличаться от

токсичности того же самого по химическому составу вещества, когда оно имеет макроскопические размеры. Учитывая, что толщина спирали молекулы ДНК равна примерно 2 нм, а размер клеток крови – приблизительно 7500 нм, можно ожидать сильного изменения биологической активности элементов в наночастицах. Например, инертность золота и серебра хорошо известна, однако кластеры этих металлов, состоящие из нескольких атомов, проявляют уникальные каталитические свойства, а наночастицы серебра демонстрируют отчетливо выраженную антибактериальную активность.

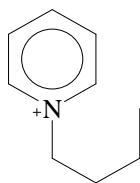
Известно также, что в фуллеренах и углеродных нанотрубках стенки имеют атомарную толщину. В природе ни нанотрубки, ни фуллерены, по общему мнению, сами по себе возникнуть не могут. Предвидеть последствия, которые могут повлечь их необычные свойства, если они покинут пределы лаборатории, совсем не просто. Достаточно внести незначительные изменения в технологию получения нанотрубок, чтобы их характеристики существенно изменились. В настоящее время в общей сложности насчитывается более тысячи разновидностей нанотрубок и нетоксичность одной нанотрубки не означает отсутствие токсичности у другой, пусть даже и похожей на первую. Обычно, когда изучается токсичность вещества, исследуется, как это вещество воздействует на лабораторных животных. В случае с наноматериалами такой подход неэффективен, поскольку свойства наночастиц зависят не только от природы атомов, входящих в их состав, но от размеров частиц и их структуры. Зачастую токсикологам трудно установить, какой именно наноматериал они изучают в данный момент.

В целом результаты токсикологических тестов в отношении углеродных нанотрубок неутешительны. Иногда их сравнивают даже с асбестом, ответственным во многих случаях за возникновение онкологических заболеваний легких. Кроме сходства с асбестом эксперты отмечают необычайное сходство УНТ с частицами, содержащимися в выхлопах дизельных двигателей. Вдыхание таких частиц в той же степени, что и курение, влияет на здоровье человека и в первую очередь на его сердечно-сосудистую систему. Углеродные нанотрубки могут проникать через кожу непосредственно в кровоток и повреждать кровеносные сосуды. Разумеется, «лабораторные» нанотрубки более «чистые», и именно поэтому они оказывают меньшее воздействие на организм человека по сравнению, например, с копотью. Следует как можно быстрее выявить и снизить до минимального уровня опасность, скрытую в высокой биологической активности наноматериалов.

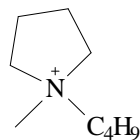
Методология получения наноматериалов *in situ* непосредственно на электроде в ходе электрохимической реакции имеет несомненные преимущества перед химическим синтезом. При этом исследователь не контактирует непосредственно с наночастицами, которые генерируются на электроде сначала в виде отдельных ато-



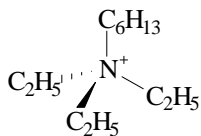
Имидазолий,  $[C_n\text{mim}]$



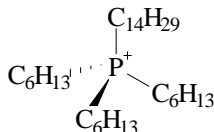
Пиридиний,  $[C_4\text{pyr}]$



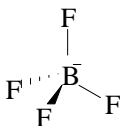
Пирролидиний,  $\text{Py}_{14}$



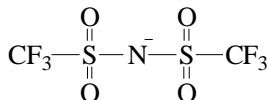
Тетраалкиламмоний,  $\text{N}_{6222}$



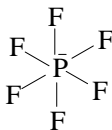
Тетраалкилфосфоний,  $\text{P}_{14,666}$



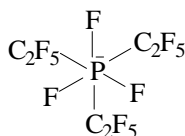
Тетрафторборат,  $\text{BF}_4$



Бис(трифторметилсульфонил)имид,  $\text{NTf}_2$



Гексафторфосфат,  $\text{PF}_6$



Трифтор-трис(пентафторэтил)фосфат,  $\text{FAP}$

**Рис. 2.21.** Катионы и анионы, образующие ионные жидкости

мов, а затем достигают оптимального размера. Изменяя условия электролиза можно регулировать размер наночастиц, толщину модифицирующего слоя, свойства электродной поверхности и др.

В последние несколько лет наряду с наноматериалами отмечено повышенное внимание исследователей к ионным жидкостям (ИЖ) – расплавам органических солей, жидким при комнатной температуре. Уникальность их свойств обусловлена сочетанием гидрофобности и ионного характера, термической устойчивости и высокой электропроводности, негорючести и малого давления па-

ров, причем изменением природы объемных органических катионов и слабокоординированных неорганических анионов (рис. 2.21) можно регулировать эти свойства в широком диапазоне. Малая токсичность многих ИЖ позволяет отнести их к классу растворителей, отвечающих современным экологическим требованиям, т. е. использовать в «зеленой химии».

С позиций электрохимического анализа наиболее перспективными являются ионообменные свойства ионных жидкостей и их способность пластифицировать полимерные материалы – такое сочетание позволяет использовать ИЖ в качестве компонентов мембран ион-селективных электродов и пластификаторов в составе полимерных покрытий и графитовых паст при модифицировании электродов в вольтамперометрии. Так, например, введение ИЖ в графитовую пасту повышает ток окисления допамина в 2,5 раза. В этом случае ИЖ выступает одновременно в роли проводящего связующего и экстрагента, извлекающего протонированные формы катехоламинов в объем электрода. При этом, чем гидрофобнее катехоламин, тем более эффективно он извлекается в ионную жидкость и тем выше ток его окисления.

Все ионные жидкости условно можно разделить на две большие группы. Первую образуют водонерастворимые ИЖ, например гексафторфосфат 1-бутил-3-метилимидазолия и бис(трифторметилсульфонил)имид 1-децил-3-метилимидазолия. Они способны образовывать пленки на поверхности стеклоуглеродных электродов при их использовании в водных растворах. Такие системы пригодны к эксплуатации в средах с переменной влажностью, в том числе в отсутствие воды, что делает их перспективными для включения в состав электрохимических газовых сенсоров, топливных ячеек и батарей. Водорастворимые ионные жидкости можно использовать и в водных растворах, если подобрать достаточно гидрофобные анионы, снижающие их растворимость в воде, например, при замене хорошо растворимых гексафторфосфат-анионов бис-трифлилимидными анионами.

Влияние природы ионных жидкостей на величину сигнала отклика модифицированных электродов неоднозначно. Если в основе их действия лежит экстракционное концентрирование определяемого вещества по катионообменному механизму, с ростом гидрофобности катиона ИЖ эффективность извлечения снижается. Например, в случае катехоламинов регистрируемый ток их окисления снижается в ряду: 1-бутил-3-метил-имидазолий > 1-бутил-2,3-диметилимидазолий > 1-(2-этилгексил)-3-этилимидазолий < дифенилдодецилэтилфосфоний. Однако применение для модифицирования электродов менее гидрофобных катионов ограничено их растворимостью в воде.

Свойства анионов ИЖ оказывают также большое влияние на операционные характеристики электродов. Обычно вязкость ИЖ

**Таблица 2.7. Электропроводность и вязкость ионных жидкостей и некоторых органических растворителей при 25 °С**

Растворитель	Электропроводность, мОм <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>	Вязкость, мПа·с
N,N-Диметилформамид	4,0*	0,80
Диметилсульфоксид	2,7*	1,99
Ацетонитрил	7,6*	0,34
Этанол	0,6*	1,07
[C <sub>2</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	8,4	28
[C <sub>4</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	3,9	44
[C <sub>8</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	–	74
[C <sub>2</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	13	43
[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	5,2	275
[N <sub>6222</sub> ][NTf <sub>2</sub> ]	–	167

\* В присутствии 0,1 моль/л перхлората тетрабутиламмония

на 1–2 порядка выше, чем вязкость традиционных растворителей (табл. 2.7). Бис-трифторметилсульфонилимидные анионы снижают не только растворимость ИЖ в воде, но и их вязкость, что ускоряет диффузию электроактивных частиц и скорость их накопления в объеме электрода. Несмотря на то что ионные жидкости могут содержать медиаторы электронного переноса, чрезвычайно низкая скорость массопереноса в этих растворителях снижает электропроводность. Поскольку толщина диффузионного слоя в ИЖ гораздо меньше, чем в традиционных растворителях, низкая скорость диффузии должна учитываться при анализе экспериментальных данных.

Электропроводность ионных жидкостей не сильно отличается от электропроводности обычных растворителей с добавками электролитов фона. Остаточные примеси воды уменьшают их вязкость, но сужают область рабочих потенциалов. Добавление воды к некоторым водонерастворимым ИЖ, например к бромиду или нитрату 1-децил-3-метилимидазолия, приводит к формированию гелеподобных систем, обладающих большой емкостью как по отношению к наноразмерным объектам (УНТ), так и к биополимерам. Аналогичные свойства проявляют некоторые полиэлектролиты, такие как нафийон или полистиролсульфонат. ИЖ и их гели оказывают стабилизирующее действие на ферменты, что открывает дополнительные возможности по использованию ионных жидкостей в составе биосенсоров. В частности, иммобилизация лакказы в геле ИЖ-УНТ на поверхности графитового электрода используется в амперометрических сенсорах, чувствительных к кислороду и ионам-ингибиторам – фторид-, хлорид- и бромид-ионам. Адсорбция гемоглобина

и глюкозооксидазы на гелях ИЖ-УНТ реализована в биосенсорах для определения пероксида водорода и глюкозы. Предложен аналогичный сенсор для определения допамина в присутствии мочевой и аскорбиновой кислот.

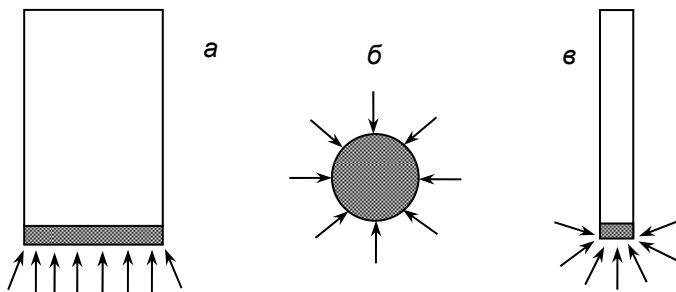
Ионные жидкости могут служить в качестве связующего графитовых паст в угольно-пастовых электродах. Например, подобная композиция используется в УПЭ, содержащем полиоксомолибдат в качестве катализатора восстановления нитрит-ионов. Пасты на основе ИЖ применяются в УПЭ для определения допамина, фенолов, прометазина, катехоламинов.

Чаще всего ИЖ применяются в газовых датчиках (ячейках Кларка). В большинстве электрохимических датчиков используются обычные растворители, неспособные выдерживать значительные перепады температуры, срок службы которых часто определяется скоростью высыхания раствора электролита и газопроницаемостью мембраны. Способность ИЖ выдерживать высокую температуру и давление позволяет использовать их в условиях, когда традиционные растворители изменяют свои физические или химические свойства. Широкий диапазон рабочих потенциалов позволяет работать с газами, определение которых ранее было недоступно. Кроме того, благодаря высокой электропроводности отпадает необходимость в использовании фоновых электролитов. Несколько ограничивает возможности ИЖ их чувствительность к влажности атмосферного воздуха. Это вынуждает проводить измерения после тщательной осушки газов или применять ячейки специальной конструкции.

Использование ионных жидкостей в вольтамперометрии перспективно не только для создания модифицированных электродов, но и для увеличения области рабочих потенциалов при выборе электрохимического окна по оси потенциалов, в котором регистрируется амперометрический сигнал. Описаны также амперометрические ион-селективные электроды, в которых сигналом служит ток ионного обмена на границе ионная жидкость/раствор.

## 2.6. УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОДЫ

В условиях линейной диффузии к плоскому электроду зависимость фарадеевского тока от времени электролиза пропорциональна  $t^{-1/2}$ . Казалось бы, что токи на ультрамикродэлектродах также должны описываться этой зависимостью. Однако с уменьшением размера электрода до нескольких микрометров расширение фронта диффузии из-за «краевого эффекта» и, следовательно, увеличение объема, из которого может диффундировать электроактивное вещество, приводят к тому, что при использовании ультрамикродэлектродов быстро устанавливается квазисферический диффузионный режим. При этом вещество диффундирует от периферии электрода к цент-



**Рис. 2.22.** Потоки диффузии вещества к плоскому (а), сферическому (б) и ультрамикроэлектроду (в)

ру (рис. 2.22, в). Его концентрация вблизи центра зависит от величины потока диффузии к поверхности электрода. Теория показывает, что сферический эффект проявляется на всех электродах конечных размеров.

Поэтому уравнение сферической диффузии с успехом применяется для описания диффузионных токов на ультрамикроэлектродах (УМЭ). Именно квазисферический характер диффузии является причиной того, что на ультрамикроэлектродах при достаточно больших  $t$  устанавливается постоянное значение тока в соответствии с выражением

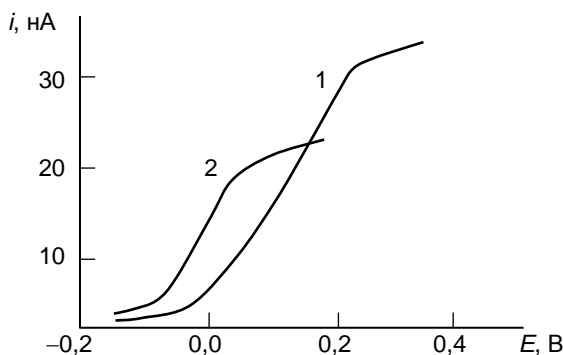
$$i(t) = nFAD \left( \frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right) C^0 = nFAD \frac{C^0}{\sqrt{\pi Dt}} + nFAD \frac{C^0}{r_0}.$$

Первое слагаемое в этом выражении зависит от  $t$  и характеризует нестационарную составляющую тока, которая одинакова для бесконечно плоской и сферической поверхностей. Второе слагаемое представляет стационарный ток, который не изменяется со временем, но зависит от размеров поверхности электрода  $A$ . Для обычных электродов ( $r_0 \sim 1$  мм) размеры электрода существенно превышают толщину диффузионного слоя и нестационарный ток достаточно долго остается больше стационарного ( $\sim 5$  мин), тогда как для ультрамикроэлектродов ( $r_0 \sim 10$  мкм) диффузионный ток быстро достигает предельного значения  $nFADC^0/r_0$  для соответствующей концентрации  $C$ .

В отличие от микроэлектродов вольтамперограммы на ультрамикроэлектродах напоминают классические полярограммы с горизонтальным плато. При этом должно лишь выполняться условие

$$\nu \ll \frac{RT}{F\tau} = \frac{RT\pi D}{Fr_0^2},$$





**Рис. 2.23.** Вольтамперограммы  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора ферроцена в ацетонитриле на платиновом (1;  $r_0 = 15$  мкм) и стеклоуглеродном (2;  $r_0 = 3,5$  мкм) ультрамикроэлектродах

где  $v$  – скорость развертки напряжения;  $\tau$  – время, необходимое для достижения стационарного состояния.

Поскольку  $\tau = r_0^2 / \pi D$ , а  $r_0$  для ультрамикроэлектродов в 1000 и более раз меньше соответствующих значений для микроэлектродов, стационарные значения тока на ультрамикроэлектродах достигают своей величины при более высоких скоростях развертки напряжения.

Омическое падение напряжения ( $\Delta U_0$ ), которое особенно сильно проявляется при измерениях в неводных средах, для ультрамикроэлектродов сказывается в меньшей степени. В случае сферических ультрамикроэлектродов для  $\Delta U_0$  справедливо выражение

$$\Delta U_0 = \frac{i}{4\pi} \int_{r_0}^{\infty} \frac{dr}{r^2} = i / 4\pi\chi r_0,$$

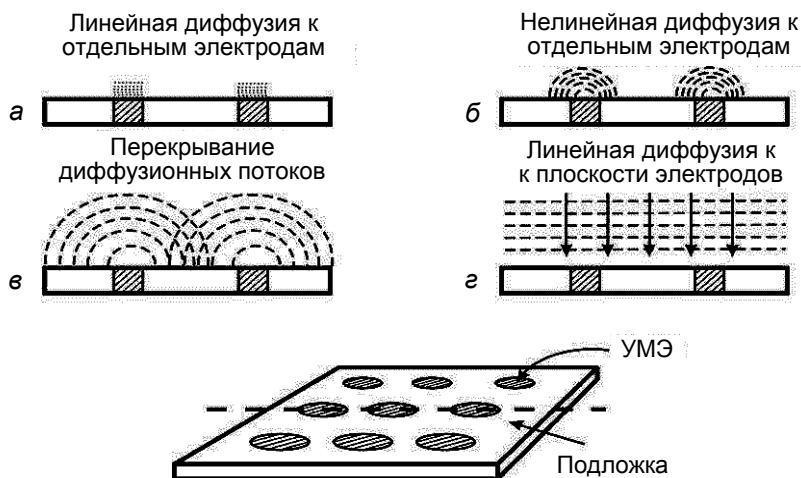
где  $\chi$  – удельная электропроводность раствора электролита. Поскольку ток  $i$  определяется соотношением

$$i = 4\pi r_0^2 j,$$

то в итоге формула для омического падения напряжения имеет вид

$$\Delta U_0 = r_0 j / \chi.$$

Таким образом,  $\Delta U_0$  не зависит от расположения электрода сравнения и определяется только сопротивлением раствора вблизи ультрамикроэлектрода. Кроме того, при постоянной плотности тока  $j$  чем меньше радиус электрода, тем меньше  $\Delta U_0$ . Этот результат справедлив и для других ультрамикроэлектродов. Расчеты показывают, что в тех случаях, когда ток достигает предельного значения, омические потери не зависят от геометрии электрода. На рис. 2.23

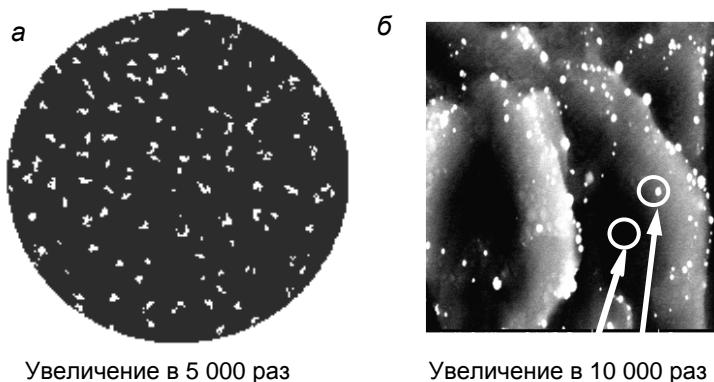


**Рис. 2.24.** Диффузионные потоки к поверхности ансамбля УМЭ

приведены вольтамперограммы окисления ферроцена в ацетонитриле на платиновом и стеклоуглеродном дисковых ультрамикроэлектродах. Из рисунка видно, что они практически не искажены омическими составляющими, тогда как на обычных электродах такую форму они имеют лишь при концентрации фонового электролита  $\geq 0,1$  моль/л. С помощью ультрамикроэлектродов получены вольтамперограммы различных веществ в бензоле, толуоле, гексане и других растворителях с низкой диэлектрической проницаемостью и крайне низкой проводимостью.

Низкие значения  $\Delta U_0$  позволяют проводить определения даже в чистых растворителях без добавления фонового электролита. Однако в малополярных средах из-за большого сопротивления раствора добавление фонового электролита все-таки необходимо. Иногда достаточно лишь небольшой концентрации фоновой соли, соизмеримой с концентрацией электроактивного вещества. Заметим, что хотя проблема омических потерь для ультрамикроэлектродов имеет меньшее значение по сравнению с обычными электродами, тем не менее, работа в средах с высоким сопротивлением требует осторожности. Главным образом это относится к оценке потенциалов, когда затруднен выбор электрода сравнения. Другой фактор, который необходимо учитывать, – миграция электроактивного вещества, несущего заряд, к электроду при малой концентрации индифферентного электролита.

Известно также, что высокое сопротивление электрохимических ячеек препятствует использованию больших скоростей развертки потенциала при исследовании кинетики переноса заряда и



Увеличение в 5 000 раз

Увеличение в 10 000 раз

**Рис. 2.25.** Микроструктуры ансамбля золотых ультрамикроэлектродов *а* – ТГЭ/Au(ПДТК)<sub>2</sub>Cl (ПДТК – пирролидиндитиокарбамат); *б* – ТГЭ/HAuCl<sub>4</sub>

превращений продуктов электрохимической реакции из-за искажения вольтамперограмм вследствие возрастания  $\Delta U_0$  с ростом тока, пропорционального  $\nu^{1/2}$ . На ультрамикроэлектродах подобные измерения можно проводить в диапазоне 10–100 нс. Высокие скорости развертки позволяют существенно уменьшить время регистрации аналитического сигнала.

При использовании УМЭ можно работать по двухэлектродной схеме, так как отпадает необходимость компенсации омических потерь в случае высоких скоростей развертки поляризующего напряжения. Проблема измерения малых токов на уровне нано- и пикоампер решается с помощью современной высокочувствительной электрохимической аппаратуры или применения ансамбля УМЭ.

Численное моделирование процесса диффузии к поверхности ансамбля УМЭ позволило выделить два предельных случая (рис. 2.24). В начальный момент, пока толщина диффузионного слоя мала по сравнению с размерами электродов, массоперенос осуществляется в режиме полубесконечной линейной диффузии к каждому отдельному УМЭ и суммарный ток пропорционален линейным размерам электродов (рис. 2.24, *а*). Спустя некоторое время диффузионные потоки перекрываются, и диффузия идет в том же режиме, но уже ко всей поверхности электрода (рис. 2.24, *з*). В промежуточный период проявляется краевой эффект отдельных ультрамикроэлектродов, приводящий к росту тока (рис. 2.24, *б* и *в*).

Наиболее широкое применение в вольтамперометрии находят ультрамикроэлектроды из Pt, Au, Ag, Ir. Неметаллические УМЭ получают из углеродных графитированных и стеклоуглеродных нитей и угольных паст. Они отличаются химической стойкостью и хорошей электропроводностью. В отличие от металлических УМЭ, отличающихся многообразием форм (полусферические, конусные,

цилиндрические, дисковые, в виде диска с кольцом и др.), углеродные УМЭ в основном имеют форму диска.

Для получения УМЭ-ансамблей применяют методы микроэлектроники, электронно-лучевые и ионные технологии, фото- и литографию. На рис. 2.25 показана микроструктура поверхности толстопленочного графитового электрода (ТГЭ), модифицированного соединениями золота. Ее можно рассматривать как ансамбль достаточно крупных УМЭ. Основная часть поверхности занята частицами  $\text{Au}(\text{ПДТК})_2\text{Cl}$  размером 0,15 мкм на расстоянии 3 мкм друг от друга (рис. 2.25, а). Частицы  $\text{HAuCl}_4$  локализованы в виде более крупных скоплений размером 4–5 мкм (рис. 2.25, б).

Логическое развитие УМЭ – электроды на основе нанокomпозитов, наноструктур и наночастиц. Интерес к ним вызван как принципиально новыми свойствами наноматериалов, так и перспективами создания сенсоров и устройств с широкими функциональными возможностями. Так, в качестве амперометрического биосенсора на пероксид водорода применяют ультрамикроэлектрод на основе углеродного волокна, модифицированного наночастицами платины. Последние катализируют перенос электронов между электроактивными центрами фермента, в качестве которого служит пероксидаза хрена, и ультрамикроэлектродом. Такой электрод применяют для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Величина сигнала линейно зависит от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в диапазоне концентраций от  $6,4 \cdot 10^{-7}$  до  $3,6 \cdot 10^{-3}$  моль/л с коэффициентом корреляции 0,9953 и пределом обнаружения  $3,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л при отношении сигнал/шум, равном 3. Большой каталитический эффект наблюдается при формировании на электроде равномерной мелкодисперсной структуры наноразмерных частиц палладия. Использование такого электрода по сравнению с УМЭ на основе макрокристаллического осадка  $\text{Pd}$  позволяет на порядок снизить нижнюю границу определяемых концентраций.

Для определения пероксида водорода применяют стеклоуглеродный электрод, на поверхность которого нанесен нанокристаллический осадок берлинской лазури. Благодаря тому, что осаждение медиатора проводят в присутствии непроводящих добавок, тормозящих рост кристаллов, наблюдается нанодисперсное распределение последних и как следствие – сверхвысокая чувствительность электрода, фактически представляющего собой ансамбль УМЭ, к пероксиду водорода.

Для определения никеля в клетках печени предложен УМЭ из углеродного волокна, модифицированного тетраakis-(3-метокси-4-гидроксифенил)порфирином. Ультрамикроэлектроды, модифицированные ферментами, применяют для оценки динамики работы нейротрансмиттеров *in vivo*. Кислород в протоплазме клеток определяют с помощью УМЭ, полученного пиролизом бутана внутри стеклянного капилляра с последующим осаждением платины.

**Таблица 2.8. Примеры применения УМЭ для определения низкомолекулярных веществ и биологически активных соединений**

Вещество	Образец	Электрод	Лит-ра*
Глутамат	Мозговая ткань	C	[1]
	Нервное волокно	Pt	[2]
		C	[3]
Ацетилхолин и холин	Мозговая ткань	C	[4]
		Pt/Ir	[5]
Лактат	Мозговая ткань	C	[6]
Серотонин	Моча	C	[7]
	Сыворотка крови	C	[8]
Аденозин	Спинной мозг	Pt	[9]
Допамин	Мозговая ткань	Pt/Ir	[10]
Аденозинтрифосфат	Спинной мозг	Pt/Ir	[11]
	Искусственная мембрана	Pt	[12]
Оксид азота	Мозговая ткань	C	[13]
	Нервное волокно	C	[14]
Глюкоза	Мозговая ткань	C	[15]
Инсулин	Клеточная ткань	C	[16]
Кислород	Культура клеток	Pt	[17]

\* [1] Wittstock G., Yu K.-J., Halsall H. B. et al. // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 3578. [2] Zhao C., Wittstock G. // Angew. Chem. 2004. Vol. 43. P. 4170. [3] Zhao C., Sinha J. K., Wijayawardhana C. A., Wittstock G. // J. Electroanal. Chem. 2004. Vol. 561. P. 83. [4] Antonenko Y. N., Pohl P., Rosenfeld E. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 333. P. 225. [5] Berger C. E. M., Horrocks B. R., Datta H. K. // J. Endocrinol. 1998. Vol. 158. P. 311. [6] Horrocks B. R., Wittstock G. // Scanning Electrochemical Microscopy. N.-Y., Basel: Marcel Dekker, 2001. P. 445. [7] Turyan I., Matsue T., Mandler D. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 3431. [8] Nowall W. B., Dontha N., Kuhr W. G. // Biosens. Bioelectron. 1998. Vol. 13. P. 1237. [9] Rosenwald S. E., Dontha N., Kuhr W. G. // Anal. Chem. 1998. Vol. 70. P. 1133. [10] Tiefenauer L. X., Padeschte C. // Chimia. 1999. Vol. 53. P. 62. [11] Mandler D., Meltzer S., Shohat I. // Isr. J. Chem. 1996. Vol. 36. P. 73. [12] Mandler D. // Scanning Electrochemical Microscopy. N.-Y., Basel: Marcel Dekker, 2001. P. 593. [13] Tenent R. C., Wipf D. O. // J. Electrochem. Soc. 2003. Vol. 150. P. E131. [14] Nowall W. B., Wipf D. O., Kuhr W. G. // Anal. Chem. 1998. Vol. 70. P. 2601. [15] Kranz C., Gaub H. E., Schuermann W. // Adv. Mater. 1996. Vol. 8. P. 634. [16] Wilhelm T., Wittstock G. // Angew. Chem. 2003. Vol. 42. P. 2247. [17] Sauter S., Wittstock G. // J. Solid. State Electrochem. 2001. Vol. 5. P. 205.

В отличие от ион-селективных микроэлектродов, которые дают отклик лишь на отдельные ионы металлов и органические соединения, вольтамперометрические УМЭ позволяют определять более широкий круг биологически активных веществ (табл. 2.8).

Прежде всего они применяются для определения *in vivo* нейротрансмиттеров типа дофамина и серотонина, их метаболитов и предшественников: 3,4-дигидроксифенилуксусной, 5-гидроксииндолилуксусной и аскорбиновой кислот, 5-гидрокситриптофана и др. Однако в таких экспериментах всегда возникает вопрос, адекватно ли отражают имплантированные УМЭ содержание нейротрансмиттеров в тканях или лишь в той области, где преобладают поврежденные в результате имплантации участки. Как оказалось, в случае УМЭ диффузионный слой распространяется на расстояние, превышающее область нарушения структуры, например мозговой ткани, что позволяет выделить эти электроды по операционным характеристикам, особенно по сравнению с ион-селективными микроэлектродами, которые реагируют на изменение активности ионов непосредственно у поверхности мембраны.

Следует заметить, что до недавнего времени биологически активные вещества определяли *in vivo* лишь в больших клетках центральной нервной системы, размер которых сравним с диаметром УМЭ. В настоящее время с помощью нанотехнологии разработаны электроды, которые позволяют использовать их для проникновения в клетки обычных размеров без повреждения последних.

## 2.7. МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНЫЕ СИСТЕМЫ

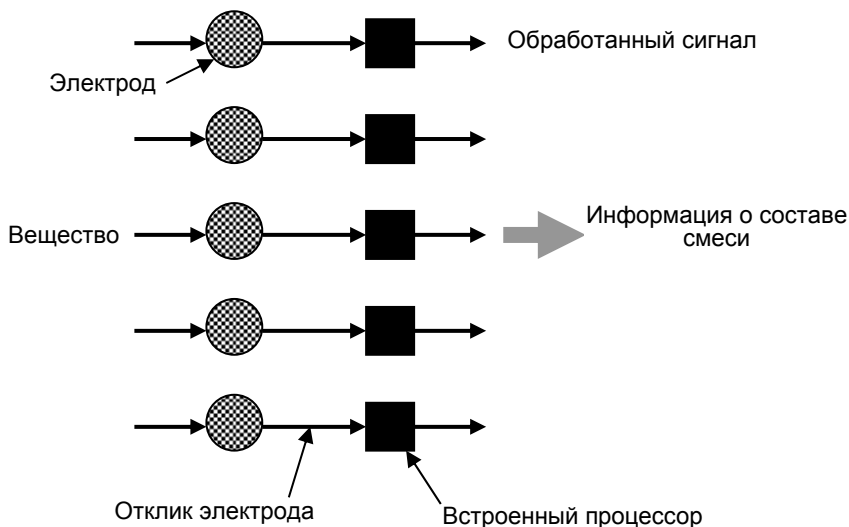
Многие проблемы вольтамперометрии, связанные с недостаточной селективностью сигнала, можно разрешить, если вместо одного электрода использовать несколько, имеющих различные характеристики сигналов-откликов. За такими системами закрепилось название «мультиэлектродные системы» или «батареи сенсоров». Кроме того, в последнее время распространение получил термин «массив сенсоров», хотя он скорее относится не к конструкции измерительной части, а к устройствам, позволяющим обрабатывать сигналы нескольких электродов. Применение мультиэлектродных систем в значительной степени усложняет оперирование как с самими электродами, так и с получаемыми с их помощью данными. Поэтому конструирование и последующее использование мультиэлектродных систем оправдано лишь в том случае, если они позволяют решать задачи, принципиально недостижимые с помощью единичных электродов. Побудительными мотивами применения мультиэлектродных систем являются:

- расширение перечня определяемых соединений, каждое из которых дает селективный сигнал-отклик только одного электрода мультиэлектродной системы;
- объединение нескольких электродов в единый блок для облегчения обработки сигналов (блок операционного контроля, усиления и обработки сигналов отдельных электродов);

- одновременное определение нескольких соединений, сигналы-отклики которых частично перекрываются друг с другом и с сигналами матричных или мешающих компонентов; выделение индивидуальных откликов производится путем простейших манипуляций, таких как нахождение разностного сигнала двух электродов и др.;
- установление значений сигналов-откликов нескольких компонентов, взаимно влияющих друг на друга, с помощью методов статистического анализа (многопараметрическая обработка данных);
- получение непараметрической информации, связанной с химическим составом объекта анализа (оценка качества продукта, его происхождения, присутствия в нем особо опасных компонентов и т. п.).

Первые два случая не выходят за рамки традиционного применения электродов в вольтамперометрии, поскольку объединение их в единую систему не меняет характеристик отдельных измерений. В этих случаях мультieleктродные системы представляют собой массив нескольких электродов, сигналы которых не связаны друг с другом и не оказывают взаимного влияния на параметры селективности и чувствительность определения отдельных компонентов. Компьютер воспринимает отклики электродов и анализирует суммарный сигнал, давая на выходе результат анализа (рис. 2.26). Создание таких систем диктуется требованиями миниатюризации и автоматизации измерений, а также снижением их стоимости. Желательно, но не обязательно, чтобы операционные характеристики отдельных электродов совпадали.

Другие варианты мультieleктродных систем предполагают обработку массива экспериментальных данных (измерений) с помощью методов хемометрики, направленных как на оценку метрологических характеристик, особенно в случае нелинейных и многопараметрических концентрационных зависимостей сигнала, так и на выделение сигналов-откликов индивидуальных компонентов. В отдельную группу выделены методы, призванные решать задачи, не связанные с установлением концентраций веществ, — методы установления различий и близости объектов по априорным или апостериорным критериям, которые применяются в экспертных системах. Простейшим примером являются разностные схемы, позволяющие нивелировать мешающее влияние фоновых токов или компонентов матрицы путем вычитания вольтамперных кривых, получаемых до и после введения образца (стандартной добавки) в анализируемый раствор. Указанные способы могут быть реализованы на уровне измерительных схем или алгоритмов компьютерной обработки данных, составляющих стандартное программное обеспечение современных вольтамперографов.



**Рис. 2.26.** Массив вольтамперометрических сенсоров

Для обработки сигналов мультieleктродных систем обычно используются стандартные программные пакеты, реализующие общие подходы к обработке массивов многомерных данных, такие как нейронные сети или метод главных компонент. Следует отметить, что несмотря на наличие стандартных алгоритмов обработки данных измерений, применение мультieleктродных систем часто требует индивидуальных подходов, опирающихся на особенности генерации сигналов-откликов электродов и их операционные характеристики. В частности, до сих пор большинство методов хеометрической обработки данных не согласованы по времени с получением многомерного сигнала и их обработка проводится в отрыве от процесса его генерирования. Иными словами, получение сигнала и его обработка не совмещены по времени и ограничивают возможности автоматизации измерений.

По существу хеометрика является комплексом методов обработки данных, основанных на математическом и статистическом моделировании. Не вдаваясь в подробности, рассмотрим применяемые наиболее часто методы и подходы. Прежде всего, остановимся на моделях отклика мультieleктродных систем. Среди них различают параметрические и непараметрические модели, направленные на решение прямых и обратных задач моделирования.

Прямые модели ориентированы на получение концентрационной зависимости многопараметрического сигнала, описываемого многопараметрическими линейными или нелинейными уравнениями вида  $y_i = f(C_1, C_2 \dots C_n)$ . Иначе говоря, прямые модели позволяют



восстановить (предсказать) значение сигнала исходя из известного набора веществ, определяющих этот сигнал. Вид аппроксимирующей функции выбирают на основе теоретических представлений о способе генерирования сигнала либо эмпирически исходя из минимального суммарного отклонения прогнозных и фактических значений сигнала-отклика при заданном наборе концентраций компонентов  $C_i$ . Качество модели обычно выражают в виде зависимости предсказанного значения сигнала от реального, которая в идеале представляет собой прямую линию с наклоном  $45^\circ$ . Такие модели зачастую представляют собой градуировочные зависимости для определения концентраций веществ по величине сигнала-отклика.

Следует иметь в виду, что при ограниченной селективности сигнала многопараметрические уравнения могут оказаться неразрешимыми относительно концентраций отдельных компонентов. Раздельное определение последних возможно только путем решения системы уравнений для нескольких электродов. Такое решение принципиально возможно, если число определяемых концентраций не превышает числа электродов. Однако для нелинейных зависимостей использование прямых моделей для определения концентрации вещества неудобно; в этом случае задача прямого моделирования другая – установление связности модели, т. е. однозначности решения, отсутствия особых точек (разрывов) аппроксимирующих функций и т. д. Эта информация имеет большое значение при подборе электродов, составляющих мультиэлектродную систему, и при определении параметров, влияющих на концентрационную зависимость сигнала. Сам вид такой зависимости может подтолкнуть исследователя к тем или иным гипотезам о процессах, определяющих природу сигнала-отклика.

Обратные модели опираются на априорные теоретические зависимости или эмпирические модели, минимизирующие те или иные функции ошибок. Для описания исследуемой системы используется критерий наилучшего соответствия всего объема экспериментальных данных предложенной модели. Как и в случае прямого моделирования, число зависимых переменных не может быть меньше числа независимых переменных, поэтому главным отличием мультиэлектродных систем, опирающихся на обратные модели, является многопараметрический характер отклика. Это не обязательно сигналы нескольких электродов. Методы повышения размерности сигнала-отклика могут включать временное разрешение (зависимость сигнала от времени), а также изменение условий его измерения. Применительно к вольтамперометрии это может быть анализ всей вольтамперометрической кривой или модулирование задающего напряжения.

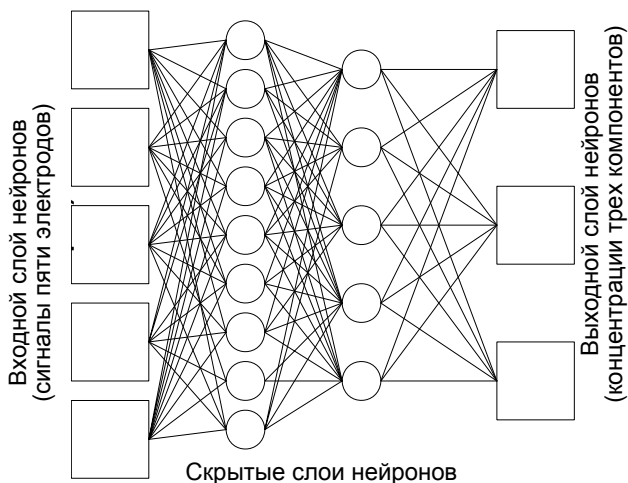
Для получения информации о содержании более чем одного компонента правомерна любая обработка исходных данных. Ино-

гда схемы измерения выглядят алогично с точки зрения классического вольтамперометрического эксперимента. Например, в ряде случаев предлагается использовать в качестве сигналов значения токов  $i = f(E)$  в области потенциалов, соответствующих фоновым токам. На самом деле это один из методов получения дополнительных параметров выходного сигнала (тока) в условиях обратного моделирования. Однако методический такой подход чреват существенным повышением трудоемкости эксперимента. Требуется намного больше усилий для обеспечения воспроизводимости всей вольтамперограммы (не только в области пиков окисления-восстановления определяемых компонентов), а также выполнение специальных метрологических приемов обработки данных для оценки параметров сходимости модели и ее точности.

Прямая и обратная задачи моделирования могут быть решены и непараметрическими способами, из которых наиболее известны нейросетевые технологии, являющиеся примером бионического подхода к построению аналитических систем, основанного на восприятии сигналов рецепторов живых существ с последующим распознаванием образов нейронной сетью головного мозга. Основная его идея – использование массива (набора) неспецифических (неселективных) сенсоров, обладающих перекрестной чувствительностью, и обработка полученных данных методами, характерными для живых существ при идентификации свойств объекта.

В наиболее известных искусственных *нейронных сетях прямого распространения* совокупность исходных параметров (входные сигналы электродов) поступает в специальные устройства компьютерной обработки информации, названные по аналогии с головным мозгом человека нейронами. Они осуществляют «взвешивание» входных сигналов с использованием весов, адаптируемых в процессе обучения, и суммирование взвешенных значений. После этого с помощью активационной функции, в качестве которой часто используется функция  $F(x) = 1/(1 + e^{-x})$ , формируется выходной сигнал слоя нейронов. Выходные сигналы нейронов, формирующих слой, служат входными сигналами для нейронов следующего скрытого слоя, в котором на основании преобразования информации осуществляется предварительный выбор параметров выходного сигнала, и т. д. В каждом слое содержится от 10 до 15 нейронов. Обычно нейронные сети содержат от двух до пяти скрытых слоев.

На выходе из нейронной сети находится выходной слой, число нейронов которого определяется числом параметров, получаемых при обработке данных. Например, при моделировании концентрационной зависимости на вход сети подаются сигналы отдельных электродов, а на выходе каждый нейрон содержит численное значение концентрации определяемого компонента. Двухкомпонентные системы содержат два выходных нейрона, трехкомпонентные – три и т. д. Описанная сеть реализует алгоритм нелинейной



**Рис. 2.27.** Схема искусственной нейронной сети прямого распространения, состоящей из двух скрытых слоев из 9 и 5 нейронов

аппроксимации данных, но в отличие от прямой модели она не позволяет получить в явном виде значения коэффициентов в уравнении концентрационной зависимости. Иначе говоря, нейронная сеть представляет собой «черный ящик», в который поступают сигналы электродов (абсолютные, относительные или нормированные), а выходят значения концентраций веществ (абсолютные или нормированные) в пределах диапазона их изменения (рис. 2.27). Такую нейронную сеть сначала «настраивают» или «обучают». Для этого через нее пропускают набор известных данных, так называемую обучающую выборку, минимизируя отклонения значений концентраций выходных нейронов от реальных значений. При этом устанавливаются индивидуальные веса отдельных нейронов внутренних слоев сети. В тех случаях, когда информация об исследуемом объекте отсутствует, «настройка» сети может проводиться с помощью методов неуправляемого обучения.

Нейронные сети позволяют не только устанавливать количественные связи между входными и выходными слоями нейронов, но и делать выводы о принадлежности того или иного объекта к определенному классу, а также о составе многокомпонентных растворов. Примеры такого рода задач – установление принадлежности вина к определенному региону изготовления, отличие подлинной продукции от контрафактной, определение источника поступления загрязняющих веществ в поверхностные воды и т. д. Такие задачи называются задачами непараметрической классификации или различения.

В частности, для решения подобных задач используются искусственные нейронные сети, построенные на основе теории *адаптивного резонанса* (ART). Решение задачи классификации в них осуществляется путем выделения «решающих правил», каждое из которых описывает набор признаков, достаточный для отнесения элемента выборки к определенному классу или подклассу. Для признаков, имеющих непрерывные значения, «решающие правила» формулируются с использованием набора интервалов для каждого признака. Интервалы могут быть заданы априори либо набор интервалов для каждого класса и подкласса определяется в процессе обучения системы.

Для установления принадлежности того или иного объекта к определенному набору признаков рассматривается  $n$ -мерное пространство, содержащее кластеры, отвечающие области существования каждого класса и подкласса. В этом случае  $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)$  – элемент пространства, а  $W = (w_{1b}, w_{1t}, w_{2b}, w_{2t}, \dots, w_{nb}, w_{nt})$  – некоторый кластер, описываемый множеством интервалов  $[w_{ib}, w_{it}]$ , где  $w_{ib}$  – нижняя, а  $w_{it}$  – верхняя границы  $i$ -го параметра, соответствующего  $i$ -ой размерности пространства. Далее определяются степень сходства (резонанс) кластера, отвечающего области существования класса или подкласса, и элемента выборки, а также параметры близости последнего к кластеру.

Первый параметр ( $T$ ) показывает, насколько элемент выборки можно считать представителем данного кластера, а второй ( $r$ ) – насколько полно кластер описывает признаки, имеющиеся у данного элемента. При этом

$$T = \frac{SumW - Sum[\Delta(x_i, w_{ib}, w_{it})]}{\alpha + SumW},$$

где  $SumW = Sum(w_{ib}) + Sum(1 - w_{it})$  определяет часть пространства признаков, не охватываемую данным кластером, а  $\Delta(x_i, w_{ib}, w_{it}) = [w_{ib} - \min(w_{ib}, x_i)] + [1 - w_{it} - \min(1 - w_{it}, 1 - x_i)]$  определяет выход  $x_i$  за границу интервала  $[w_{ib}, w_{it}]$ . Если  $x_i$  находится внутри этого интервала, то  $\Delta(x_i, w_{ib}, w_{it}) = 0$ .

Параметр  $r$  рассчитывают по формуле

$$r = \frac{SumW - Sum[\Delta(x_i, w_{ib}, w_{it})]}{n},$$

где  $n$  – мерность пространства. Если  $\Delta(x_i, w_{ib}, w_{it}) = 0$ , то  $r$  равен  $SumW/n$  – средней величине части пространства  $i$ -й размерности, не охватываемой кластером.

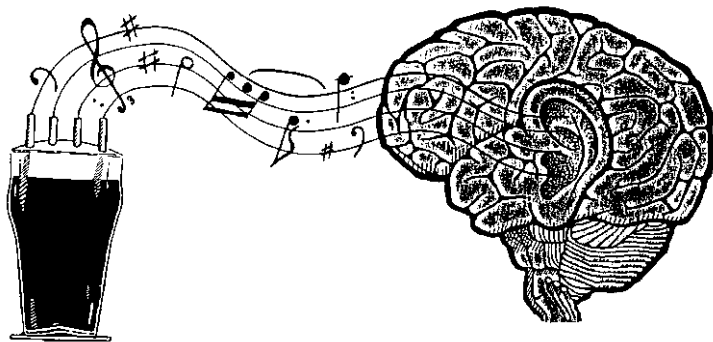
Все имеющиеся кластеры упорядочивают по убыванию  $T$  и находят среди них тот, для которого  $r$  превышает пороговое значение  $\rho$ , называемое достоверностью, а класс элемента выборки совпадает с классом кластера. Успешность экспертной оценки опреде-

ляется сочетанием качества генерализации (использование разумного числа кластеров, выражающих существование объективных закономерностей, определяющих классификацию элементов выборки) и высокой вероятности прогноза.

Следует заметить, что в отличие от нейронных сетей прямого распространения сети на основе ART позволяют сформулировать правила отнесения элемента к кластеру, т. е. критерии классификации. В качестве последних используются интервалы параметров, однозначно описывающие положение кластера в  $n$ -мерном пространстве признаков. Существует много вариантов искусственных нейронных сетей, в которых реализованы различные алгоритмы обучения и классификации, в том числе в виде пакетов прикладных компьютерных программ. Однако все они имеют характерную особенность: для отнесения образца к тому или иному классу используется классификация, построенная на результатах прошлых исследований или изучения модельных систем.

Методы классификации могут быть реализованы и другими способами. Например, в *дискриминантном анализе* для этого используется дискриминантная функция, представляющая собой комбинацию векторов. В случае *линейного дискриминантного анализа* такая функция представляет собой плоскость в  $n$ -мерном пространстве, наилучшим образом разделяющая элементы выборки, принадлежащие к различным классам. В *иерархическом кластерном анализе* проводится сортировка элементов в зависимости от расстояний между ними. В алгоритме поиска ближайшего соседа (KNN) неизвестный образец приписывается к определенному классу, ближайшему к нему в многомерном пространстве. Другой широко применяемый метод – независимое моделирование, основанное на классификации аналогий (SIMCA – soft independent modeling of class analogy).

В *методе главных компонент* (МГК, англ. PCA – principal component analysis), популярном при обработке данных мультитектродных систем, в  $n$ -мерном пространстве строится эллипсоид, наилучшим образом охватывающий данные измерений. Затем эти данные переносятся в другую систему координат, осями которой являются главная (ГК1) и перпендикулярная ей (ГК2) оси эллипсоида, а центром – среднее арифметическое из всех измерений. Координатами любой точки (экспериментальные данные) являются ее проекции на новые оси. При решении задач классификации элементы одного класса располагаются в указанных координатах на плоскости главных компонент достаточно кучно, пространственно отделенными от других элементов. Этот метод дает хорошую визуализацию результатов классификации, однако следует помнить, что расстояния между точками на проекциях не имеют физического смысла, что затрудняет получение ответа на вопрос, чем обусловлена классификация объектов анализа.



**Рис. 2.28.** Идентификация природы напитков с помощью «электронного языка»

Методы, основанные на применении мультиэлектродных систем с математическими способами классификации данных измерений, первоначально развивались в области газового анализа, где подобные системы получили название «электронный нос». Несколько позднее появились мультиэлектродные устройства на основе ИСЭ, сначала на основе халькогенидных стекол, а затем на основе комплексов переходных металлов, для которых по аналогии было предложено название «электронный язык». Разработка систем «электронный нос» и «электронный язык» стимулируется желанием смоделировать и расширить возможности, а в некоторых случаях заменить такие человеческие способности, как обоняние и восприятие вкуса. Поскольку в указанных системах используются методы обработки данных высокой размерности и нейрокомпьютерные подходы, то «электронный нос» и «электронный язык» можно рассматривать как специальную ветвь развития искусственного интеллекта – «электронного мозга». Образное представление о работе «электронного языка» изображено на рис. 2.28.

Применительно к вольтамперометрическим системам развитие мультиэлектродных сенсоров идет по двум направлениям. Первое включает применение немодифицированных электродов различной природы (медь, стеклоуглерод, никель, палладий, серебро, олово, титан, цирконий, а также более традиционные золото и платина) в растворах переменного состава. Для повышения размерности сигнала используются либо различные формы модуляции поляризующего напряжения либо дополнительные компоненты, вводимые в раствор. Второе направление – модифицирование электродов электрохимически активными компонентами, сигнал которых зависит от природы объекта анализа. В качестве модификаторов используется широкий круг медиаторов электронного переноса, чаще всего органические комплексы переходных металлов.

Рассмотрим некоторые примеры. Так, анализ вольтамперограмм, полученных на медном, никелевом и серебряном электродах в растворе, содержащем смесь аминокислот, аскорбиновой кислоты и глюкозы, позволяет провести идентификацию компонентов и определить их состав на основе различной чувствительности электродов и соответственно различий в пиках окисления отдельных компонентов. Некоторые из мультieleктродных систем такого типа применяются для контроля качества моющих средств.

Искусственные нейронные сети в сочетании с дискретным вейвлет-преобразованием применяются для отдельного определения аминокислот – триптофана, цистеина и тирозина – в диапазоне концентраций от 2 до 50 мкмоль/л. В качестве сигнала-отклика служат вольтамперограммы окисления аминокислот, которые преобразовывают с целью максимального разделения сигналов. Вейвлет-преобразование позволяет снизить уровень шума и выделить наиболее типичные участки вольтамперограмм для последующей оценки вклада отдельных компонентов в суммарный сигнал.

С помощью искусственных нейронных сетей прямого распространения по вольтамперограмме смеси трех фенолов, окисляющихся на пропитанном эпоксидной смолой графитовом электроде в одной области потенциалов, определяют микромолярные количества *o*-крезола, *n*-хлорфенола и 4-хлор-3-метилфенола при совместном присутствии.

Предложен вольтамперометрический «электронный язык» с двумя рабочими электродами из золота и платины для контроля качества молока и апельсинового сока. Сигналами-откликами служат вольтамперограммы растворов, регистрируемые в условиях импульсной и линейной вольтамперометрии, пики которых изменяются в зависимости от формы модулирующего напряжения, природы электрода и продолжительности измерения. Для компьютерной обработки выходных сигналов и контроля качества продуктов использовался метод главных компонент.

Этот же метод используется для обработки данных измерений с помощью «электронного языка» на основе рабочих электродов из различных металлов (Au, Ir, Pd, Pt, Re, Rh) и хлоридсеребряного электрода сравнения. Такое устройство применяют для оценки качества кисломолочных продуктов и содержания в них микроорганизмов. Вмонтированным в корпус из нержавеющей стали, его помещают в производственную линию для прямых on-line измерений при контроле качества молока.

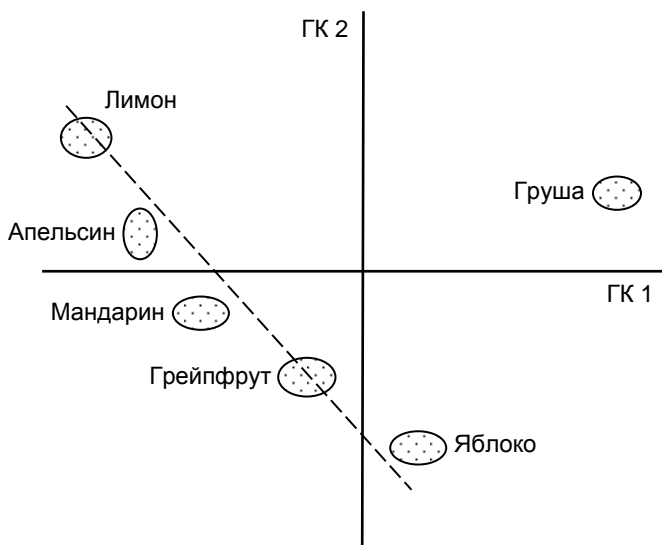
По редокс-пикам проводящих покрытий на основе допированных полианилина, политиофена, полипиррола в средах различного состава с использованием метода главных компонент можно установить содержание веществ, определяющих вкус напитков – кислый (винная кислота), сладкий (сахароза), горький (хинин), соленый (хлорид калия) и вяжущий (таннин).

В качестве неселективных вольтамперометрических электродов, применяемых для изготовления мультиэлектродных сенсоров, используются и угольно-пастовые электроды, модифицированные оксидами  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{RuO}_2$ ,  $\text{PbO}_2$ , гидроксидом  $\text{Ni}(\text{OH})_2$ , берлинской лазурью и др. Так, УПЭ, содержащие в пасте бис-фталоцианиновые комплексы  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  и  $\text{Pr}^{3+}$ , применяли для тестирования красных вин различной степени зрелости, изготовленных в двух географических областях Испании. Измерения сигналов-откликов проводили в условиях циклической и квадратно-волновой вольтамперометрии со скоростью 0,1 В/с с шагом 100 мВ с регистрацией 20 значений силы тока. Для классификации вин использовали метод главных компонент. Изменения на вольтамперограммах обусловлены смещением редокс-потенциалов вин и, следовательно, окислительно-восстановительными превращениями модификаторов, а также электрохимическими реакциями компонентов вин, например катехоламинов. В качестве сигналов-откликов использовали анодные пики, отличающиеся наибольшей устойчивостью во времени и воспроизводимостью в серии образцов. Наилучшее разделение было достигнуто для вин, отличающихся по зрелости.

Та же задача для красных вин была решена с помощью батареи золотых электродов, модифицированных помимо фталоцианиновых комплексов лютеция, лантана и кобальта производными перилена и полипирролом с различными допирующими компонентами, включая электрохимически активный ферроцианид-анион. Основу мультиэлектродной системы составляли золотые дисковые электроды диаметром 1 мм, полученные фотолитографически на оксиде алюминия площадью  $56 \times 84$  мм. Нанесение модификаторов проводили либо механически в виде суспензии в угольной пасте (комплексы металлов), либо электрохимически. Как и в предыдущем случае, пики, регистрируемые на вольтамперограммах, соответствовали либо редокс-превращениям модификаторов, либо окислению полифенольных соединений, присутствующих в винах. Для расчетов использовали всю вольтамперограмму в десяти «окнах» с использованием весов, убывающих от центра «окна» по гауссовой кривой. Ту же мультиэлектродную систему использовали для контроля в винах компонентов, являющихся маркерами их созревания, – танинов, этанола, сахаров и органических кислот. Установлено хорошее соответствие с результатами классификации, полученными с помощью фталоцианиновых комплексов металлов и полипиррольных модифицирующих покрытий.

Описаны системы на основе ферментных электродов. Так, для отдельного определения окисляющихся фенолов предложено использовать биосенсоры, включающие тирозиназу и пероксидазу. Применение метода главных компонент (МГК) позволяет разделить сигналы катехола и *n*-хлорфенола в проточном амперометрическом биосенсоре на основе тирозиназы. Аналогичная задача в





**Рис. 2.29.** Распределение фруктовых соков на плоскости главных компонент при их классификации с помощью разделенных ячеек

стационарном варианте тирозиназного сенсора решена с помощью искусственной нейронной сети, моделирующей участок вольтамперограммы, отвечающей биокаталитическому окислению *m*-крезола, катехола и фенола.

Предложены мультиферментные системы для одновременного определения субстратов и ингибиторов ферментов. В частности, проточный мультиэлектродный сенсор с иммобилизованными пероксидазой, холинэстеразой и холиноксидазой позволяет определять ионы тяжелых металлов, фториды, пестициды (карбарил, фенитротрион, гептенфос), а также легко окисляющиеся фенолы. Во всех случаях активность ферментов регистрируют амперометрически по концентрации одного из конечных продуктов ферментативных реакций – пероксида водорода. Более подробно механизм формирования сигнала амперометрических ферментных сенсоров рассмотрен в гл. 3.

Интересен вариант с так называемыми разделенными ячейками\*. В нем используются три отдельные ячейки, соединенные последовательно золотыми поляризуемыми электродами и не имеющие между собой гидролитического контакта. Вольтамперограммы регистрируют, измеряя ток маркера – *o*-нитроанилина – между

\* Сидельников А. В., Зильберг Р. А., Кудашева Ф. Х., Майстренко В. Н. и др. Журн. аналит. химии, 2008, Т. 63, с. 1072.

электродами, погруженными в крайние ячейки, а в среднюю ячейку помещают анализируемый раствор. Анализ полной кривой, связанной как с восстановлением маркера, так и с поляризацией электродов, позволяет проводить классификацию таких объектов, как соки, минеральные воды и другие напитки. В качестве примера на рис. 2.29 приведены результаты МГК-моделирования вольтамперограмм натуральных фруктовых соков, полученных отжимом апельсинов, лимонов, яблок, мандаринов, груш и грейпфрутов.

Заметим, что пищевые продукты являются самыми распространенными объектами анализа с помощью «электронных языков». Последние применяются для идентификации и контроля качества фруктовых соков, минеральных вод, прохладительных и спиртных напитков, кофе, чая, вин, растительных масел, фруктов, овощей, мяса, рыбы. Как правило, контролируется несколько основных характеристик, важных для данного продукта и определяющих его вкус. Наличие корреляции между откликом «электронного языка» и восприятием вкуса человеком – важное и перспективное с практической точки зрения свойство таких устройств. На рынке появились первые коммерческие мультieleктродные системы указанного типа.

Известны и «непищевые» варианты применения мультисенсорных систем, например, для определения нерадиоактивных редкоземельных элементов в отработанном ядерном топливе, для установления степени окисления металлов в катализаторах, контроля степени чистоты (загрязнения) технологического оборудования, для выявления воспалительных заболеваний (мастит) у коров или изменений химического состава среды. «Умный» мониторинг с помощью мультieleктродных систем позволяет контролировать ситуацию и оперативно реагировать на ее качественное изменение. Для количественных измерений «электронные языки» используются реже.

Завершая рассмотрение примеров использования мультieleктродных систем для определения нескольких компонентов по кривым вольтамперометрического отклика, еще раз заметим, что успех и правильность интерпретации результатов зависят от корректного применения методов математической дискриминации, требующих участия не только химиков-аналитиков, но и специалистов в области математической статистики и хеометрики. Это направление только развивается, и большая часть работ имеет эмпирический характер. Необходимы серьезные усилия по изучению механизма действия сенсоров применительно к анализам различной природы, разработке методик их практического применения для решения конкретных задач.

## Глава 3

# Амперометрические биосенсоры

Исследование и разработка биохимических сенсоров относится к одному из направлений, определяющих развитие современной аналитической химии. Формально биосенсоры можно рассматривать как один из вариантов химических сенсоров, в которых в качестве распознающих элементов, обеспечивающих формирование сигнала-отклика, применяются биологические материалы – белки, нуклеиновые кислоты, элементы биологических мембран, живые клетки, рецепторы и ткани. Биосенсоры и биосенсорные устройства находят применение не только в аналитической химии, но и в медицинской диагностике, молекулярной биологии и биохимии, в том числе при расшифровке генома человека. Исследования в этом направлении в значительной степени определяют тенденции развития модифицированных электродов, особенно способов модифицирования электродной поверхности и генерирования сигнала.

Помимо термина «биосенсор» в литературе можно встретить и альтернативные названия, конкретизирующие либо биологический компонент, либо биохимическую реакцию, лежащую в основе сигнала-отклика. Так, довольно часто встречаются названия «ферментный сенсор», «иммуносенсор», «ДНК-сенсор» и т. д. Использование нанотехнологии позволило создать миниатюрные многофункциональные датчики, называемые «биочипами» или «ДНК-чипами». В соответствии с определением ИЮПАК, *биосенсорами* называются аналитические устройства, в состав которых входят биохимические элементы, реагирующие с определяемыми веществами и находящиеся в непосредственном контакте с трансдьюсером (датчиком), преобразующим биохимический сигнал в электрический. Данное определение устанавливает единство места и времени биохимического распознавания и регистрации сигнала биосенсора. В том случае, когда биохимический компонент пространственно отделен от преобразователя сигнала, либо измерение сигнала проводится в другом временном интервале, чем взаимодействие определяемого компонента с поверхностным биологическим слоем, правильнее говорить не о биосенсоре, а о *биосенсорном устройстве*, хотя в современной литературе этих рекомендаций ИЮПАК придерживаются не строго.

К биосенсорным устройствам относят, например, ферментные (микробные) реакторы, в которых анализируемый раствор пропускается через колонку с иммобилизованным биологическим компонентом, а затем вносится в измерительную ячейку с системой электродов. Следует заметить, что термин «биосенсор» используется также в биохимии и медицине, причем зачастую его функции не соответствуют определению ИЮПАК. Например, так называют соединения, присутствие или реакции которых служат маркерами естественных или патогенных процессов в живых организмах. Они используются для диагностики стрессовых состояний или для установления природы процессов, определяющих общее состояние организма. Кроме того, в экологии и токсикологии биосенсорами иногда называют живые организмы, реакции которых служат индикаторами присутствия токсичных веществ в окружающей среде. Такое использование термина «биосенсор» выходит за рамки аналитической химии и может привести к недопониманию при чтении специальной литературы.

Для измерения сигнала биосенсора используются различные способы – оптические, пьезоэлектрические, акустические и т. д. Наибольшую долю – до 80 % всех биосенсоров – составляют электрохимические (амперометрические) биосенсоры, основные принципы функционирования и примеры применения которых рассмотрены ниже.

### **3.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСЕНСОРОВ**

Под функционированием биосенсора понимают совокупность процессов, определяющих взаимодействие биологических компонентов с определяемым веществом и формирование сигнала-отклика биосенсора. В соответствии с этим биосенсоры условно можно разделить на две группы. Первую группу образуют ферментные сенсоры. Их функционирование сопровождается изменением природы вещества – субстрата, реакция превращения которого катализируется ферментом. В зависимости от конструкции биосенсора его сигнал может быть связан с электрохимической реакцией исходного субстрата либо продукта его ферментативного превращения. Вариантами ферментных сенсоров можно считать микробные и тканевые сенсоры, поскольку они также регистрируют изменения состава, обусловленные ферментативными реакциями с участием внутриклеточных ферментов. Ферментные сенсоры иногда рассматривают как составную часть кинетических методов анализа.

Вторую группу образуют иммуносенсоры и ДНК-сенсоры. В них протекают биологические реакции, связанные с обратимыми процессами образования комплексов, такими как антиген-антитело или ДНК-белок. Указанные процессы не связаны с изменениями

химической природы вещества, но приводят к изменению состава поверхностного слоя, которое можно зарегистрировать различными способами, в том числе разработанными для классического (не-сенсорного) ДНК- или иммуноанализа. Такие биосенсоры иногда называют аффинными, подчеркивая тот факт, что селективность и чувствительность сигнала определяется биохимическими аффинными взаимодействиями. Деление биосенсоров на ферментные и аффинные во многом условно. Например, зачастую ферменты применяются как метки в составе иммуносенсоров, а взаимодействия антиген – антитело используются для иммобилизации ферментов на поверхности преобразователя сигнала.

Наиболее важной является классификация биосенсоров по природе используемых в них биологических компонентов. Она позволяет судить не только о характере реакций, генерирующих сигнал биосенсора, но и о тех процессах, которые моделируют биосенсоры. Последнее имеет особое значение при интерпретации результатов измерений. Например, реакции с участием препаратов ферментов моделируют процессы с участием экстрацеллюлярных ферментов или внутриклеточные реакции, тогда как микробные и тканевые сенсоры предполагают трансмембранный перенос, влияющий на доступность ферментов для биохимических превращений.

*Ферментные биосенсоры* содержат чистые препараты ферментов или биологические компоненты (гомогенаты тканей, микробные культуры), проявляющие соответствующую ферментативную активность. Название фермента часто включают в название биосенсора (пероксидазный, тирозиназный сенсор и др.). Поскольку характеристики ферментов и, в частности, кинетические параметры реакций иммобилизованных препаратов зависят от чистоты исходных реагентов, при указании условий иммобилизации принято сообщать о характеристиках активных компонентов – активности фермента или удельной массе, а также экспериментальных значениях констант Михаэлиса и максимальной скорости.

Ферментные сенсоры подразделяются на субстратные и ингибиторные. *Субстратные биосенсоры* используются при определении специфических субстратов ферментативных реакций. Примером может служить определение глюкозы с помощью ферментного сенсора на основе глюкозооксидазы или молочной кислоты – на основе лактатдегидрогеназы. *Ингибиторные сенсоры* используются при определении веществ, снижающих активность ферментов. Пример – биосенсор для определения фосфорорганических пестицидов, снижающих скорость гидролиза ацетилхолина, который катализируется ацетилхолинэстеразой. Многие ингибиторы проявляют неспецифическое действие, снижая активность не одного, а нескольких ферментов, входящих в состав биосенсоров.

В *иммуносенсорах* в качестве биохимического рецептора используются компоненты иммунных взаимодействий. Это могут быть иммуноглобулины – защитные белки, выделяемые иммунной системой организма в ответ на поступление чужеродных биологических соединений (антигенов), либо сами антигены или их комплексы с высокомолекулярными соединениями. Иммуноглобулины, называемые также антителами, образуют прочные комплексы с антигенами. Сигнал иммуносенсора зависит от концентрации иммунокомплекса либо реагента, который остается в избытке.

Обычно иммуносенсоры применяются для решения задач медицинской диагностики. Присутствие антител в крови служит диагностическим признаком развития специфичного или системного заболевания либо токсического воздействия определенных веществ. Низкомолекулярные соединения, способные вызывать иммунную реакцию (образование антител) при поступлении в живой организм, называются *гаптенами*. К ним относятся многие загрязнители окружающей среды. В живом организме гаптены образуют комплексы (конъюгаты) с белками и некоторыми другими высокомолекулярными компонентами, которые стимулируют образование антител. Иммуносенсоры на гаптены находят применение в эколого-аналитическом контроле. Определение антител и антигенов (гаптен) можно проводить не только в биологических жидкостях, но и в других средах, включая природную среду. При наличии специфических антител иммуносенсоры позволяют определять практически любое соединение с высокой специфичностью и селективностью.

*ДНК-сенсоры* содержат в составе поверхностного слоя нуклеиновые кислоты. Чаще всего это дезоксирибонуклеиновые кислоты или их короткоцепочечные фрагменты, специфичные для носителя генетической информации, которые позволяют проводить идентификацию патогенных микроорганизмов и вирусов. Часто их называют также *ДНК-зондами*. Короткоцепочечные олигонуклеотиды синтезируют в так называемых *ДНК-амплификаторах* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве шаблонов в ПЦР служат *ДНК-праймеры*, применяемые в коммерческих тест-системах. Они используются также в качестве ДНК-зондов в биосенсорах. Длина таких олигонуклеотидов составляет до 30 отдельных нуклеотидных звеньев, которые отражают строение определенных участков природных (нативных) ДНК.

Довольно часто олигонуклеотиды подвергают модифицированию, вводя в концевые фрагменты дополнительные функциональные группы или компоненты, способствующие иммобилизации биоматериала на электроде или генерированию сигнала. Помимо ДНК-зондов в биосенсорах используются синтетические нуклеотидные последовательности (чаще на базе РНК), не имеющие природных аналогов, называемые *аптамерами*. Их синтезируют



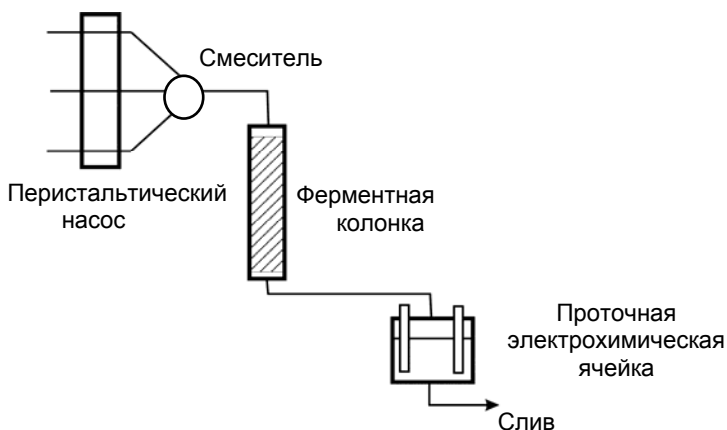
**Рис. 3.1.** Аптамер для определения цианокобаламина

ют с помощью комбинаторной химии в соответствии со способностью образовывать комплексы с определяемыми соединениями.

Особенностью аптамеров является их необычное пространственное строение. Они могут содержать петли, ковалентные сшивки и мостики, фиксирующие трехмерные структуры, – «шпильки», «этажерки» и т. д. В качестве примера на рис. 3.1 приведена компьютерная модель аптамера для определения цианокобаламина.

ДНК-сенсоры и аптасенсоры могут включать не только отдельные нуклеотиды, но и их пары, связанные между собой комплементарными взаимодействиями. В соответствии с этим их подразделяют на одно- и двухцепочечные ДНК-зонды. Для двухцепочечных аптамеров часто используется термин *aptabody* (производное от слов *apta*mer и *antibody*).

*Микробные сенсоры* включают микроорганизмы или простейшие грибы. В зависимости от назначения биосенсора живые клетки могут выполнять функцию «поставщика» определенных ферментов либо участвовать в формировании сигнала целиком (клеточное дыхание, выработка АТФ, выделение углекислого газа и др.). По сравнению с ферментами, выделенными из биологических тканей или жидкостей, микробные биосенсоры, имеющие тот же вид ферментативной активности, отличаются более стабильным откликом и увеличенным сроком эксплуатации. Это обусловлено тем, что ферменты в клетке находятся в благоприятном микроокружении, а деление клеток компенсирует потери ферментативной активности в результате инактивации или отмирания. По тем же причинам микробные биосенсоры достаточно редко применяются для определения ингибиторов ферментов. Поскольку диффузия низкомолекулярных соединений через клеточные мембраны и естественные регуляторные реакции замедляют отклик микробных биосенсоров, их чаще выполняют в виде биосенсорного устройства (рис. 3.2). При



**Рис. 3.2.** Биосенсорное устройство колоночного типа

этом микробную суспензию помещают в культуральную жидкость, в которую опущен сенсор, обычно кислородный электрод Кларка, или закрепляют на поверхности инертного носителя в колонке.

В последнее время помимо природных сообществ микроорганизмов (дрожжевые грибы, активный ил очистных сооружений, почвенные микроорганизмы) и чистых микробных культур используются генетически модифицированные микроорганизмы, в которые с помощью генной инженерии встраивают гены, ответственные за синтез определенных ферментов. Например, для определения фосфорорганических соединений используется генетически модифицированная кишечная палочка с геном, ответственным за синтез гидролазы органических эфиров фосфорной кислоты. Кроме того, вместо живых клеток в составе микробных сенсоров могут использоваться термически инактивированные клеточные культуры. В них сохраняется активность некоторых ферментов, но за счет денатурации других белков отклик на определяемые соединения становится селективным и быстрым. Таким образом, например, определяют этанол в реакции окисления, катализируемой алкогольоксидазой, содержащейся в термически инактивированных клетках дрожжевых грибов.

Микробные сенсоры применяют и для оценки биологической активности различных соединений: в токсикологических исследованиях с целью установления условно безопасной концентрации токсикантов, при установлении индивидуальных доз антибиотиков, при создании новых антимикробных и противогрибковых добавок к краскам и отделочным материалам. Они используются также для оценки состояния природных сообществ микроорганизмов, например, при установлении величины БПК и контроле работы биологических очистных сооружений.



*Биосенсоры на основе надмолекулярных структур клеток* занимают промежуточное положение между ферментными, ДНК- и микробными сенсорами, поскольку возникающий сигнал обусловлен взаимодействием определяемого вещества с одним из указанных биокomпонентов либо моделирует реакции живых клеток. В состав таких сенсоров входят внутриклеточные структуры, имеющие достаточно сложное иерархическое строение и многообразные функции. Это могут быть липидные клеточные мембраны со встроенными рецепторами, митохондрии, хлоропласты, компоненты фотосистемы, выделенные из хлоропласта, природные полиферментные комплексы, обонятельные и вкусовые рецепторы и т. д. К их особенностям относится иерархичность отклика, который определяется многостадийными процессами селективного транспорта, биохимического распознавания и ферментативного превращения вещества. Пока такие сенсоры не нашли широкого применения, поскольку сложные биологические структуры недостаточно устойчивы вне привычного окружения клетки, а сам отклик не всегда имеет однозначную биохимическую интерпретацию. Биосенсоры на основе надмолекулярных структур применяются для изучения биохимических процессов, например для подтверждения механизма токсического действия загрязнителей или для выявления путей передачи нервных импульсов или иного биохимического сигнала по периферической нервной системе. К числу немногих исключений относятся биосенсоры для оценки фитотоксичности, включающие компоненты фотосинтезирующего аппарата клеток растений, а также биосенсоры на основе цитохрома P<sub>450</sub>, представляющего собой достаточно сложный полиферментный комплекс. Их применяют для определения окисляющихся органических аминов и спиртов, в том числе некоторых наркотиков, лекарственных препаратов и их метаболитов.

Описаны примеры биосенсоров, основанных на синтетических аналогах природных биологических компонентов. К ним помимо аптасенсоров относятся биосенсоры на основе пленок Ленгмюра–Блодже, а также некоторых синтетических рецепторов с высокой избирательностью сигнала. Как отмечалось выше при обсуждении способов иммобилизации биологических компонентов, пленки Ленгмюра–Блодже моделируют строение биологических мембран. Они формируются как липидные бислои в процессах самосборки на границе раздела фаз из отдельных молекул, обладающих поверхностно-активными свойствами. Их можно ковалентно закрепить на поверхности золотого электрода, если внедрить в состав молекул концевые тиольные группы, образующие связи Au–S с подложкой. Такие пленки за счет слабых гидрофобных взаимодействий способны включать малополярные органические соединения, в том числе обладающие биологической активностью. Подобные процессы моделируют перенос гидрофобных токсикантов

через биологические мембраны и могут найти применение при их определении.

Сенсоры на основе полимерных материалов с молекулярными отпечатками, строго говоря, не биосенсоры, а скорее адсорбционные сенсоры, в которых происходит накопление определяемых веществ в поверхностном слое, способном к высокоселективному взаимодействию из-за наличия пор, комплементарных определяемому веществу. В некотором смысле такие материалы имитируют действие рецепторов биологических мембран, повышая селективность сигнала и его чувствительность к определяемому соединению. Чтобы отличить биосенсоры от устройств на основе синтетических аналогов природных компонентов, последние иногда называют «сенсорами на основе принципов биомиметики».

Независимо от природы биологического компонента его требуется закрепить при создании биосенсора на специальном носителе или на поверхности преобразователя сигнала. Эту стадию называют иммобилизацией биологического компонента. Ее основные способы рассмотрены в разд. 1.2.6. Заметим, что иммобилизация – ключевой этап создания биосенсора, от успеха которого зависит сама возможность измерения сигнала, операционные характеристики (время жизни и отклика биосенсора), чувствительность и селективность определения биологической мишени в матрицах сложного состава. Способ иммобилизации выбирают исходя из критериев стабильности иммобилизованного препарата, его доступности для реакции с определяемым веществом и требований, связанных с регистрацией сигнала. Поскольку любой биологический компонент можно иммобилизовать различными способами, выбор и оптимизация условий иммобилизации определяются рядом дополнительных условий.

*Толщина поверхностного слоя.* Чем больше вспомогательных реагентов используется для иммобилизации, и чем ниже активность (концентрация) действующего начала в препарате, тем толще должен быть поверхностный слой биосенсора. В свою очередь толщина поверхностного слоя определяет время отклика, связанное с диффузией низкомолекулярных компонентов, характеристики механической устойчивости сенсора и время его жизни. На начальных этапах развития биосенсорики предпочтение отдавалось достаточно толстым слоям, например накладным мембранам с иммобилизованными биологическими компонентами, которые заменяли на преобразователе сигнала по мере надобности. В настоящее время приоритетом является получение тонких и сверхтонких покрытий регулярного строения. Это обусловлено общей тенденцией, направленной на миниатюризацию аналитического оборудования и исключение участия человека на промежуточных стадиях измерения (за исключением замены мембраны или обновления поверхностного слоя). Объективно этому способствуют также снижение

стоимости и увеличение ассортимента коммерческих препаратов ферментов, ДНК, антител и т. д., а также появление новых носителей биологических компонентов, обеспечивающих их стабильность, но не требующих иммобилизации в толстом слое – наночастиц золота, магнитных носителей и др. Следует заметить, что в случае малоустойчивых препаратов, а также при иммобилизации клеток и надмолекулярных структур использование толстых мембран (поверхностных биослоев) иногда остается единственным возможным способом получения стабильного отклика биосенсора. Зачастую толщина слоя биологического компонента обусловлена именно выбором способа иммобилизации; гидрофильные носители, такие как целлюлоза, желатин, агар, склонны к набуханию и *a priori* не могут образовывать сверхтонкие пленки. Напротив, включение биокомпонентов в самоорганизующиеся структуры, адсорбция на электроде позволяют получать сверхтонкие, практически мономолекулярные поверхностные слои с высокой доступностью для реагентов, участвующих в реакции с определяемым соединением.

*Удельная концентрация* (количество) *иммобилизованного биокомпонента*. В случае ферментных сенсоров, предназначенных для определения субстратов, увеличение концентрации фермента в целом благоприятно влияет на сигнал: чем выше скорость реакции превращения субстрата, тем стабильнее отклик и тем меньше он зависит от процессов инактивации фермента, связанных с его вымыванием в раствор, действием денатурирующих реагентов (кислород, протеолитические ферменты, микроорганизмы) и т. д. Однако в других вариантах биосенсоров, включая ферментные сенсоры для определения ингибиторов, имеются ограничения, не позволяющие работать с высокими поверхностными концентрациями биологических препаратов.

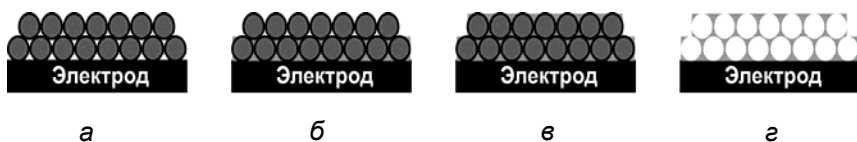
Условно их можно подразделить на неспецифические (общие) и специфические (зависящие от конкретного вида биосенсора или его назначения). К общим факторам относятся высокая стоимость биологических компонентов, снижение воспроизводимости характеристик биосенсора при их высоких концентрациях, а также увеличение толщины и гидрофильности поверхностного слоя, особенно при получении тонких покрытий. Последнее ограничение обусловлено большой молекулярной массой биополимеров, а значит, и массой иммобилизуемого препарата в расчете на единицу поверхности. В свою очередь утолщение слоя увеличивает вероятность его набухания при эксплуатации в водных средах. В некоторых случаях избыток биологического компонента снижает эффективность связывания определяемого соединения. Это относится и к иммуносенсорам, поскольку существует оптимальное соотношение антител и антигенов, соответствующее максимуму их аффинности.

К специфическим факторам относится требование определенной координации биохимических компонентов в пределах слоя и

доступность центров связывания при взаимодействии с биологической мишенью. Наиболее ярко это проявляется для ДНК-сенсоров, где комплементарный олигонуклеотид сопоставим по массе с ДНК-зондом и должен полностью подойти к нему для связывания пар нуклеиновых оснований. Значителен вклад стерической составляющей и в формировании сигнала иммуносенсоров при определении иммуноглобулинов и высокомолекулярных антигенов. В случае ингибиторных ферментных сенсоров слишком высокая концентрация фермента снижает чувствительность определений ингибиторов в силу диффузионных и стерических ограничений при образовании комплексов фермент-ингибитор и фермент-субстрат (в случае обратимого ингибирования). Поскольку высокая концентрация биологического компонента, как правило, предполагает полислойное заполнение поверхности сенсора, формирование высокоорганизованных монослоев автоматически решает проблему избытка реагентов. Это одна из причин, почему такие покрытия способствуют улучшению аналитических характеристик сенсоров.

В то же время возможны варианты, при которых монослойное заполнение не позволяет добиться требуемой чувствительности определений из-за низкого выхода продукта, реагирующего на электроде. В этом случае альтернативой толстым «медленным» пленкам может быть использование высокопористых сорбентов, в которых биологический компонент образует монослой в порах и капиллярах. Получение таких сорбентов освоено промышленностью – они востребованы в производстве ряда биологически активных веществ, таких как аспартам или антибиотики. Недостатком традиционных пористых материалов, разработанных для ферментных (микробных) реакторов и закрепляемых на поверхности преобразователя сигнала, является достаточно медленное установление равновесия и связанное с этим продолжительное время измерения и отмывки сенсора.

Современным высокотехнологичным вариантом иммобилизации биоконпонентов является применение мезопористых материалов. Они отличаются сверхвысокой пористостью, не создающей диффузионного торможения переносу низкомолекулярных реагентов, а также большой удельной поверхностью, позволяющей добиться высокой концентрации иммобилизуемого препарата. Мезопористые материалы получают либо из микродисперсных носителей, частицы которых связывают различным образом, либо из монолита, селективно растворяемого с образованием пор требуемого радиуса и распределения. В настоящее время получены мезопористые носители из оксидов металлов и золота, а также некоторых полимеров. В качестве примера можно привести способ получения носителя, отличающегося не только высокоразвитой поверхностью, но и регулярностью строения (рис. 3.3). Сначала на поверхности электрода осаждают слой плотноупакованных пласт-



**Рис. 3.3.** Получение мезопористых слоев золота для последующей иммобилизации ферментов

*а* – формирование плотноупакованных слоев шариков из полистирола; *б* – электролитическое осаждение золота с полным заполнением нижнего слоя; *в* – полное послойное заполнение пустых промежутков золотом; *г* – растворение шариков в органическом растворителе

массовых шариков диаметром в несколько десятков микрон (рис. 3.3, *а*). Для этого используют золь-гель метод, осаждавая шарики в строго контролируемых температурных условиях. Затем в промежутках между шариками электролитически осаждают слой золота (рис. 3.3, *б* и *в*), толщина которого максимальна в местах, где шарики соприкасаются. Изменяя условия электролиза, довольно просто контролировать толщину золотого покрытия – процесс можно остановить сразу же после полного заполнения слоя. После этого достаточно промыть электрод в органическом растворителе для удаления полимерных шариков. Образуется высокопористый поверхностный слой золота толщиной в несколько микрон, содержащий до четырех слоев шарообразных полостей строго регулярного строения и диаметра (рис. 3.3, *г*). В точках касания шариков полости соединяются между собой, образуя сплошную сеть каналов. На внутренних поверхностях полостей можно иммобилизовать монослой фермента, обеспечив тем самым одновременно его высокую удельную концентрацию и стерическую доступность.

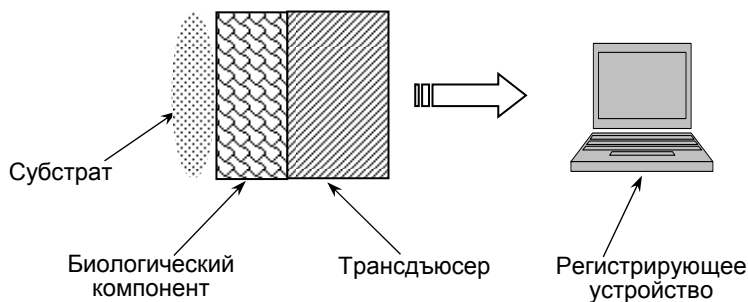
*Устойчивость биологических компонентов.* Несмотря на то что современные способы иммобилизации разработаны специально для биологических препаратов, не любой способ может применяться в каждом конкретном случае. При этом довольно часто используются биологически активные химические реагенты. Например, цианурхлорид – реагент для кросс-сшивки белков – токсичен для человека. Другие реагенты приводят к инактивации значительного количества белка. Так, при электрополимеризации в сильноокислых средах денатурируется до 90 % фермента, введенного в раствор мономера. Аналогичный эффект оказывают ионизирующее и УФ-излучения, используемые для инициирования полимеризации и формирования фотополимеризуемых слоев. Это ограничивает применение традиционных технологий микролитографии, разработанных для микроэлектронной промышленности и применяемых при изготовлении микрочипов на кремниевой подложке.

Способ иммобилизации должен учитывать, каким образом реагирует биологический компонент на вещества, применяемые на

всех стадиях модифицирования электрода. Химическое и физическое модифицирование олигонуклеотидов и белков, материал электрода или носителя могут повышать устойчивость продукта иммобилизации в процессе формирования поверхностного слоя сенсора. Для снижения денатурирующего действия органических растворителей гидрофильные ферменты стабилизируют включением их в матрицу крахмала или силоксановых полимеров. Аналогичное защитное действие оказывают полиэлектролиты и многоатомные спирты. Действие повышенных температур можно уменьшить, если биологический компонент включать в полимерную матрицу при обычной температуре. Часто стабилизирующий эффект оказывает адсорбция белка на твердом носителе или электроде, особенно при эксплуатации сенсора в неводных или преимущественно органических растворителях.

Завершая краткий обзор факторов, влияющих на выбор условий иммобилизации биологических компонентов, заметим, что в большинстве случаев создание биосенсора не предполагает разработку способа иммобилизации *ad novo* («с нуля»). В большинстве случаев для этого адаптируют имеющиеся методики, разработанные для родственных вариантов биоанализа. Например, при создании иммуносенсоров используются способы формирования поверхностных слоев с помощью реагентов, разработанных для твердофазных вариантов иммуноанализа (ELISA). В ДНК-сенсорах используются методы иммобилизации ДНК, применяемые в ДНК-диагностиках. В ферментных сенсорах часто используются методы иммобилизации, применяемые при создании ферментных реакторов в биотехнологии. Это не означает, что задача иммобилизации не стоит как таковая, но наличие аналогов существенно облегчает выбор способа и учет факторов, возникающих на этапе создания биосенсора. Заметим, что к оптимизации условий иммобилизации приходится возвращаться неоднократно, поскольку в процессе эксплуатации сенсора часто приходится уточнять требования по устойчивости и условиям функционирования иммобилизованного биокомпонента. В частности, это характерно для биосенсоров, предложенных для работы в стационарных условиях, при измерениях в потоке, а также при миниатюризации сенсоров, ужесточающей требования к массопереносу компонентов реакции и устойчивости сверхтонких покрытий на электродах.

Принципы регистрации сигнала в биосенсорах не отличаются от того, как это делается в химических сенсорах на основе традиционных компонентов. Например, в электрохимических биосенсорах используются явления электрокатализа, оптосенсорах – люминесценция и хемилюминесценция, физических биосенсорах – пьезоэффект и распространение поверхностных акустических волн. Тем не менее биохимическая природа распознавания и характер взаимодействия биологических компонентов и трансдьюсера на-



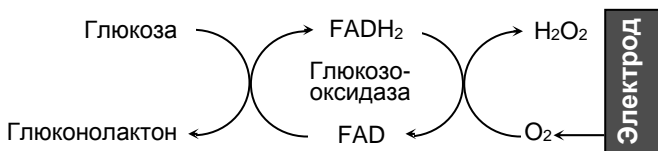
**Рис. 3.4.** Общая схема функционирования биохимического сенсора

столько своеобразны и специфичны, что в ряде случаев в процессе создания биосенсоров применяются датчики, самостоятельно в других видах анализа практически не используемые. Например, импедансометрические сенсоры регистрируют изменение импеданса поверхностного слоя, биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса – рассеяние энергии светового потока при его полном внутреннем отражении.

Общая схема функционирования биосенсора представлена на рис. 3.4. При этом биологический компонент выступает как высокоселективный сорбент, удерживая на поверхности определяемое вещество, а трансдьюсер выполняет функцию механического закрепления биологического компонента, одновременно регистрируя сигнал о биохимическом превращении.

## 3.2. ФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

Первым биосенсором, включающим биологический компонент как составную часть конструкции, ответственную за генерирование сигнала, был глюкозный электрод, предназначенный для определения глюкозы по скорости реакции ее окисления кислородом, катализируемой глюкозооксидазой. Реакция протекает с участием кофактора FAD, способного к двухэлектронному обратимому восстановлению (окислению):



В 1980-х годах Ф. Шеллер, рассматривая эволюцию глюкозных сенсоров, предложил их классификацию, выделив «три поколения» сенсоров в соответствии со способом регистрации сигнала. В сенсорах первого поколения регистрируется убыль концентрации

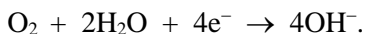
субстрата (растворенного кислорода), в сенсорах второго поколения для регенерации кофакторов ферментов используются медиаторы электронного переноса, в сенсорах третьего поколения (не нашедших адекватного воплощения в коммерческих глюкометрах) регистрируется сигнал прямого электронного переноса на активный центр фермента. Заметим, что данная классификация имеет смысл только для сенсоров на основе оксидоредуктаз, тогда как для других ферментов она реализована не в полной мере. Тем не менее классификация Ф. Шеллера достаточно широко упоминается в специальной литературе как отражение логики поступательного движения науки в области биосенсоров.

В развитии поколения биосенсоров на основе прямого электронного переноса большую роль сыграли исследования отечественных ученых, прежде всего коллектива кафедры химической энзимологии МГУ им. Ломоносова, где много сделано для понимания механизма формирования сигнала биосенсоров и его реализации в биоэлектрохимических системах на основе пероксидазы, лактатоксидазы, гидрогеназы и ряда других ферментов. В 1985 г. ими получено свидетельство на открытие, свидетельствующее о приоритете в реализации прямого электронного переноса с электрода на активный центр фермента

На сегодняшний день разработаны десятки ферментных сенсоров, в основном для биомедицинских исследований. Выбор фермента для включения в состав биосенсора определяется прежде всего природой определяемого соединения – субстрата, участвующего в биохимических превращениях, протекающих в живых организмах с участием одного или нескольких ферментов. Обычно имеется несколько альтернативных вариантов ферментативного определения, например окисление спиртов под действием алкогольоксидазы или алкогольдегидрогеназы, окисление ароматических соединений в присутствии пероксидазы или тирозиназы. В каждом конкретном случае принимаются во внимание доступность фермента (наличие коммерческих препаратов, простота выделения и очистки), его стабильность при хранении и иммобилизации, наличие удобных для аппаратурного оформления способов регистрации сигнала, требуемые аналитические и операционные характеристики сенсора. Практически для каждого определяемого соединения можно подобрать несколько ферментных сенсоров в соответствии с условиями их эксплуатации и требуемыми параметрами чувствительности, а также себестоимости определений. Современная тенденция – переход на ферменты микробного происхождения. Это диктуется соображениями биоэтики, а также удобством и более низкой стоимостью их получения. Ферменты выших животных получают, встраивая соответствующие гены в ДНК одноклеточных организмов.



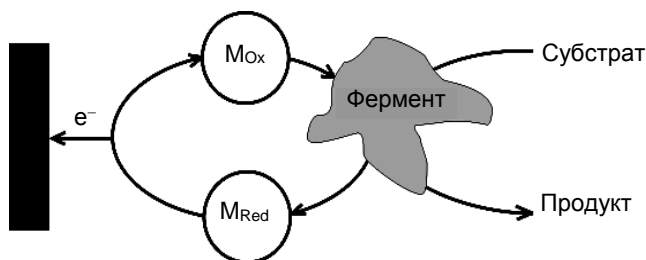
Скорость ферментативной реакции, протекающей на поверхности преобразователя сигнала, определяют по изменению концентрации исходных веществ (субстратов) или продуктов их превращения в ходе реакции. Первый способ представлен практически только сенсорами на основе оксидоредуктаз, для которых таким веществом является *кислород*. Это связано с удобством амперометрического определения кислорода с помощью электрода Кларка – платинового электрода, покрытого мембраной из гидрофобного материала. Кислород диффундирует через мембрану к электроду, на котором восстанавливается с переносом четырех электронов:



Выпускаются специальные приборы – оксиметры, в которых шкала отградуирована непосредственно в единицах концентрации или парциального давления кислорода. По кривой расходования кислорода можно следить за изменением активности фермента или концентрации определяемого вещества – субстрата, которая уменьшается по мере его превращения. При этом сигнал ферментного сенсора снижается. В стационарных условиях убыль кислорода компенсируется диффузионным переносом из объема раствора. Поскольку за время измерения степень превращения субстрата невелика, сигнал ферментного сенсора стабилен. Его зависимость от концентрации субстрата в объеме раствора в целом имеет сигмовидный характер, но в достаточно широком диапазоне концентрации аппроксимируется линейной функцией. Такие сенсоры в соответствии с природой факторов, влияющих на сигнал, можно определить как *кинетические* или *динамические*.

Наряду с амперометрическими биосенсорами разработаны устройства, в которых потенциал электрода изменяется линейно (постояннотоковая линейная и циклическая вольтамперометрия) или же на электрод подаются кратковременные импульсы напряжения (до 50 мс) различной формы и амплитуды, причем измерение тока проводится в конце каждого импульса. Используются различные формы модулирующего напряжения и регистрации сигнала, позволяющие повысить чувствительность за счет снижения вклада нефарадеевских токов и улучшения разрешения близкорасположенных пиков.

Оксидоредуктазные биосенсоры, позволяющие следить за скоростью ферментативной реакции по расходу субстрата, имеют ряд недостатков. Главный из них – зависимость сигнала от концентрации растворенного кислорода, находящегося в равновесии с атмосферным воздухом. С одной стороны, такое равновесие компенсирует убыль кислорода в ферментативной и электродной реакции, а с другой, – оно недостаточно подвижно и при высокой поверхностной концентрации фермента может лимитировать сигнал биосенсора. Кислород – универсальный окислитель; помимо целевой био-



**Рис. 3.5.** Схема функционирования медиаторного ферментного сенсора  
 $M_{Ox}$  и  $M_{Red}$  – окисленная и восстановленная формы медиатора

химической реакции он участвует в других конкурентных взаимодействиях – окисляет компоненты пробы и частично инактивирует фермент. В условиях катодного процесса на платиновых или углеродных электродах это может сопровождаться осмолением их поверхности. Для предотвращения осмоления в современных сенсорах на основе оксидоредуктаз обычно используются синтетические и природные медиаторы электронного переноса. Схема функционирования медиаторного ферментного сенсора приведена на рис. 3.5.

Применение медиаторов позволяет избежать побочных реакций олигомеризации органических компонентов раствора, а в ряде случаев – повысить избирательность электродной реакции, т. е. селективность сигнала. Примеры медиаторных реакций рассмотрены в гл. 2. Заметим лишь, что эффективность медиаторной системы можно оценить по величине константы скорости реакции переноса электрона, определяемой из зависимости потенциала пика в условиях циклической вольтамперометрии от скорости сканирования.

По сравнению с «классическими» химически модифицированными электродами к медиаторам в ферментных электродах предъявляются более высокие требования. Прежде всего они должны обеспечить доступность центров переноса электрона. Лучше всего это достигается при введении медиаторов в раствор. Однако в таком случае в биологические образцы вносятся посторонние соединения. Чтобы исключить их влияние медиаторы включают в состав поверхностного слоя сенсора либо ковалентно связывают с биологическими компонентами. При варьировании длины линкера, места присоединения медиатора и его природы изменяется эффективность электронного переноса и, следовательно, чувствительность биосенсора к изменению концентрации органического субстрата.

Второй способ измерения ферментативной активности – определение концентрации пероксида водорода, продукта реакции оксидоредуктаз (табл. 3.1). Ее можно измерить амперометрически по току окисления или восстановления  $H_2O_2$ , в том числе с использованием растворимых или иммобилизованных медиаторов электрон-

**Таблица 3.1. Ферменты, применяемые для определения органических субстратов по току восстановления пероксида водорода**

Субстрат	Фермент	Субстрат	Фермент
Глюкоза	Глюкозооксидаза	Фенол	Тирозиназа, пероксидаза
Мочевая кислота	Уриказа	Аминокислоты	Оксидазы L-, D-аминокислот
Гипоксантин	Ксантиноксидаза	Амины	Моноаминоксидаза
Холестерин	Холестеролоксидаза, холестерол-эстераза	Формальдегид	Формиатоксидаза
Молочная кислота	Лактатоксидаза	Яблочная кислота	Малатоксидаза
Щавелевая кислота	Оксалатоксидаза	Этанол	Алкогольоксидаза
NADH	NADH-оксидаза	Глицерин	Глицеролоксидаза

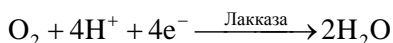
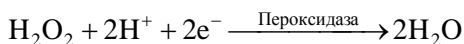
ного переноса, таких как металлоцианаты (берлинская лазурь) или фенотиазиновые красители. Наиболее эффективные медиаторы электронного переноса способны снижать перенапряжение без дополнительного усложнения конструкции. Так, сенсор, модифицированный нанодисперсным слоем берлинской лазури, позволяет определять субмикромольные концентрации пероксида водорода по току его восстановления при 0 В относительно хлоридсеребряного электрода.

Третий по значимости способ регистрации сигнала оксидоредуктазных сенсоров – редокс-реакции между окисленными и восстановленными формами кофакторов. Это никотинамиддинуклеотид (NADH), его фосфат (NADPH), флавинадениндинуклеотид (FADH<sub>2</sub>) и пирролохинолинхинон (PQQ), а также некоторые железосодержащие белки (геминь).

Известны более 250 NAD-зависимых оксидоредуктаз, за превращениями которых можно следить по редокс-реакциям кофакторов. Интерес к электрохимическим превращениям последних стимулируется еще и тем, что в ходе таких реакций реализуется замкнутый цикл: ферментативное восстановление кофактора – электрохимическая регенерация. Например, при использовании цитохрома P<sub>450</sub>, кофактором которого является NADPH, для регистрации каталитического действия последнего необходима вторая ферментная система – глюкозофосфатдегидрогеназа, реакция которой с субстратом регенерирует активную форму NADP<sup>+</sup>. Вспомогательный фермент малоустойчив и дорог, что снижает коммерческую привлекательность соответствующих тест-систем. В электрохимическом варианте регенерация NADPH возможна по месту иммобилизации фермента в приэлектродном слое. Такой способ, в частности, применяется в биотопливных элементах.

Прямое окисление (восстановление) кофакторов на электроде обычно осложнено их участием в побочных химических и электрохимических реакциях, снижающих обратимость процесса и отравляющих электрод продуктами этих реакций. Для уменьшения рабочего потенциала и увеличения обратимости редокс-реакций кофакторов как и в первых двух случаях применяют медиаторы электронного переноса, добавляемые в раствор или присоединяемые к компонентам поверхностного слоя.

В ряде случаев удалось зафиксировать прямой (безмедиаторный) электронный перенос непосредственно на активный центр фермента. Последний обычно находится глубоко в белковой глобуле, препятствующей его физическому контакту с электродом. В частности, сигналы безмедиаторного восстановления пероксида водорода и молекулярного кислорода получены для лакказы и пероксидазы:



Безмедиаторному электронному переносу способствует предварительная обработка белка, частично «разворачивающая» глобулы. Например, при окислении поверхностных полисахаридных фрагментов пероксидазы периодатом натрия наблюдается увеличение скорости электронного переноса благодаря сокращению расстояния между железосодержащим гемом фермента и поверхностью электрода. Прямому переносу электронов способствует также непосредственная адсорбция белка на электроде без участия инертных носителей.

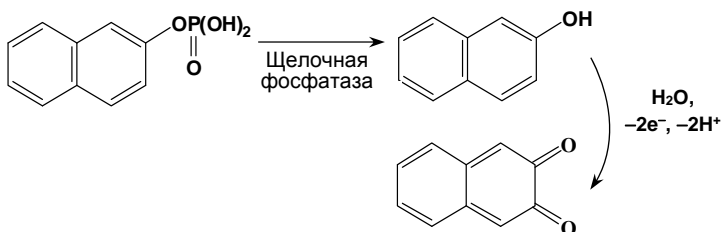
В некоторых случаях для снижения перенапряжения и повышения селективности в состав биосенсоров вводят второй фермент. Такие сенсоры называются биферментными. Так, сенсор для определения ацетилхолина содержит ацетилхолинэстеразу, ускоряющую гидролиз ацетилхолина, и холиноксидазу, катализирующую окисление образующегося холина до бетаина. Скорость последней реакции, за которой следят по количеству выделившегося пероксида водорода, служит сигналом биосенсора. При добавлении пероксидазы, катализирующей восстановление гидропероксида, возникает триферментная система.

Если ферменты катализируют прямую и обратную реакции одного и того же субстрата, говорят о субстратных циклах, по аналогии с циклическими превращениями природных субстратов. Примером является взаимное превращение молочной и пировиноградной кислот. Поскольку прямую и обратную реакции катализируют разные ферменты, речь идет не об истинном химическом равновесии, а о стационарном состоянии процесса, в котором расходуется АТФ. Этот принцип положен в основу метода определе-

ния АТФ. Полиферментные сенсоры могут включать и естественные комплексы ферментов, такие как компоненты фотохимической системы растений или цитохром Р<sub>450</sub>.

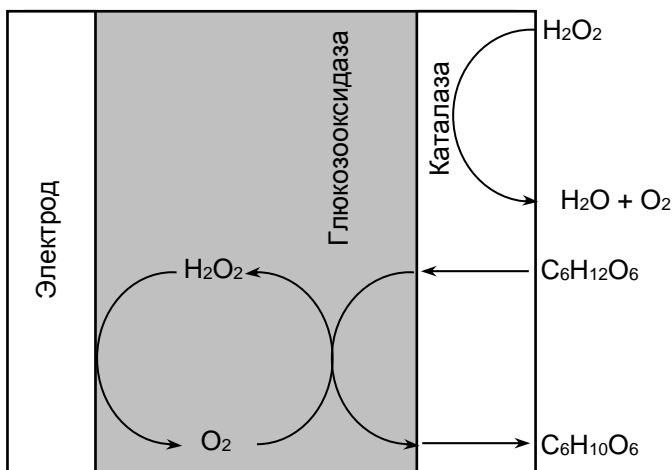
Помимо последовательного участия в ферментативных реакциях дополнительные ферменты могут осуществлять и другие функции. Например, при иммобилизации каталазы поверх оксидоредуктаз удается нивелировать мешающее действие пероксида водорода, присутствующего в образце, при определении субстратов оксидоредуктаз по токам окисления (восстановления) пероксида водорода (рис. 3.6).

В случае других ферментов, не связанных с окислительно-восстановительными превращениями субстратов, для регистрации сигнала используются электрохимические реакции продуктов ферментативных реакций. Так, реакции с участием гидролитических ферментов часто сопровождаются образованием ароматических спиртов, способных в отличие от исходного эфира окисляться на аноде до соответствующих хинонов. Например, при гидролизе нафтилфосфата под действием щелочной фосфатазы образуется нафтол, окисляющийся на электроде:



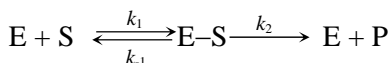
Аналогичным образом ферментативный гидролиз индофенилацетата дает индофенол, способный к химическому окислению растворенным кислородом или к анодному окислению на электроде. Эфиры тиохолина под действием холинэстеразы дают тиохоллин, определяемый по токам катодного восстановления на ртутном электроде (после образования меркаптида) или окисления до дисульфида на платиновом и углеродном анодах. Такие реакции имеют значение не только для определения субстратов, многие из которых были синтезированы для измерения сигнала биосенсора и в природе не встречаются.

Ферментативные реакции с участием гидролаз используются в иммуно- и ДНК-сенсорах, где ферменты служат метками и их активность является мерой содержания определяемого вещества — белка или олигонуклеотида. Измерение активности ферментов по току окисления (восстановления) продуктов ферментативных реакций используется и при количественном определении ингибиторов ферментов.



**Рис. 3.6.** Схема функционирования биферментного сенсора на основе глюкозооксидазы и катапазы

Для количественного описания сигнала ферментных сенсоров обычно принимают ряд допущений. Во-первых, в пределах ферментсодержащего слоя фермент распределен равномерно. Во-вторых, отсутствуют другие, кроме диффузионных, лимитирующие факторы транспорта низкомолекулярных компонентов реакции, в том числе влияние локальных изменений pH в результате выделения кислых продуктов окисления, что характерно для оксидоредуктаз. Тогда для ферментативной реакции



величину тока на электроде можно описать с помощью второго закона Фика:

$$\frac{d[C(x,t)]}{dt} = D \frac{\partial^2 [C(x,t)]}{\partial x^2}.$$

Если в левую часть этого выражения подставить уравнение Михаэлиса–Ментен для скорости ферментативной реакции

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_2[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

то получим зависимость, описывающую величину отклика ферментного сенсора  $i_k$  в стационарных условиях для  $[S] \gg K_M$  (лимитирующая стадия – ферментативное превращение субстрата):

$$i_k = \frac{i_{\max} [S]}{K_M + [S]},$$

где  $E$  и  $S$  – фермент и субстрат соответственно;  $k_2$  – константа скорости лимитирующей стадии ферментативного процесса;  $[E_0]$  – исходная концентрация фермента;  $C$  – концентрация продукта  $P$ , окисляющегося или восстанавливающегося на электроде;  $K_M$  – константа Михаэлиса. Последнее выражение иногда называют электрехимической формой уравнения Михаэлиса–Ментен.

Максимальное значение сигнала сенсора  $i_{\max}$  можно найти из зависимости

$$i_{\max} = \frac{nFALk_2[E_0]}{2},$$

где  $L$  – толщина биослоя, содержащего фермент;  $A$  – площадь электрода.

Если лимитирующей стадией реакции является диффузионный перенос субстрата к слою фермента, то сигнал  $i_d$  линейно зависит от его концентрации:

$$i_d = \frac{2i_{\max}D[S]}{k_2[E_0]L^2}.$$

Таким образом, если в кинетическом режиме величина сигнала сенсора пропорциональна толщине биослоя  $L$ , то в диффузионном режиме она уменьшается с его увеличением по квадратичному закону. Количественным параметром, характеризующим режим функционирования ферментного сенсора, служит безразмерный фактор  $\sigma^2$ :

$$\sigma^2 = \frac{k_2[E_0]L^2}{K_M D}.$$

Для  $\sigma^2 < 1$  превалирует кинетический контроль электродного процесса и наоборот, для  $\sigma^2 > 1$  – диффузионный.

Если реализуется прямой электронный перенос между электродом и редокс-центром иммобилизованного фермента, то изменение поверхностной концентрации окисленной и восстановленной форм фермента описывается уравнениями

$$\begin{aligned} \frac{d[E_s^{\text{Ox}}]}{dt} &= -\frac{i}{F} + k_2[S_0] \cdot [E_s^{\text{Red}}], \\ \frac{d[E_s^{\text{Red}}]}{dt} &= \frac{i}{F} - k_2[S_0] \cdot [E_s^{\text{Red}}], \end{aligned}$$

где  $i$  – регистрируемый ток;  $k_2$  – константа скорости ферментативного превращения субстрата (предполагается, что она достаточно велика для того, чтобы исключить влияние массопереноса на скорость реакции);  $[S_o]$  – объемная концентрация субстрата;  $[E_s^{Ox}]$  и  $[E_s^{Red}]$  – поверхностные концентрации окисленной и восстановленной форм фермента.

Решение этих уравнений позволяет получить зависимость регистрируемого тока от параметров процесса в виде суммы двух составляющих, первая из которых ( $i_1$ ) характеризует нернстовскую зависимость превращения адсорбированного на поверхности электрода фермента, а вторая ( $i_2$ ) – вклад каталитической ферментативной реакции окисленной формы фермента с субстратом, находящимся в растворе. В условиях циклической вольтамперометрии соответствующие зависимости имеют вид

$$i_1 = F[E_s] \frac{Fv}{RT} \frac{\exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E^o)\right]}{\left\{1 + \exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E^o)\right]\right\}^2},$$

$$i_2 = \frac{F[E_s]k_2[S_o]}{1 + \exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E^o)\right]},$$

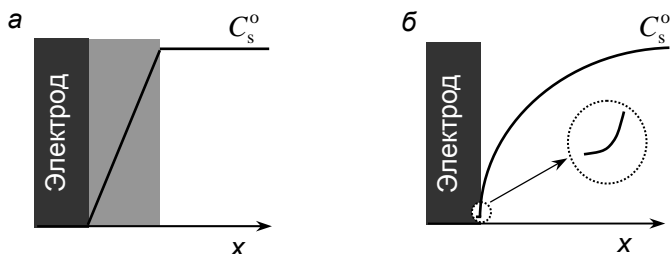
где  $v$  – скорость сканирования потенциала  $E$ ;  $[E_s]$  – концентрация фермента на поверхности электрода ( $[E_s] = [E_s^{Ox}] + [E_s^{Red}]$ );  $E^o$  – стандартный редокс-потенциал фермента. Видно, что каталитическая составляющая тока не зависит от скорости изменения потенциала, стремясь к предельному значению с увеличением перенапряжения:

$$i_2^{\lim} = Fk_2[E_s] \cdot [S_o].$$

При высокой скорости ферментативной реакции циклические кривые вырождаются; вместо пиков наблюдаются волны, причем прямая и обратная ветви циклической вольтамперограммы совпадают. Для более сложных моделей, включая модели биосенсоров с несколькими ферментами, соответствующие дифференциальные уравнения решаются численными методами для определенного набора кинетических и операционных параметров.

Естественно, что приведенные выше зависимости дают упрощенную картину функционирования ферментных сенсоров, поскольку не учитывают сопутствующих факторов, таких как влияние pH, присутствие эффекторов, действие которых может быть pH-зависимым, ингибирование избытком субстрата или продуктом





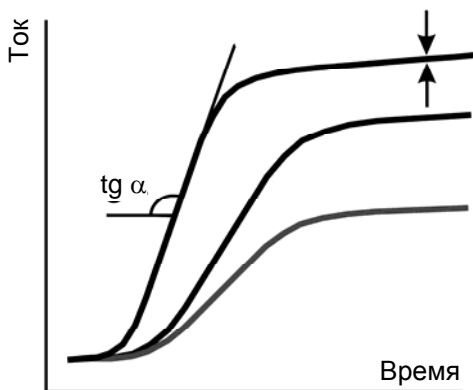
**Рис. 3.7.** Изменение концентрации субстрата в ферментных сенсорах с накладной мембраной (а) и с монослойным заполнением поверхности (б)\*

ферментативной реакции, другие отклонения от уравнения Михаэлиса–Ментен. Хотя они применимы для электродов достаточно большой площади, тем не менее, указанные выражения отражают общий вид градуировочных зависимостей для наиболее распространенных сенсоров, которые регистрируют сигнал только одного электроактивного вещества.

В случае толстослойных сенсоров, например с накладной мембраной, изменение концентрации субстрата происходит исключительно в пределах ферментсодержащей мембраны (рис. 3.7, а), тогда как в объеме раствора концентрация субстрата практически не отличается от исходной. Это выражается, например, в отсутствии зависимости характеристик сенсора от режима перемешивания раствора. Кроме того, в толстослойных сенсорах часто проявляются вторичные эффекты, связанные с продуктами ферментативной реакции. Если реакция сопровождается изменением pH, сказываются буферные свойства носителя фермента, способные сместить pH-максимум сигнала биосенсора по сравнению с pH-максимумом активности нативного фермента. Могут проявляться эффекты памяти, когда в зависимости от направления изменения pH и концентрации субстрата в объеме раствора максимум сигнала наблюдается в различных диапазонах pH. Поведение ферментов в толстослойных сенсорах более сложное, чем у нативных ферментов, и по отношению к эффекторам, присутствующим в растворе. Неспецифическая сорбция эффекторов, неферментативные превращения на поверхности носителя могут существенно изменить характер их влияния на активность иммобилизованного фермента, а значит, и на сигнал биосенсора.

В случае тонкослойных сенсоров, например при сорбции фермента непосредственно на электроде, концентрация субстрата изменяется в пределах реакционного слоя (рис. 3.7, б), толщина кото-

\* Концентрационный профиль у поверхности электрода изображен вне масштаба.



**Рис. 3.8.** Зависимость сигнала биосенсора от времени (стрелками выделено стационарное значение)

рого переменна и зависит от многих факторов. Максимальное значение сигнала сенсора зависит от соотношения скорости диффузии субстрата к электроду и скорости его превращения в пределах слоя, содержащего фермент. Значение сигнала можно измерить либо по наклону начального участка зависимости  $i$  от  $t$ , либо по стационарному значению, отвечающему равенству скоростей указанных процессов (рис. 3.8). Первый способ, называемый *динамическим откликом*, чувствителен к содержанию определяемого субстрата, но подвержен влиянию мешающих факторов, таких как температура, локальные флуктуации состава раствора и др. Второй способ (*стационарный отклик*) более устойчив к диффузионным факторам, но требует большего времени для измерения сигнала.

В *диффузионном* режиме активность иммобилизованного фермента высокая, так что диффузионный перенос не компенсирует полностью убыли субстрата в ферментативной реакции. В результате ферментсодержащий слой не насыщен субстратом, при этом часть активных центров фермента остается свободной. Концентрация субстрата в слое изменяется линейно от объемной до поверхностной, в пределе — до нуля. Сигнал биосенсора определяется исключительно градиентом концентрации субстрата, он устойчив и остается постоянным при снижении исходной активности иммобилизованного фермента до тех пор, пока это снижение не приведет к переходу биосенсора в кинетический режим. Диффузионный режим наблюдается при высокой удельной активности фермента и при торможении переноса субстрата из раствора в поверхностный слой. Для снижения скорости переноса субстрата обычно применяют дополнительные покровные мембраны, накладываемые поверх ферментсодержащего слоя.

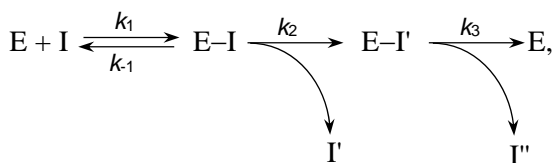
В *кинетическом* режиме скорость переноса субстрата из раствора в мембрану и скорость диффузии субстрата в мембране выше скорости его ферментативного превращения. В этом случае величина отклика биосенсора определяется исключительно кинетическими параметрами ферментативной реакции. Данный режим наиболее благоприятен для определения эффекторов ферментов. В то же время отклик биосенсора неустойчив, поскольку снижение активности фермента в результате вымывания, спонтанной инактивации или микробной деградации изменяет величину сигнала. Кинетический режим реализуется при низкой удельной активности иммобилизованного фермента, небольшой толщине мембраны и в отсутствие заметного торможения переноса субстрата на границе раздела мембрана/раствор.

Чувствительность биосенсоров при определении субстратов в значительной степени зависит от состава поверхностного слоя и, как правило, ее оценка а priori возможна только для моноферментных сенсоров. В первом приближении для этого используют константу Михаэлиса, величина которой принимается равной минимальной определяемой концентрации субстрата. Обычно она не превышает  $n(10^{-5}-10^{-6})$  моль/л. Протекание реакции не в растворе, для которого данное допущение справедливо, а на границе раздела фаз может как повысить, так и понизить эту величину. Например, в случае сенсоров на основе оксидоредуктаз увеличить чувствительность определения субстратов по току восстановления кислорода можно, если повысить скорость переноса последнего к электроду, которая лимитирует общую скорость процесса, определяющего величину сигнала-отклика. Для этого в ферментсодержащие мембраны вводят фторопласт (тефлон), имеющих гидрофобные свойства. Чувствительность медиаторных сенсоров, в возникновении отклика которых кислород не участвует, можно повысить за счет электростатических или гидрофобных взаимодействий субстрата с электродной поверхностью.

В *ингибиторных* ферментных сенсорах измеряется влияние определяемого вещества на скорость ферментативного превращения субстрата, концентрация которого известна. В отличие от субстратных биосенсоров в ингибиторных сенсорах выбор фермента и субстрата зависит от механизма действия ингибитора на фермент исходя из того, какие ключевые (таргетные) участки фермента подвергаются атаке токсиканта. Следует заметить, что специфичность ферментативного определения ингибиторов, как правило, ниже, чем субстратов, поэтому их содержание может выражаться условной концентрацией эталонного ингибитора, оказывающего такое же действие, что и вся сумма компонентов анализируемой пробы. Например, при определении фосфорорганических и карбаматных пестицидов по их ингибирующему действию на холинэстеразу в качестве эталонных токсикантов обычно выбирают параоксон или

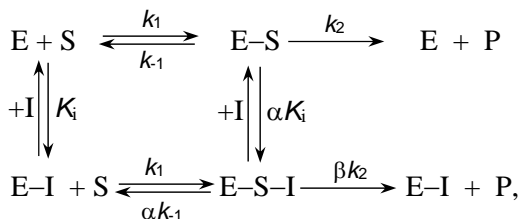
дихлофос. В токсикологических исследованиях в аналогичных целях применяют диизопропилфторфосфат.

Механизм взаимодействия фермента и ингибитора определяет также выбор концентрации субстрата и метод измерения сигнала. Если образующийся фермент-ингибиторный комплекс достаточно прочен (*необратимое ингибирование*), реакцию обычно проводят в два этапа: сначала к ферментному сенсору добавляют ингибитор (стадия инкубирования), а затем – субстрат (стадия измерения сигнала). В этом случае результат анализа не зависит от концентрации субстрата, что удобно, поскольку позволяет повысить точность измерения ингибирующего эффекта. Схему такого процесса можно представить следующим образом:



где  $E-I$  – фермент-ингибиторный комплекс, распадающийся с образованием промежуточного комплекса  $E-I'$ ;  $k_2$  и  $k_3$  – константы скорости промежуточных реакций.

В случае *обратимого ингибирования* возможных вариантов взаимодействия фермента с субстратом и ингибитором существенно больше:



где  $K_i$  – константа равновесия реакции между ферментом и ингибитором. Данная схема предполагает возможность взаимодействия всех трех компонентов реакции (фермента  $E$ , субстрата  $S$  и ингибитора  $I$ ) друг с другом в любых сочетаниях, а эмпирические коэффициенты  $\alpha$  и  $\beta$  отражают степень этого взаимодействия. Обратимое ингибирование предполагает присутствие в реакционной смеси субстрата и ингибитора одновременно, поэтому измерение сигнала проводят в одну стадию.

Помимо специфических взаимодействий ингибитора с рецепторами или функциональными группами белка снижение сигнала ингибиторного ферментного сенсора может быть обусловлено отклонениями от оптимальных условий проведения реакции. К ним относятся изменение pH, нагревание и т. д., что может служить ис-

точником ошибок при измерениях. Ингибиторные ферментные сенсоры позволяют обнаруживать до  $n(10^{-5}-10^{-9})$  моль/л ингибиторов, что зачастую достаточно для их определения в объектах окружающей среды на уровне нормативных значений без предварительного концентрирования пробы.

Следует заметить, что указанные схемы взаимодействия фермента и ингибитора справедливы для гомогенных условий реакции. Перевод реагентов на границу раздела фаз электрод/раствор способен заметно изменить общий ход реакции. Это связано со стерическими ограничениями переноса компонентов в мембране и другими факторами, обычно упоминаемыми в связи с влиянием условий иммобилизации ферментов. К ним относятся локальное изменение pH, буферная емкость и полярность среды в слое иммобилизованного фермента, неферментативные реакции превращения субстрата и ингибитора, адсорбция компонентов реакции на материале носителя и др. Чем ближе по толщине ферментный слой к монослойному, тем меньше вклад стадий массопереноса и тем больше влияние материала электрода (носителя) на результаты определения ингибиторов.

В целом это справедливо и при определении субстратов, но есть существенное различие: если биосенсор предназначен для определения концентрации ингибиторов, реакцию следует проводить в режиме, близком к кинетическому (самая медленная стадия – ферментативное превращение субстрата), если же биосенсор предназначен для определения субстратов, ее предпочтительнее проводить в условиях диффузионного контроля (лимитирующая стадия – массоперенос субстрата). В этом случае сигнал на субстрат более устойчив и менее чувствителен к влиянию неферментных факторов. Наиболее высокая чувствительность определения ингибиторов совпадает с областью наименьшей устойчивости сигнала биосенсора. По этим причинам выбор конкретных условий проведения измерений обычно представляет собой компромисс между требованиями точности и чувствительности (достижение минимального предела обнаружения ингибитора) определения. В частности, это относится к выбору концентрации субстрата, которую обычно берут заведомо больше теоретически оптимального значения, определяемого величиной константы Михаэлиса.

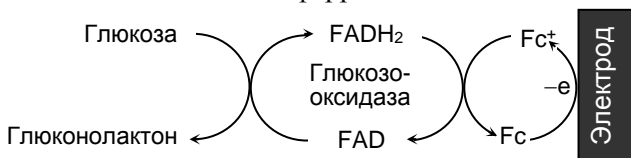
Определение активаторов, формально аналогичное определению ингибиторов, с использованием биосенсоров почти не практикуется из-за сложности получения селективного и воспроизводимого отклика. Исключением является определение кофакторов с помощью так называемых реконструированных ферментов. Для этого используются апоферменты, получаемые при удалении кофактора после иммобилизации фермента на поверхности сенсора. При этом фермент теряет свою активность, но сохраняет трехмерную структуру оставшейся белковой части. При контакте биосен-

сора с раствором кофактора активность фермента восстанавливается благодаря вхождению кофактора в соответствующий центр белковой части молекулы. Образуется так называемый реконструированный фермент, активность которого пропорциональна концентрации кофактора в растворе. С помощью реконструированных ферментов определяют кофакторы в металлоферментах, содержащих в активном центре ионы переходных металлов – марганца, железа, кобальта и др.

### 3.2.1. Ферментные биосенсоры в медицине

Импульсом к появлению биосенсоров послужили работы Кларка, предложившего конструкцию кислородного электрода на основе платины, покрытой газопроницаемой мембраной, который в сочетании с глюкозооксидазой впоследствии был использован для измерения содержания глюкозы в крови. Фермент находился между двумя диализными мембранами, закрепленными на поверхности кислородного электрода. Как и в других прикладных областях, определяющим фактором развития глюкозных биосенсоров стал платежеспособный потребитель – больные сахарным диабетом, испытывавшие дефицит в простых и надежных средствах определения содержания глюкозы в крови. В настоящее время до 85 % мирового рынка биосенсоров приходится на выпуск глюкометров. Суммарный объем продаж в 2004 г. составил около 5 млрд долларов США. По данным медицинской статистики число больных диабетом, нуждающихся в регулярных измерениях содержания глюкозы в крови, продолжает расти и составило, по оценкам ВОЗ, в 2005 г. около 300 млн человек. Хотя общее число проданных глюкометров в последние годы постепенно стабилизируется, происходит устойчивый рост продаж одноразовых сменных элементов глюкозных сенсоров.

Важнейшим достижением в создании портативных и действительно простых глюкометров, открывшим дорогу их широкому применению в быту, стала разработка Крэнфилдского биотехнологического центра, в которой измерительная часть представляет собой сменный печатный графитовый электрод с иммобилизованными на нем глюкозооксидазой и ферроценом:



Использование медиатора электронного переноса (Fc<sup>+</sup>/Fc) сделало сигнал сенсора более устойчивым и быстрым, а конструкцию измерительной части максимально простой и надежной. Современ-

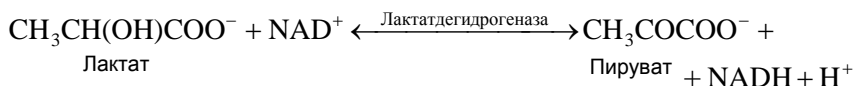
ные глюкометры основаны на тех же принципах регистрации сигнала. Основные направления их совершенствования направлены на уменьшение объема пробы, повышение точности определений, снижение болевых ощущений при отборе крови, удобство пользования и сохранения результатов определений. Разработаны глюкометры, требующие для анализа не 50 мкл крови, как в первых образцах, а менее 1 мкл, причем некоторые приборы одновременно с глюкозой определяют холестерин и молочную кислоту. В качестве медиаторов электронного переноса наряду с ферроценом и его производными используются органические комплексы Os, органические соли (в основном тетратиафульвалена и тетрацианохиноди-метана), фенотиазины и феноксазины, ферроцианид-ионы, хиноидные соединения. В некоторых глюкометрах применяется другой фермент – глюкозодегидрогеназа, кофактором которой является пирролохинолинхинон (PQQ).

Применение сверхтонких игл с вакуумным отбором крови и кассетных наборов электродов с автоматической сменой после каждого измерения сократило ошибки, связанные с неправильным позиционированием сенсора и его загрязнением биологическим материалом. Результаты последовательных измерений сохраняются в течение нескольких недель, что позволяет отслеживать динамику изменения содержания глюкозы.

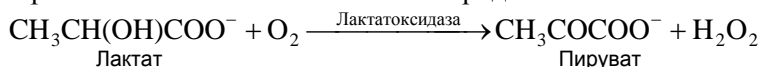
Параллельно портативным глюкометрам развиваются методы непрерывного определения глюкозы в крови и биологических тканях. Такие измерения необходимы при лечении тяжелых случаев сахарного диабета, а также при мониторинге физического состояния профессиональных спортсменов в процессе тренировок. Использование имплантируемых глюкозных сенсоров оправдано прежде всего при необходимости контроля за резкими изменениями содержания глюкозы в крови при гипо- и гипергликемии, что повышает требования к точности определений и процедурам автокалибровки и самотестирования. Основное внимание сконцентрировано на игольчатых глюкозных сенсорах. Они позволяют осуществлять непрерывный мониторинг содержания глюкозы в течение 72 ч и проводить коррекцию результатов для учета временных различий между содержаниями глюкозы в крови и окружающих тканях. Заметим, что определение глюкозы в потоке крови *ex vivo*, т. е. при измерениях во внешней ячейке, было реализовано на 12 лет раньше, чем ее определение *in vivo*. В то же время задача создания стабильного имплантируемого глюкозного сенсора со сроком жизни не менее полугода, необходимого для функционирования устройств типа искусственной поджелудочной железы, пока не решена.

Среди других метаболитов диагностического значения, определяемых с помощью ферментных сенсоров, следует выделить молочную кислоту (лактат) и продукт ее восстановления – пировино-

градную кислоту (пируват). Эти метаболиты взаимно переходят друг в друга в зависимости от редокс-свойств среды под действием лактатдегидрогеназы – NAD-зависимой оксидоредуктазы, активность которой и направление реакции зависят от соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ :



Содержание лактата является индикатором обеспечения мышечных тканей кислородом и одним из параметров оценки общего состояния пациента в послеоперационный период, при обследовании больных в состоянии истощения, спортсменов после значительных физических нагрузок и т. п. В лактатных сенсорах применяются электрохимические преобразователи сигнала на основе модифицированных электродов. В качестве модификаторов используются медиаторы электронного переноса, эффективные в отношении NADH. Это феноксазины и фенотиазины, комплексы металлов с порфиринами, фталоцианинами и цианидами, а также углеродные нанотрубки. Для определения лактата применяется также лактатоксидаза, катализирующая окисление лактата до пирувата с одновременным восстановлением кислорода:



Рабочий потенциал амперометрического отклика лактатного сенсора можно понизить, вводя в реакцию пероксидазу, иногда в сочетании с медиаторами электронного переноса. Предложено большое число медиаторных сенсоров на основе лактатоксидазы, включающих в качестве акцепторов электронов производные ферроцена, фенилендиамина, металлоцианаты и хиноны.

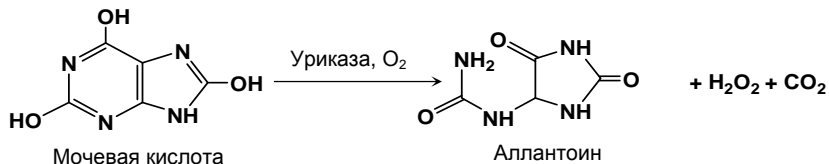
Разработаны коммерческие сенсоры на лактат, которые по конструкции напоминают глюкометры. Как правило, это плоские устройства размером с портмоне со сменными пластинками-электродами, на которые наносится капля крови объемом 25 мкл, позволяющие проводить до одного определения в минуту при содержании лактата до 30 ммоль/л с точностью 2 % и временем отклика 30 с. Такие приборы применяются для контроля за физическим состоянием спортсменов. Похожие характеристики имеют и другие портативные модели. Некоторые из них требуют всего 5 мкл крови, причем время анализа составляет 13 с. В продаже имеются комбинированные приборы для определения глюкозы и лактата на базе портативных глюкометров со сменными планарными ферментными электродами.

К числу основных метаболитов крови помимо глюкозы, лактата и пирувата относятся мочевины, мочевая кислота, креатинин, аминокислоты, аммиак, липиды, триацилглицерин и холестерин.

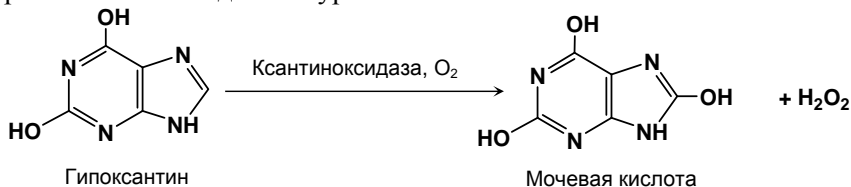


Креатинин, креатин, мочевая кислота и мочеви́на участвуют в метаболическом цикле азота, включая его выделение из организма после расщепления белков и аминокислот. Они являются индикаторами ряда дисфункций организма, связанных с развитием таких заболеваний, как подагра, мочекаменная болезнь, инфекционные заболевания половых органов. Некоторые из них позволяют судить о качестве молочных и мясных продуктов.

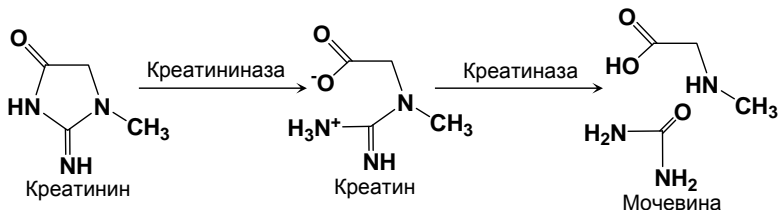
Ферментный сенсор для определения мочевой кислоты содержит уриказу, катализирующую реакцию ее окисления с образованием аллантаина и пероксида водорода, по содержанию которого регистрируют отклик биосенсора:



Предшественником мочевой кислоты является гипоксанти́н, определение которого проводят с помощью биферментного сенсора с ксантиноксидазой и уриказой:



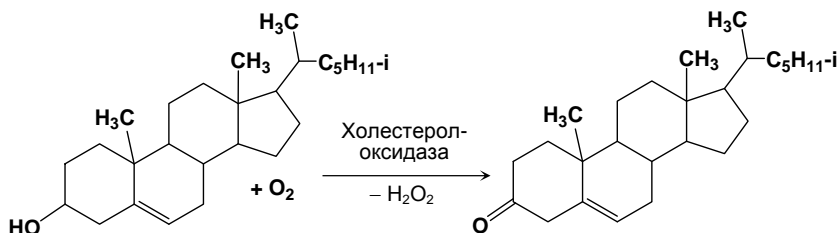
Креатинин – продукт гидролиза креатинфосфата, выделяющийся с мочой, определяют с помощью креатининазы, превращающей его в креатин, и креатиназы, катализирующей образование мочевины:



Разработаны амперометрические биосенсоры на креатинин, включающие креатининдеиминазу, креатинин амидогидролазу (одну или вместе с саркозиноксидазой), креатинин иминогидролазу. Сигналом служит ток восстановления кислорода или окисления пероксида водорода.

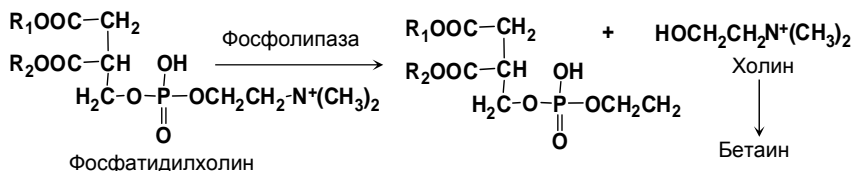
Холестерин, содержание которого контролируют при диагностике атеросклероза и других сосудистых заболеваний, определяют

с помощью холестеролоксидазы после гидролиза эфиров холестерина в присутствии холестеролэстеразы:



Выпускаются портативные анализаторы холестерина, однако они не столь распространены и предназначены в основном для клинической практики. Как правило, определение холестерина проводят совместно с триглицеридами и некоторыми другими компонентами крови с помощью портативных устройств, аналогичных глюкозным и лактатным сенсорам.

Фосфолипиды определяют с помощью биосенсоров на основе фосфолипазы, катализирующей реакцию гидролиза с высвобождением холина, который далее вовлекается в реакцию с холиноксидазой с образованием бетаина:



Сигнал сенсора регистрируют по пероксиду водорода, выделяющемуся при образовании бетаина. Аналогичным образом регистрируют присутствие ацетилхолина – нейротрансмиттера, участвующего в передаче нервных импульсов.

Глицерин определяют с помощью ферментных сенсоров на основе NAD-зависимой глицеролдегидрогеназы. Примером может служить сенсор, содержащий глицерокиназу, катализирующую присоединение фосфатного остатка в присутствии аденозинтрифосфата, глицерофосфатдегидрогеназу, окисляющую глицерофосфат, и пероксидазу для регистрации выделившегося пероксида водорода.

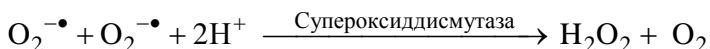
Ферменты, применяемые в биосенсорах медицинского назначения для определения соединений, имеющих значение в клиническом анализе, приведены в табл. 3.2. Большинство биосенсоров может применяться также для контроля технологических процессов переработки пищевого сырья, микробиологических процессов при получении продуктов брожения, в фармацевтической промышленности и родственных отраслях, экологическом контроле. Заме-

**Таблица 3.2. Ферменты, применяемые в биосенсорах медицинского назначения, и определяемые субстраты**

Фермент	Субстрат	Фермент	Субстрат
Глутаматоксидаза	Глутамат	β-Галактозидаза	Лактоза
Оксидаза L-аминокислот	L-Аминокислоты, лекарственные препараты – производные пролина	Пероксидаза	Аскорбиновая кислота, витамин В <sub>12</sub> , антиоксиданты
β-Тиогликозидаза, глюкозооксидаза	Гликозинолаты	Моноаминоксидаза	Первичные амины
Пенициллаза	Пенициллин	Пируватоксидаза	Пируват
Нуклеозидфосфорилаза	Инозин	Глюкозодегидрогеназа	Глюкоза (косвенно – катехоламины)
Диаминооксидаза	Путресцин	Глутаматоксидаза	Глутамат
Холиноксидаза	Холин, ацетилхолин	Глюкозооксидаза, гексокиназа	АТФ
Глутатионредуктаза	Глутатион	Супероксиддисмутаза	Супероксидный анион

тим, что реальное число разработанных ферментных сенсоров значительно больше, в таблице нашли отражение только ферменты на основе коммерчески доступных препаратов, или апробированные на реальных объектах.

Одним из важных параметров, характеризующих общее состояние организма, является содержание активных форм кислорода – супероксид-анионов, пероксида водорода и гидропероксидов, образующихся в радикальных реакциях, в том числе под действием факторов стресса. Известно также, что содержание пероксида водорода имеет тенденцию к повышению при нарушении регуляторных процессов. Предложено несколько способов определения указанных соединений. Так, супероксиддисмутаза катализирует процесс диспропорционирования супероксидного аниона:



Скорость реакции можно определить по току окисления пероксида водорода. Предложен микробный сенсор на основе углеродного микроволокна, покрытого слоем электроосажденного золота, поверх которого через цистиновые мостики иммобилизована супероксиддисмутаза. Указанный сенсор используется для контроля содержания супероксид-ионов непосредственно в биологических тканях.

Супероксид-ион ингибирует также реакцию окисления фенола, катализируемую тирозиназой. Разработан биосенсор для определения супероксидного аниона, включающий иммобилизованный цитохром *c*. Указанный белок содержит геминовый фрагмент, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях. Цитохром *c* и гемоглобин катализируют также перенос электрона с нейротрансммиттера – оксида азота, определению которого в биологических тканях и жидкостях уделяют большое внимание.

К числу обобщенных показателей состояния организма относятся и компоненты выдыхаемого воздуха. Содержание в нем пероксида водорода определяют с помощью пероксидазного сенсора или электрода, модифицированного берлинской лазурью. Метилмеркаптан, образующийся при галитозе (синдроме плохого запаха изо рта), регистрируют с помощью моноаминоксидазного сенсора. Сигнал сенсора селективен по отношению к другим компонентам выдыхаемого воздуха – первичным аминам, аммиаку, сероводороду и диоксиду серы.

Большое внимание в диагностике заболеваний уделяется определению активности ферментов. Например, имеет значение определение активности протеаз, понижающейся при дисфункциях пищеварения. Для этого предложен биосенсор, в котором слой глюкозооксидазы капсулирован с помощью тонкой желатиновой пленки. В присутствии трипсина желатин расщепляется, снижая диффузионное сопротивление переноса глюкозы. Наблюдаемый сигнал, отвечающий окислению глюкозы, зависит от активности трипсина и может быть использован для его определения при содержании до 42 пмоль/л и продолжительности измерения менее 10 мин.

Уровень трансаминазной активности – диагностического критерия при заболеваниях печени – определяют с помощью сенсоров на основе глутамат-оксалацетаттрансаминазы, глутамат-пируваттрансаминазы и глутаматоксидазы. В качестве сигнала-отклика служит ток окисления пероксида водорода, регистрируемый при 0,8 В относительно Ag/AgCl.

Показатель активности лактатдегидрогеназы служит вспомогательным признаком при патологиях печени и инфаркте миокарда. Мерой активности фермента является уровень NADH, содержание которого определяют по току электрохимического окисления с участием растворимых или иммобилизованных медиаторов, например, дигидроксibenзальдегида.

Изменение активности  $\beta$ -N-ацетил-D-гексозоаминазы, катализирующей гидролитическое отщепление концевых глюкозоаминовых и галактозоаминовых звеньев гликопротеинов, гликолипидов и глюкозоаминоглюконов, служит диагностическим критерием нарушения липидного обмена. Указанный показатель используется при диагностике болезни Тэй–Сакса и Зандхофа (снижение актив-

ности фермента), некоторых видов рака, патологий плода при беременности, аутоиммунных состояний, диабета и повреждений печени при алкоголизме (повышение активности). Активность фермента контролируют по сигналу анодного окисления нафтаола, выделяющегося при ферментативном гидролизе 1-нафтил-N-ацетил-β-D-глюкозамина.

Активность щелочной фосфатазы в крови определяют при диагностике гепатитов, циррозов, онкологических заболеваний печени и костной ткани. Кроме того, указанный фермент широко используется в различных вариантах иммуноферментного анализа, в том числе в иммуносенсорах. Активность фермента определяют по токам окисления продуктов гидролиза *n*-нитрофенилфосфата и нафтилфосфата.

Гемоглобин, содержание которого в крови изменяется при лейкемии, анемии и кровопотерях, участвует в переносе кислорода. Определение гемоглобина проводят путем включения его в цепь переноса электрона на электрод с участием гомогенных или гетерогенных переносчиков. Перенос электрона возможен также при адсорбции гемоглобина на серебряном электроде, в том числе в присутствии поверхностно-активных веществ. В этом случае речь идет о медиаторном переносе электрона с участием ионов серебра, которые образуют с гемоглобином комплекс в присутствии хлорид-ионов. В этих же целях используются каталитические системы на основе метиленового синего, метиленового зеленого, бриллиантового синего и др.

Активность протеинокиназ изменяется при онкологических и нейродегенеративных заболеваниях. Для их электрохимического детектирования предложена оригинальная методика, включающая присоединение к белкам на поверхности печатных графитовых электродов биотинированного АТФ. После этого электрод обрабатывают стрептавидином, мечеными наночастицами золота, и определяют содержание золота в условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии по току его окисления при 1,25 В.

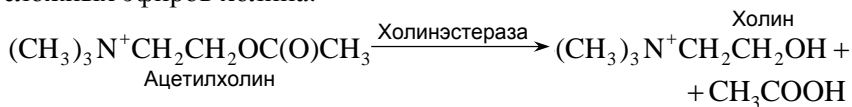
### **3.2.2. Ферментные биосенсоры в эколого-аналитическом контроле**

Определение загрязнителей окружающей среды отличается от анализа биологических образцов большим разнообразием объектов контроля и более жесткими требованиями к чувствительности и селективности сигнала. Если состав крови и биологических тканей относительно стабилен, а индивидуальные вариации биохимических показателей составляют порядка 30 %, то в случае загрязнения вод, почв при анализе экстрактов из них приходится учитывать возможные изменения содержания определяемых и сопутствующих компонентов в пределах нескольких порядков. В силу указанных причин успехи в создании коммерческих образцов или их

прототипов, использующих иммобилизованные ферменты, в эколого-аналитическом контроле далеко не так впечатляющи, как в медицине. В большинстве случаев речь идет о лабораторных разработках или адаптации для нужд экологии военных разработок, направленных на определение боевых отравляющих веществ.

Для определения загрязнителей окружающей среды можно использовать как субстратные, так и ингибиторные ферментные сенсоры, но в отличие от биомедицинских приложений приоритет следует отдать ингибиторным сенсорам, поскольку токсичные вещества имеют, как правило, точно определенные биологические мишени, максимально чувствительные к их действию.

Исторически наиболее исследованы и известны сенсоры на основе холинэстераз – группы ферментов, катализирующих гидролиз сложных эфиров холина:



Называются они в соответствии с названием соответствующего эфира холина: ацетилхолинэстераза для ацетилхолина, бутирилхолинэстераза для бутирилхолина и т. д. В живых организмах указанные ферменты катализируют реакцию только одного субстрата – ацетилхолина. Поскольку ацетилхолин является одним из наиболее важных и универсальных нейротрансмиттеров, обеспечивающих перенос нервных импульсов, ферменты класса холинэстераз присутствуют в организме всех высших животных. Более того, все они имеют похожее строение: ацетилхолинэстеразы, выделенные из электрического органа угря и эритроцитов человека, совпадают по аминокислотной последовательности на 70 %. Это позволяет использовать в биосенсорах ферменты из различных источников с сохранением биохимической (токсикологической) значимости результатов. Предпочтение отдают наиболее устойчивым и активным препаратам – уже упоминавшимся ацетилхолинэстеразам из электрического угря и эритроцитов человека, а также бутирилхолинэстеразе из сыворотки крови лошади.

Ингибиторы холинэстеразы снижают активность фермента, что может привести к судорогам, нарушениям мышечной активности, а при тяжелых отравлениях – к летальному исходу. К числу наиболее известных ингибиторов относятся фосфорорганические и карбаматные пестициды. Первые образуют прочный комплекс с холинэстеразой – фосфорилированную холинэстеразу, которая гидролитически устойчива и теряет способность взаимодействовать с ацетилхолином. Активность фермента снижается в присутствии ионов тяжелых металлов, азотсодержащих органических соединений, поверхностно-активных веществ и смешивающихся с водой растворителей. В конце XX в. ежегодно фиксировалось до

200 000 отравлений фосфорорганическими пестицидами, в основном в странах третьего мира. Хотя доля пестицидов антихолинэстеразного действия снижается, они остаются в числе наиболее распространенных инсектицидов. Интерес к холинэстеразам как компонентам биосенсоров в последнее время усилился в связи с необходимостью противодействия терроризму после использования нервно-паралитических ядов сектой «Аум Сенрике» в террористических актах в токийском метро.

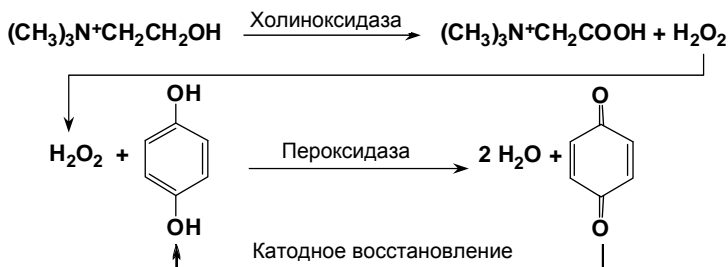
Все ингибиторы холинэстераз условно делятся на две группы. Необратимые ингибиторы (фосфорорганические пестициды) образуют прочные комплексы с холинэстеразой, тогда как обратимые ингибиторы (ионы тяжелых металлов, органические амины и др.) образуют обратимые фермент-ингибиторные комплексы, которые диссоциируют в присутствии субстрата. Поэтому их действие на фермент, как правило, не приводит к тяжелым последствиям. Иногда ко второй группе относят также денатурирующие реагенты (органические растворители, фториды и т. д.).

Амперометрическое определение активности холинэстеразы и ее ингибиторов проводят двумя способами. В первом случае используются синтетические субстраты – эфиры тиохолина, индоксилацетат или аналогичные соединения. Продукты их ферментативного гидролиза окисляются с образованием дисульфидов в случае тиохолинов и индиго – в случае индоксилацетата.

Одной из основных проблем получения сигнала-отклика синтетических субстратов является низкая селективность процессов анодного окисления тиохолина и кислородсодержащих ароматических продуктов (индоксила, индофенола и т. п.). Электродные процессы протекают при достаточно высоких анодных потенциалах и сопровождаются осмолением и отравлением электродной поверхности. Первоначально для получения воспроизводимого амперометрического отклика, в том числе в проточных системах, использовали электрохимическую очистку электродов между измерениями по определенной программе при различных анодных и катодных потенциалах, позволяющих удалять мешающие продукты с электрода. В дальнейшем приоритет получили медиаторы электронного переноса – тетрацианохинодиметан и фталоцианин кобальта. Они позволяют проводить измерения при потенциалах, исключающих окисление побочных компонентов проб. Обычно медиаторы включают в углеродные пасты печатных графитовых электродов или наносят на стеклоуглеродные и металлические электроды. Следует заметить, что роль медиаторов электронного переноса могут выполнять иодид-ионы, присутствующие в субстрате как противоионы.

При использовании в качестве субстрата ацетилхолина (или других эфиров холина) для получения амперометрического отклика применяют биферментную систему холинэстераза – холинокси-

даза. При этом холиноксидаза катализирует окисление холина до бетаина. Оба фермента иммобилизуют совместно на поверхности электрода. Холиноксидазу можно также добавлять в раствор, поскольку ее удельная активность ниже, чем активность холинэстеразы, и лимитирует общую скорость ферментативного превращения субстрата. Сигналом сенсора служит ток восстановления пероксида водорода, в том числе в присутствии медиаторов электронного переноса или третьего фермента – пероксидазы:



В 1970-х годах выпускались несколько холинэстеразных сенсоров и биосенсорных устройств для определения суммарного ингибирующего действия пестицидов антихолинэстеразного действия. Например, выпускался анализатор, в котором через реактор с иммобилизованной в пенополиуретане холинэстеразой последовательно прокачивали анализируемый раствор и субстрат – иодид бутирилтиохолина. Измерения проводили в гальваностатических условиях, регистрируя изменение потенциала платинового электрода в зависимости от концентрации ингибитора, в полуавтоматическом режиме с периодической заменой ферментного реактора. Были разработаны и специализированные варианты, сочетающие хроматографическое разделение и ферментативное определение ингибиторов в отдельных фракциях экстрактов для контроля загрязнения сельскохозяйственной продукции.

В настоящее время интерес к холинэстеражным сенсорам несколько снизился. Причиной этого, возможно, стала недостаточная селективность сигнала, что вообще характерно для ингибиторных ферментных сенсоров. Достаточно сложно вычленишь из общего сигнала вклад, связанный с присутствием наиболее опасных компонентов – фосфорорганических или карбаматных пестицидов. Кроме того, эфиры тиофосфорных кислот в организме насекомых претерпевают окисление до фосфорильных аналогов, тогда как в организмах теплокровных животных и человека такое превращение, называемое метаболической активацией, протекает медленно и неэффективно. При определении указанных пестицидов (карбофос, метафос и др.) стадию окисления приходится моделировать, обрабатывая экстракты окислителями, что усложняет эксперимент и его аппаратную реализацию.



**Таблица 3.3. Ферменты, применяемые для определения ингибиторов – загрязнителей окружающей среды**

Фермент	Определяемое вещество
Цитохром с оксидаза	Цианиды, сероводород, атразин
Тирозиназа	Фосфорорганические, тио- и дитиокарбаматные пестициды, хлорфенолы, тиомочевина, гидразин и его метилпроизводные
Пероксидаза	Цианиды, фториды, сульфиды, тиомочевина и ее производные, метилизоцианат, фенолы, $Hg^{2+}$ и ртутьорганические соединения, $Cd^{2+}$ , $Bi^{3+}$
Алкогольдегидрогеназа	Цианиды, $Hg^{2+}$
Алкогольоксидаза	$Hg^{2+}$
Кислая фосфатаза	Фториды, фосфорорганические пестициды
Щелочная фосфатаза	Фосфорорганические и карбаматные пестициды, $Pb^{2+}$
Уреаза	Ионы тяжелых металлов
Холинэстераза	Фосфорорганические и карбаматные пестициды, ионы тяжелых металлов, ПАВ, фториды
Карбоксилэстераза	Фосфорорганические и карбаматные пестициды, не имеющие заряженных групп

Учитывая, что по своей природе измерение сигнала ингибиторного биосенсора связано с частичной потерей активности фермента, целесообразен переход на одноразовые сенсоры, в которых можно использовать незначительное количество фермента (для снижения себестоимости и повышения чувствительности определений) и не предусматривается его регенерация (реактивация) после контакта с ингибитором. Такие холинэстеразные сенсоры изготавливают на основе печатных графитовых электродов, некоторые из которых доступны на рынке. В частности, налажен промышленный выпуск биосенсорных анализаторов токсичности с ацетилхолинэстеразными электродами, изготавливаемыми по толсто пленочной технологии на основе планарного платинового электрода с полимерной подложкой. Выпускаются специализированные вольт-амперографы для измерений в стационарных условиях и в потоке с помощью указанных биосенсоров.

Интересны подходы, направленные на повышение селективности сигнала холинэстеразных сенсоров. Здесь можно выделить три основных направления. Это изменение природы субстрата и фермента, совместное использование нескольких холинэстераз в мультисенсорных системах и сочетание холинэстеразных сенсоров с другими датчиками, как биологическими, так и химическими. Так, для раздельного определения пестицидов предложены биосенсоры на основе холинэстераз из различных источников, иммобилизован-

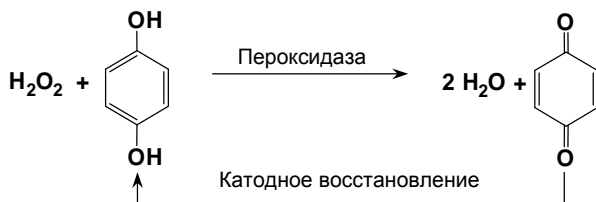
**Таблица 3.4. Ферменты, применяемые для определения токсичных субстратов**

Фермент	Субстрат	Фермент	Субстрат
Сульфитоксидаза	SO <sub>2</sub> , сульфиты	Цитохром <i>c</i>	SO <sub>2</sub> , сульфиты
Лакказы	Фенолы, амины	Цитохром P <sub>450</sub>	Амины, спирты
Пероксидаза	То же	Фосфатриэстераза	Пестициды
Тирозиназа	То же	Аминооксидаза	Амины
Уреаза	Мочевина	Роданеза	Сероводород

ных на нескольких печатных электродах. Присутствие тяжелых металлов оценивают по реакциям ингибирования уреазы (фотометрическое или потенциометрическое детектирование сигнала) и ацетилхолинэстеразы. Опубликованы результаты сопоставления данных определения загрязнителей, полученных с помощью ингибиторных холинэстеразных сенсоров, с данными биологического тестирования с использованием дафний и парameций (оценка токсичности сточных вод по смертности тест-организмов). Примеры использования ферментов в ингибиторных биосенсорах для определения загрязнителей окружающей среды приведены в табл. 3.3.

Для определения токсичных веществ применяются и субстратные биосенсоры. По сравнению с ингибиторными биосенсорами они имеют преимущество в том, что после измерения сигнала отсутствует необходимость в регенерации фермента, связанного в комплекс с ингибитором. При этом измерение проводится в один этап – добавление анализируемого раствора, содержащего субстрат. Однако чувствительность таких сенсоров заметно ниже, чем ингибиторных. В большинстве случаев речь идет об определении микромолярных концентраций субстратов. Применительно к загрязнителям окружающей среды это означает, что перед измерением необходимо проводить концентрирование пробы. В табл. 3.4 приведены примеры ферментов, используемых в субстратных биосенсорах для определения токсичных веществ.

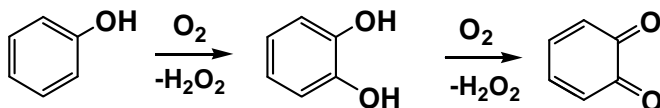
Наибольшую перспективу имеют сенсоры на основе пероксидазы и тирозиназы, способных катализировать реакции окисления широкого круга токсикантов, прежде всего фенолов и аминов. Определение фенолов проводят по пероксиду водорода, расходуемому или выделяемому в зависимости от природы фермента. В случае пероксидазы фенолы определяют по количеству образующегося продукта окисления. Его катодное восстановление в ряде случаев приводит к регенерации исходного соединения в пределах поверхностного слоя. Это повышает чувствительность определений по сравнению с другими биосенсорами – оптическими или флуоресцентными. На рис. 3.9 на примере гидрохинона показано



**Рис. 3.9.** Схема циклического превращения гидрохинона

циклическое превращение субстрата. Сенсоры на основе пероксидаз используются также для определения сверхмалых количеств пероксида водорода – индикатора загрязнения воздуха.

Тирозиназа (полифенолоксидаза) катализирует окисление фенола и других ароматических соединений, легко окисляющихся кислородом воздуха. Реакция протекает в несколько стадий, включая внедрение второй гидроксильной группы и последующее окисление субстрата до хинона. Внедрение гидроксигруппы происходит преимущественно по *орто*- и *пара*-положениям. За скоростью реакции следят по изменению концентрации пероксида водорода или восстанавливающегося на катоде продукта реакции



Селективность пероксидазного определения ароматических спиртов и аминов можно повысить с помощью батареи биосенсоров, содержащих пероксидазы и тирозиназы различного происхождения.

Пероксидазные и тирозиназные сенсоры являются альтернативой традиционным способам оценки общего загрязнения коммунальных и производственных сточных вод легко окисляющимися органическими соединениями. Они позволяют оценить степень загрязнения в течение 20–60 мин в полуавтоматическом режиме, хорошо сочетаются с имеющимися средствами измерений (оксиметры, респирографы и т. п.), выгодно отличаются от традиционных средств «мокрой химии» продолжительностью анализа (до 20 суток в случае БПК), не требуют высокой квалификации персонала.

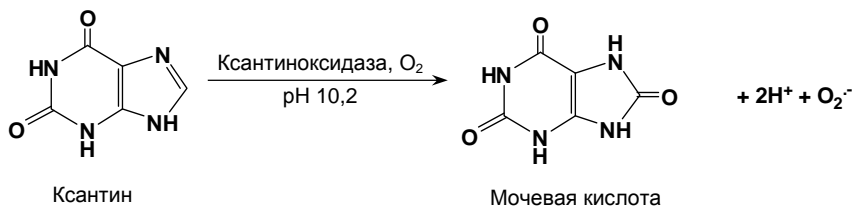
Гидролаза органических эфиров фосфорной кислоты – фермент, катализирующий гидролитическое расщепление фосфорорганических пестицидов и боевых отравляющих веществ нервно-паралитического действия. В отличие от холинэстеразы сенсоры на основе этого фермента позволяют проводить определение в одну стадию. Измеряемым сигналом служит изменение pH при выделении фосфорной кислоты (ее неполных эфиров). Разработаны автоматизированные системы контроля этих веществ в воде и в возду-

хе, в том числе в рамках борьбы с терроризмом. Описано применение в биосенсорах как самого фермента, полученного из генетически модифицированных микроорганизмов, так и бактерий, продуцирующих этот фермент (микробные сенсоры).

Перспективным компонентом для использования в субстратных биосенсорах является цитохром  $P_{450}$ . Этот полиферментный комплекс, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени, играет важную роль в механизме детоксикации чужеродных соединений. Наряду с цитохромами  $P_{448}$  и системами их регенерации – NADPH-редуктазами, указанный фермент осуществляет функцию С-гидроксилирования и N-метилования большой группы субстратов, включающих липиды, фармакологические препараты, а также небольшие молекулы ксенобиотиков – производных анилина, фенола и полиаминов. Механизм окисления весьма сложен и в зависимости от природы субстрата может протекать по-разному.

Сложность регенерации активной формы цитохрома  $P_{450}$ , требующей присутствия малоустойчивого и дорогостоящего NADPH и соответствующего фермента – NADPH-редуктазы, препятствует его прямому использованию в составе биосенсоров. Для решения проблемы регенерации NADPH предложены различные подходы, в том числе применение вместо NADPH-редуктазы более доступного и устойчивого фермента – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также прямое окисление NADPH на электроде, модифицированном медиаторами электронного переноса. Кроме того, вместо цитохрома  $P_{450}$  можно использовать органеллы (митохондрии), содержащие необходимые для реакции компоненты. На основе цитохрома  $P_{450}$  предложены биосенсоры для определения анилина и других окисляющихся соединений.

Наряду с биосенсорами на основе пероксидазы сумму активных форм кислорода определяют также по продуктам окисления некоторых белков и гетероциклических оснований (ксантин, креатин, гипоксантин). Кроме того, по изменению концентрации активных форм кислорода определяют природные (глутатион, цистеин, витамины А, С, Е и В<sub>6</sub>) и синтетические (ионол) антиоксиданты, подавляющие активность супероксидных анионов. Для их генерирования обычно используется реакция окисления ксантина под действием ксантиноксидазы:



Содержание антиоксидантов определяют также по скорости их пероксидазного окисления и кулонометрически в реакциях с электрогенерированными окислителями.

### 3.3. ДНК-СЕНСОРЫ

Нуклеиновые кислоты и прежде всего дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) являются одними из наиболее перспективных элементов распознавания в составе биосенсорных устройств. Повышенное внимание, уделяемое ДНК-сенсорам, обусловлено как особенностями строения рецепторов, так и актуальностью решаемых с их помощью задач.

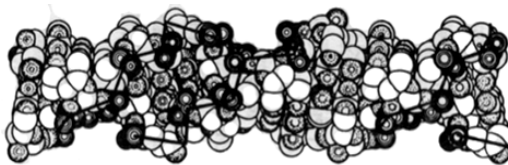
ДНК способны образовывать различные связи с определяемыми соединениями. Благодаря многоточечному (или кооперативному) взаимодействию за счет водородных, электростатических, донорно-акцепторных связей и гидрофобных взаимодействий с биологически активными молекулами ДНК реагируют высокоспецифично, что делает их перспективными элементами биосенсоров. Интерес к созданию ДНК-сенсоров связан с решением следующих биоаналитических и медицинских проблем:

- идентификация биологического материала по первичной последовательности нуклеотидов (установление отцовства, расшифровка генома, диагностика патогенных микроорганизмов и вирусов);
- совершенствование методов ранней диагностики и лечения онкологических заболеваний (скрининг противоопухолевых препаратов, ранняя диагностика по специфическим биохимическим маркерам);
- определение фармакологических препаратов противоракового действия и ДНК-повреждающих факторов, включая действие мутагенных факторов, ионизирующего излучения и др.

Существуют три подхода к вольтамперометрической регистрации взаимодействия ДНК с определяемыми веществами. В первом случае специфические изменения структуры ДНК (обратимые и необратимые конформационные изменения, частичный гидролиз, метилирование или окисление отдельных нуклеотидов) обнаруживают по изменению электрохимических характеристик молекул ДНК, адсорбированных на электроде.

Второй подход основан на включении в состав олигонуклеотидов ковалентно связанных меток, обнаруживаемых с помощью электрохимических сенсоров. Это могут быть электрохимически активные группировки, ферменты, органические комплексы переходных металлов и т. п.

Третий подход предполагает измерение электрохимических характеристик низкомолекулярных компонентов – маркеров, кото-

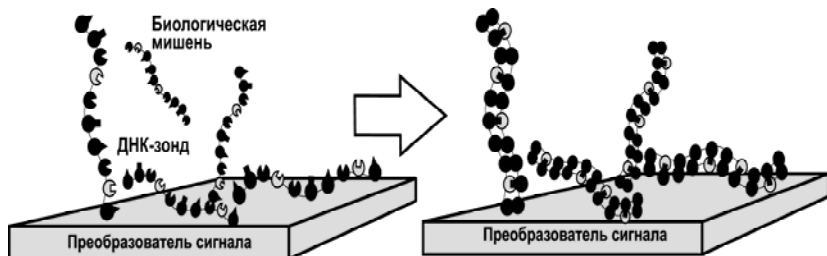


**Рис. 3.10.** Двухцепочечная спираль ДНК

рые способны взаимодействовать с ДНК, и которые добавляют в раствор до или совместно с анализируемым образцом.

В соответствии с особенностями функционирования и решаемыми задачами все ДНК-сенсоры можно условно разделить на две группы. Первую составляют ДНК-сенсоры для регистрации гибридационных взаимодействий. Под гибридизацией понимают комплементарные взаимодействия пар нуклеотидов аденин – тимин и гуанин – цитозин, благодаря которым происходит связывание и формирование спирали двухцепочечной ДНК (рис. 3.10). Взаимодействие происходит по принципу каждый с каждым и отличается абсолютной специфичностью, что позволяет использовать ДНК-сенсоры для решения задач идентификации последовательности нуклеотидов. В реальных условиях для этого используется не полная последовательность ДНК, которая слишком велика, а отдельные олигонуклеотидные фрагменты, отражающие особенность строения целевой ДНК и позволяющие надежно идентифицировать ее происхождение. Один такой фрагмент, называемый ДНК-зондом, иммобилизуют на электроде, а второй – биологическую мишень – обнаруживают в специально подготовленной биологической пробе (рис. 3.11). Помимо задач медицинской диагностики (установление природы патогенной микрофлоры) такие сенсоры могут регистрировать точечные мутации нативной ДНК и генетический полиморфизм (природные вариации нуклеотидной последовательности ДНК в рамках отдельных генов, ответственных за синтез белков), а также повреждающее действие генотоксических факторов.

Вторую группу составляют ДНК-сенсоры для обнаружения и количественной оценки присутствия определяемых соединений, не содержащих нуклеотидных фрагментов. Их применяют для характеристики взаимодействий между ДНК и регуляторными белками, аутоиммунными антителами к ДНК, а также для определения низкомолекулярных соединений – противораковых препаратов, биомаркеров заболеваний, загрязняющих веществ канцерогенного действия и др. В качестве элемента распознавания в них могут применяться одно- и двухцепочечные олигонуклеотиды, а также нативная и термически денатурированная ДНК. Такие сенсоры, называемые также аффинными, малоселективны, поскольку определяемые соединения реагируют с отдельными нуклеотидами или нук-



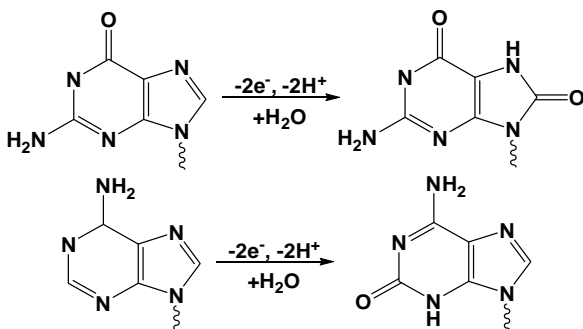
**Рис. 3.11.** Схема процесса гибридизации между ДНК-зондом и комплементарной зонду биологической мишенью

леиновыми парами оснований. В частности, в молекуле нативной ДНК присутствуют все нуклеотиды, поэтому отклик сенсора имеет усредненный стохастический характер. То же относится к реагентам и физическим воздействиям, изменяющим трехмерную структуру ДНК или расщепляющим фосфатный остов олигонуклеотидов. Исключение составляют сенсоры, использующие методологию иммуноанализа, когда определяемое соединение или ДНК-зонд содержат активную метку (фермент, ферроцен и т. д.), дающую высокоспецифичный отклик.

### 3.3.1. Гибридизационные взаимодействия

Как отмечалось выше, в сенсорах для выявления комплементарных ДНК-зонду участков олигонуклеотидов применяются относительно короткие – до 20–30 отдельных нуклеотидов – последовательности, которые должны быть максимально свободны для взаимодействия с достаточно массивной биологической мишенью. Их доступность достигается благодаря использованию мягких методов иммобилизации на основе адсорбции, включая электростатическую (на положительно поляризованных электродах), и ковалентной иммобилизации с участием концевых функциональных групп, специально введенных при модифицировании (биотинированные, аминированные, тиолированные ДНК-зонды). Например, введение терминальных сульфидрильных групп позволяет получать на золотом электроде слои ДНК с ортогональным расположением молекул, что облегчает процесс гибридизации. Плотность заполнения поверхности электрода можно регулировать введением длинноцепочечных меркаптанов. Они же помогают подавить неспецифическую адсорбцию ДНК, «приподняв» их с поверхности электрода после ковалентной пришивки.

Исторически первый метод электрохимического определения биологических мишеней, комплементарных ДНК-зонду, располагающемуся на поверхности электрода, был разработан для самой



**Рис. 3.12.** Электрохимическое окисление гуанина и аденина на серебряном и графитовом электродах

ДНК. В определенных условиях все нуклеиновые основания ДНК проявляют электрохимическую активность. Однако их сигналы можно зарегистрировать только после полной денатурации биополимера, например в сильнощелочных средах. В этих же условиях на медных электродах наблюдается окисление сахаридных остатков ДНК. В нейтральных растворах сигналы ДНК впервые были зарегистрированы на ртутном электроде. После частичной денатурации ДНК анодные реакции окисления гуанина и аденина протекают также на серебряном и графитовом электродах (рис. 3.12).

Поскольку адсорбция ДНК на электроде приводит к резкому увеличению емкостной составляющей тока, сигнал-отклик регистрируют с помощью импульсной или дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Разработаны специальные варианты модуляции сигнала, например инверсионная хронопотенциометрия. При этом регистрируется изменение потенциала во времени при наложении на электрод небольшого постоянного анодного тока. В координатах  $t - dE/dt$ , где  $E$  – потенциал электрода, а  $t$  – время, окислению ДНК соответствуют симметричные пики, аналогичные пикам на дифференциальных импульсных вольтамперограммах. Такой режим модуляции сигнала реализован в некоторых электрохимических анализаторах, в частности, он имеется в приборах серии AUTOLAB PGSTAT.

Для регистрации гибридационных взаимодействий по пикам окисления нуклеиновых оснований ДНК обычно используется хорошо выраженный пик окисления гуанина, который наблюдается при высоких анодных потенциалах около  $+1,0 \div +1,2$  В. Это снижает возможности метода при анализе сложных объектов, но поскольку регистрация одноцепочечных фрагментов проводится в строго контролируемых условиях после увеличения их числа в полимеразной цепной реакции, это ограничение при медико-биологических исследованиях не столь существенно. Для повышения



достоверности сигнала наряду с пиком гуанина регистрируют необратимый пик, относящийся к продукту его окисления. Интересно, что тот же пик можно обнаружить в некоторых катодных процессах, связанных с генерированием анион-радикалов молекулярного кислорода, в том числе с участием антиоксидантов.

Гибридизация снижает доступность гуаниновых оснований для переноса электрона по сравнению с одноцепочечным ДНК-зондом из-за их участия в комплементарном связывании. Поэтому токи окисления гуанина после контакта ДНК-сенсора с биологической мишенью снижаются. Можно повысить чувствительность определения комплементарных последовательностей, если в качестве ДНК-зонда использовать синтетический аналог, в котором гуаниновые основания заменены инозиновыми. Последние образуют комплементарную пару с цитозином, аналогично гуанину, но не способны к окислению на электроде. В результате после гибридизации все гуаниновые основания, находящиеся на поверхности электрода, будут принадлежать только биологической мишени, и ток их окисления будет пропорционален ее концентрации в пробе. Метод апробирован при определении олигонуклеотидов, специфичных для *Cryptosporidium parvum*. Предел обнаружения специфической нуклеотидной последовательности при продолжительности гибридизации 6 мин составляет 120 мкг/л.

Использование двухстадийной процедуры измерения с олигонуклеотидами, ковалентно связанными с магнитными частицами микронных размеров, позволяет снизить рабочий потенциал электрода. Магнитные носители, модифицированные биотином, аминокислотными группами, выпускаются промышленностью для разделения белков и других биополимеров (Microbeads™, Dynobeads™). После инкубирования с биологической мишенью их отделяют от раствора с помощью магнита. Далее олигонуклеотиды гидролизуют и определяют пуриновые основания (аденин и гуанин) по токам их окисления на стеклоуглеродном или ртутном пленочном электродах. В оптимальных условиях метод позволяет определять до 40 фмоль пуриновых оснований. Перенапряжение окисления гуанина можно снизить, модифицируя стеклоуглеродный электрод углеродными нанотрубками, выполняющими роль медиаторов электронного переноса. Помимо гибридизации электрохимическое окисление гуанина используется и в других ДНК-сенсорах, например при контроле генотоксических факторов и оценке содержания антиоксидантов.

Нативная ДНК сама способна участвовать в переносе электрона, но только при условии строгой регулярности строения ее поверхностного слоя – плотного заполнения и ортогонального расположения к плоскости электрода. Предположительно перенос электрона осуществляется по системе частично перекрывающихся  $\pi$ -связей ароматических нуклеиновых оснований, уложенных в па-

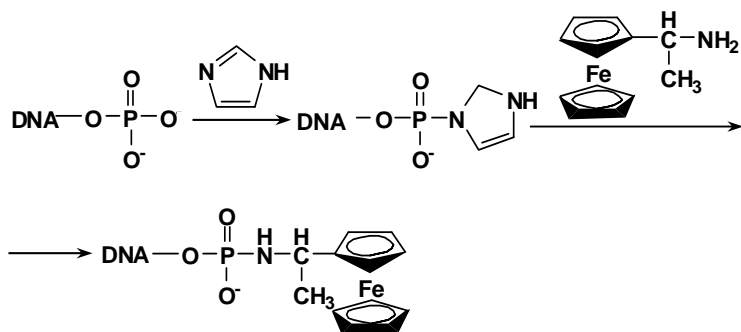
параллельные стопки внутри спирали ДНК. Хотя эффективность такого процесса относительно невысока по сравнению с прямым переносом электрона на электрод, она достаточна для переноса электрона на расстояние, равное длине молекулы ДНК и заведомо превосходящее максимальное расстояние безмедиаторного (прямого) переноса электрона. В качестве медиаторов электронного переноса используются метиленовый синий и мелдола синяя, а также  $\text{NAD}^+$ . В последнем случае индикатором процесса служит активность  $\text{NAD}$ -зависимой оксидоредуктазы, включаемой в поверхностный слой.

Методология применения меток для генерирования сигналов электрохимических ДНК-сенсоров в определенной степени является развитием метода, основанного на измерении прямых редокс-превращений ДНК; если включить в состав ДНК-зонда или мишени легко и обратимо окисляющиеся соединения, можно получить более чувствительный и более выраженный сигнал, который заведомо выше сигнала окисления гуанина. С другой стороны, многие ДНК-сенсоры заимствованы из классического иммуноанализа, для которого использование ковалентно связанных меток – ферментов (иммуноферментный анализ), ферроценов, наночастиц золота или латекса – традиционный способ.

Метки ковалентно связывают с олигонуклеотидами, получая конъюгаты, аналогичные конъюгатам иммунореагентов. Единственным существенным отличием ДНК- и иммуносенсоров является селективная ковалентная модификация олигонуклеотидов; присоединение меток осуществляется строго к концевому фрагменту, обычно 3'-терминальному гидроксиду, хотя известны олигонуклеотиды с модифицированными 5'-фосфатными группами.

В качестве меток применяются производные ферроцена, бензохинона и фенотиазина. Примером является использование ферроцена, ковалентно связанного с 5'-фосфатными группами олигонуклеотида фосфамидными связями (рис. 3.13); его сигнал проявляется в виде характерного пика окисления, регистрируемого в режиме постоянно- или переменноточковой вольтамперометрии. Если взаимодействие с ДНК облегчает контакт метки с электродом, величина сигнала увеличивается, если же такое взаимодействие затрудняет контакт – сигнал уменьшается.

Аналогичные метки используются в ДНК-сенсорах и для регистрации гибридизационных взаимодействий. В этом случае метку вводят в состав биологической мишени. При гибридизации по крайней мере часть меченных олигонуклеотидов прочно связывается с поверхностью электрода, на которой закреплен ДНК-зонд, играющий роль своеобразного якоря. После удаления несвязанных олигонуклеотидов регистрируют сигнал электрода, величина которого изменяется симбатно концентрации меченого олигонуклеотида в растворе. В реальных условиях обычно используют

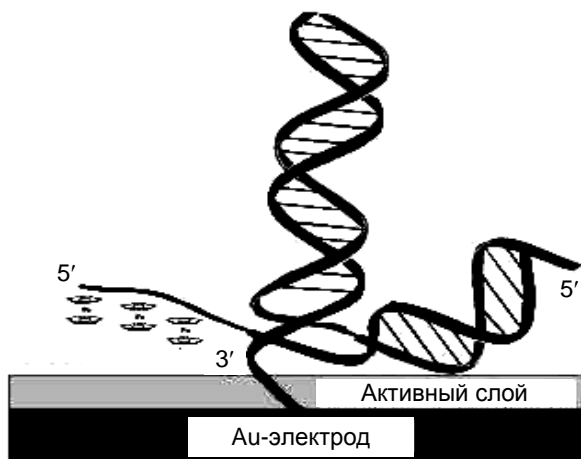


**Рис. 3.13.** Ковалентное связывание ферроцена с 5'-фосфатными группами олигонуклеотида

конкурентную схему. В этом случае меченый олигонуклеотид добавляют к раствору, содержащему аналогичный олигонуклеотид, но без метки. Поскольку аффинность обоих олигонуклеотидов к ДНК-зонду практически одинакова, то отношение их поверхностных концентраций в составе двухцепочечных олигонуклеотидов равно отношению их объемных концентраций.

Недостатком указанной схемы является то, что электрохимически активная метка, закрепленная на электроде в результате комплементарных взаимодействий, находится достаточно далеко от его поверхности. Жесткость двухцепочечного фрагмента ДНК препятствует ее подходу к электроду на расстояние, необходимое для переноса электрода. В результате регистрируемый ток, обусловленный окислением метки, имеет малую величину. Для улучшения характеристик сенсора в раствор вводят второй компонент окислительно-восстановительной системы, так называемый маркер. Он выполняет функцию медиатора электронного переноса между ковалентно связанной меткой и электродом. Другой способ повышения чувствительности ДНК-зонда – повышение подвижности фрагментов ДНК на поверхности электрода. Для этого используются линкеры, обладающие гибкостью даже после гибридизации ДНК-зонда. Применение линкеров хорошо совмещается с технологиями получения пленок Ленгмюра–Блодже или самоорганизующихся монослоев на золотом электроде.

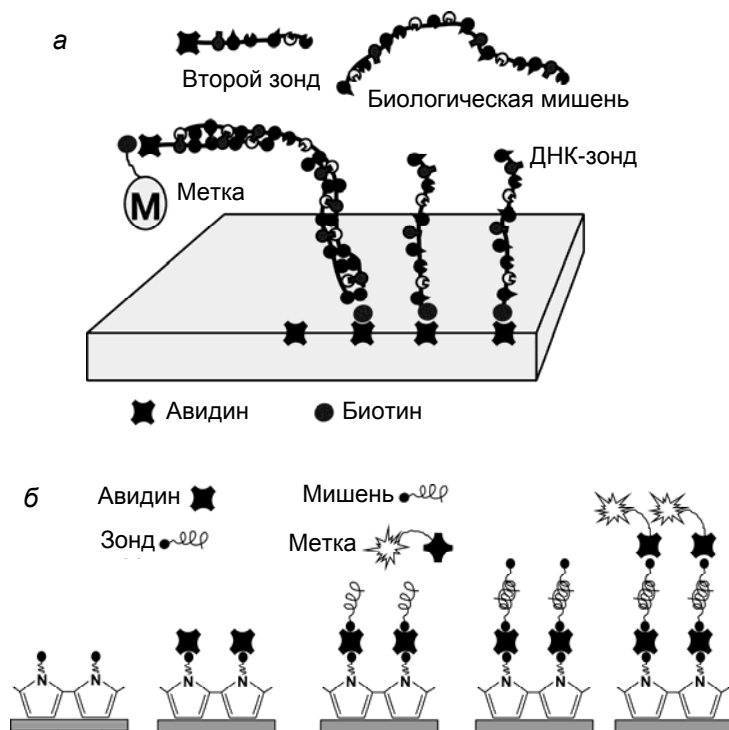
Второй вариант применения меток для регистрации гибридизационных взаимодействий можно рассматривать как аналог сэндвичевого иммуноферментного анализа. В нем используются два ДНК-зонда, комплементарные различным участкам биологической мишени. Один зонд предназначен для иммобилизации олигонуклеотида на твердом носителе, а второй, содержащий метку, – для регистрации гибридизационных взаимодействий. Так, например, в сенсоре eSensor™ фирмы Motorola первый ДНК-зонд иммобилизо-



**Рис. 3.14.** Схема функционирования сенсора Motorola eSensor™

ван в самоорганизующемся слое на поверхности золотого электрода (рис. 3.14). Благодаря гидрофобным меркаптанам, составляющим основу этого слоя, зонд «приподнят» над поверхностью преобразователя сигнала, что обеспечивает его контакт с комплементарной частью олигонуклеотидной последовательности биологической мишени в растворе. После гибридизации сенсор промывают для удаления несвязанных олигонуклеотидов и добавляют второй зонд, к 5'-фосфатным группам которого ковалентно присоединены молекулы ферроцена. Этот зонд комплементарен той части биологической мишени, которая расположена в непосредственной близости от электрода. Взаимодействуя с мишенью, он позиционирует молекулы ферроцена вблизи электрода, обеспечивая их участие в переносе электрона.

Варьируя природу зонда можно использовать один и тот же способ измерения сигнала для детектирования различных нуклеотидных последовательностей. В частности, сенсор eSensor™ представляет собой массив из 16 или 32 рабочих электродов с общим противозлектродом и электродом сравнения, которые изготавливают методом фотолитографии на одном носителе. Это позволяет путем их последовательного «опроса» с помощью специализированного устройства проводить определение различных олигонуклеотидов из одной пробы. С помощью сенсора eSensor™ можно обнаруживать не только вирусы и патогенные микроорганизмы, но решать более сложные задачи по установлению точечных мутаций ДНК. Объем реагентов, необходимый для их определения, составляет ~100 мкл.

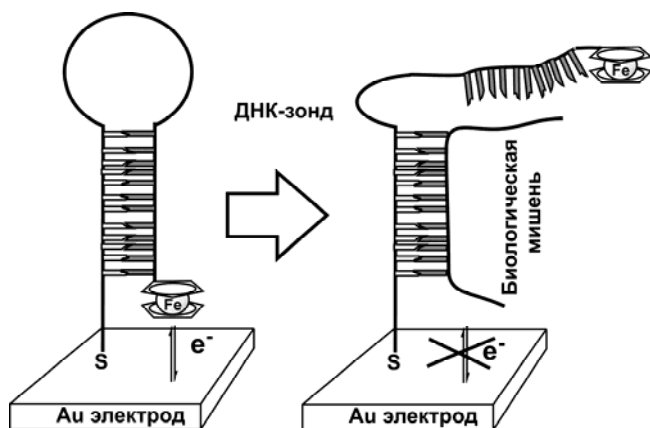


**Рис. 3.15.** Сандвичевый способ генерирования сигнала ДНК-сенсора на основе авидин-биотинового связывания

*а* – с помощью второго зонда; *б* – с помощью электрополимеризованного носителя, содержащего биотиновый фрагмент

Сандвичевый ДНК-сенсор может содержать также биотинированные биологические компоненты с авидиновыми мостиками (рис. 3.15, *а*). Это позволяет варьировать природу ДНК-зондов, сохраняя формат функционирования биосенсора. Авидин-биотиновые мостики могут включаться в состав угольно-пастовых электродов или закрепляться на электрополимеризованных носителях, например полипирроле (рис. 3.15, *б*).

Дополнительные возможности появляются при использовании технологий, разработанных для аптасенсоров с флуоресцентным окончанием. Примером является использование так называемых «ДНК-шпилек». Это частично комплементарные олигонуклеотидные последовательности, которые в результате гибридизации сворачиваются с образованием концевой кольца негибридизованных нуклеотидов. Такая конформация стерически напряжена и относительно легко разворачивается, что позволяет менять взаимное расположение отдельных участков зонда в процессе измерения. На

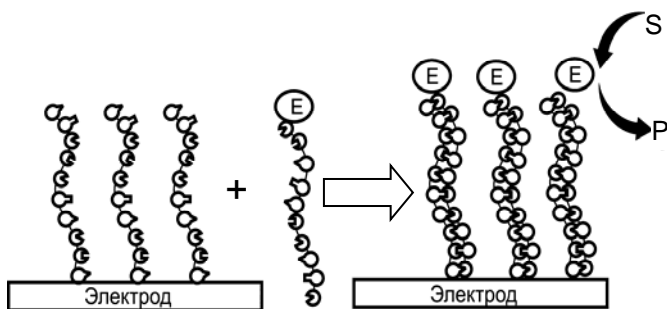


**Рис. 3.16.** ДНК-сенсор на основе ДНК-зонда шпильчатой структуры, меченного ферроценом

рис. 3.16 показана одна из возможных схем функционирования зонда на основе «ДНК-шпильки». Вначале конформация «шпильки» обеспечивает электрический контакт между электродом и концевой меткой – ферроценом, пространственно сближенным с электродом. В присутствии биологической мишени, комплементарной связывающему участку ДНК-зонда, происходит разворачивание шпильчатой структуры и образование термодинамически более устойчивого димера, в котором ферроцен отделен от электрода жестким двунитевым участком, образованным ДНК-зондом и мишенью. Это приводит к разрыву цепи переноса электрона. Преимуществом таких ДНК-зондов является возможность их многократного использования. Если после контакта с пробой ДНК-зонд нагреть, то произойдет разделение комплементарных участков зонда и мишени. После отмывки и охлаждения исходная шпильчатая структура самопроизвольно восстанавливается и ДНК-зонд готов для новых измерений.

Сандвичевые методы имеют преимущество перед конкурентными ДНК-сенсорами при определении молекул ДНК с большой массой, для которых установление конкурентного равновесия требует довольно продолжительного времени. Предел обнаружения олигонуклеотидов в сандвичевых методах может составлять до  $10^6$  молекул при продолжительности измерения около 2 ч.

Высокой чувствительности определений комплементарных мишеней можно достичь и с помощью ферментов, вводимых в состав ДНК-зондов или мишеней. В этом случае фиксация фермента вблизи преобразователя сигнала позволяет реализовать ферментативное превращение низкомолекулярного субстрата, продукт которого является электрохимически активным. Общая схема генери-



**Рис. 3.17.** Схема генерирования сигнала ДНК-сенсора с помощью меченных ферментом олигонуклеотидов

рования сигнала ДНК-ферментного сенсора приведена на рис. 3.17. Выбор фермента-метки традиционен – чаще всего применяют пероксидазу хрена (субстрат – *n*-аминофенол) или щелочную фосфатазу, катализирующую превращение  $\alpha$ -нафтилфосфата. Образующийся  $\alpha$ -нафтол определяют по току его окисления на электроде.

Использование нескольких конъюгатов позволяет проводить определение различных биологических мишеней в одном измерении. Возможно также определение поверхностных концентраций электрохимически активных белков в условиях прямого электронного переноса. Например, окислительно-восстановительные свойства цитохрома *b*<sub>5</sub>, связанного через линкер с одноцепочечным олигонуклеотидом, изменяются при гибридизации последнего с комплементарной последовательностью.

Примером использования ферментов в качестве меток в ДНК-сенсорах может служить мультисенсорная система для диагностики уринарных инфекций. Она включает 16 трехэлектродных ячеек, закрепленных на единой матрице размером 2,5×7,5 см. Измерение, как и в случае сенсора eSensor™, осуществляется в два этапа – внесение пробы и далее добавление второго олигонуклеотида, конъюгированного с пероксидазой. Сигналом служит ток восстановления окисленной формы тетраметилбензидина – органического субстрата пероксидазы. Указанная система позволяет проводить детектирование олигонуклеотидных последовательностей, специфичных для патогенных микроорганизмов, с точностью их идентификации до рода и даже до вида: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudo-monas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* и *Enterococcus sp.* Измерение сигнала проводят в условиях потенциостатической хроноамперометрии.

Интересным вариантом ферментативного усиления сигнала процесса гибридизации является сочетание ферментативной реакции и диффузионно свободных маркеров. При использовании в ка-

честве субстрата щелочной фосфатазы 5-бром-4-хлориндолил-фосфата образуется производное индиго, нерастворимое в воде. Фермент ковалентно связывают с олигонуклеотидной последовательностью и в результате гибридизации включают в поверхностный слой, содержащий гибридный двухцепочечный нуклеотид. Осаждающийся продукт ферментативной реакции блокирует перенос электрона между электродом и диффузионно свободным маркером – феррицианидом. Такая схема позволяет обнаружить до  $10^{-14}$  моль/л комплементарной мишени, что выше чувствительности электрохимического определения с  $\alpha$ -нафтолом.

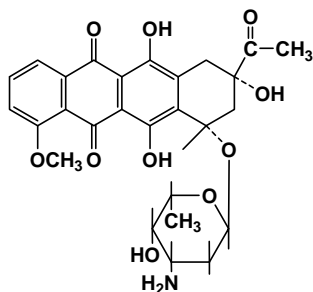
Для включения в состав ДНК-сенсоров глюкозооксидазы используются электростатические взаимодействия. Носителем фермента служит сополимер винилпиридина и акриламида, в котором пиридиновые фрагменты входят в качестве лигандов в состав дипиридильных комплексов  $\text{Os}^{2+}$ . Композит ДНК–содержащий осмий полимер осуществляет не только функции носителя фермента, но участвует в переносе электрона между глюкозооксидазой и электродом.

Другой подход, применяющийся для регистрации гибридизационных взаимодействий в ДНК-сенсорах, основан на использовании маркеров, добавляемых в раствор, по сигналу которых судят о характере их взаимодействия с ДНК. В качестве маркеров используются соединения, способные специфически взаимодействовать с нативной ДНК и обладающие свойствами медиаторов электронного переноса.

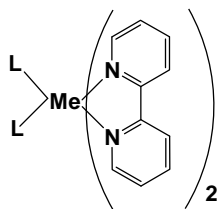
В зависимости от строения маркеры взаимодействуют с ДНК двумя способами. В первом случае они встраиваются в спираль ДНК, располагаясь между парами нуклеиновых оснований. Такие соединения, называемые интеркаляторами, должны иметь плоскую структуру, как правило, образованную конденсированными ароматическими системами. В зависимости от природы заместителей в маркерах интеркалирование может быть полным или частичным. Обычно в результате взаимодействия интеркаляторов с ДНК их сигнал уменьшается. Второй путь – координация маркеров по большим или малым бороздкам спирали ДНК без интеркалирования. В этом случае ДНК выступает как сорбент, увеличивая концентрацию деполаризатора на электроде и, соответственно, величину сигнала. Поскольку интеркалирование возможно только на двухцепочечных участках ДНК, именно маркеры-интеркаляторы позволяют установить факт гибридизации и наличие точечных дефектов, препятствующих полному связыванию комплементарных участков олигонуклеотидов.

В качестве маркеров-интеркаляторов используются различные соединения (рис. 3.18), в том числе антрациклины – дауномицин и адриамицин, которые адсорбируются на электродах, модифицированных ДНК. Накопление антрациклинов обычно проводят в сла-



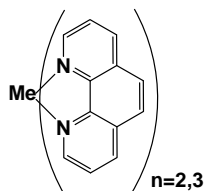


Дауномицин



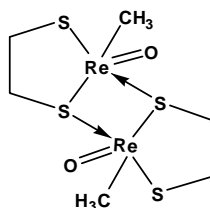
Me = Os, Co, Ru

Бипиридные комплексы  
ионов металлов

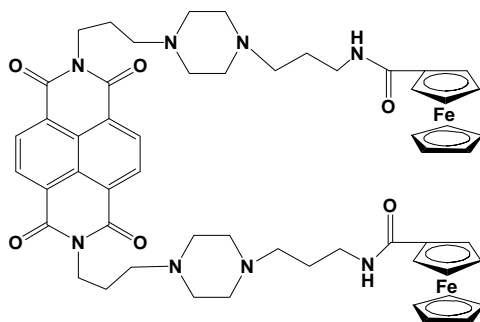


Me = Os, Co, Ru

Фенантролиновые комплексы  
ионов металлов



Комплексы Re(V)



Ферроценлнафталин-  
диимид

**Рис. 3.18.** Маркеры-интеркаляторы, применяемые для генерирования сигналов в ДНК-сенсорах при комплементарных взаимодействиях

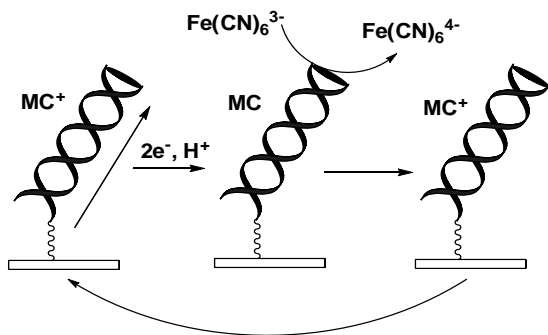
боксидной среде при потенциалах  $-0,4 \dots -0,7$  В. В этой области потенциалов образуются также анион-радикалы кислорода, которые окисляют гуанин до 8-оксогуанина. Появление сопряженных пиков окисления гуанина и 8-оксогуанина наряду с пиками окисления дауномицина или адриамицина свидетельствует о взаимодействии

последних с двунитевой ДНК. При этом наблюдается снижение токов окисления маркеров. Заметим, что восстановленные формы маркеров прочнее связываются с двунитевой ДНК, чем окисленные. Соотношение констант устойчивости комплексов можно получить из разности стандартных потенциалов соответствующих редокс-форм в присутствии ДНК.

Помимо антрациклинов к числу распространенных маркеров – интеркаляторов ДНК – принадлежит и метиленовый синий – фенотиазиновый краситель, используемый для окрашивания биологических срезов и в качестве антибактериального средства. Одна молекула красителя приходится в среднем на шесть пар нуклеиновых оснований. Наряду с интеркалированием по парам гуанин – цитозин метиленовый синий способен электростатически взаимодействовать с участками ДНК, богатыми адениновыми фрагментами, располагаясь на поверхности спирали. В последнем случае образуется достаточно лабильный комплекс, сохраняющий электрохимическую активность. Модифицирование электрода одноцепочечной ДНК приводит к увеличению регистрируемых токов окисления (восстановления) метиленового синего на 30–60 % (стеклоуглеродный и печатный графитовый электроды) по сравнению с аналогичными процессами на немодифицированных электродах. Гибридизация, сопровождающаяся интеркалированием метиленового синего, снижает сигнал его окисления, что позволяет детектировать присутствие в растворе комплементарных зонду последовательностей. Метиленовый синий успешно применяется для определения нуклеотидных последовательностей, специфичных для возбудителей ряда заболеваний – гепатита, вируса нильской лихорадки, цианобактерий и др.

К числу распространенных маркеров относятся и хелатные комплексы переходных металлов. Они способны к обратимому окислению (восстановлению) на электроде и в определенных условиях инициируют окисление гуаниновых оснований в ДНК подобно антрациклиновым препаратам. В зависимости от строения хелатного комплекса и условий переноса электрона гибридизация ДНК-зонда и биологической мишени может как снижать ток маркера (за счет экранирования редокс-центра), так и увеличивать его (в результате поверхностного накопления маркера). Например, при использовании в качестве маркера дипиридилного комплекса  $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]^{3+}$  сигнал ДНК-сенсора зависит от количества гуаниновых остатков нуклеотидной последовательности и закономерно снижается при гибридизации зонда с комплементарной мишенью. Предел обнаружения ДНК, содержащей 1497 пар оснований, составляет 550 аттомоль при числе каталитических циклов  $\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+}$  на эквивалент гуанина более 30.

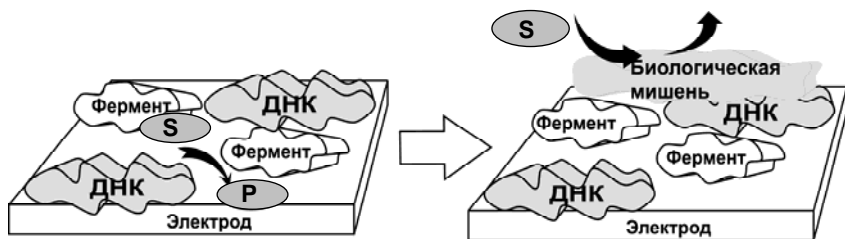
Фемтомольные пределы обнаружения, соответствующие присутствию  $n \cdot 10^{-20}$  моль ДНК в образце, получены с использованием



**Рис. 3.19.** Применение медиатора электронного переноса для регистрации гибридизации нуклеотидов в присутствии метиленового синего (МС)

в качестве интеркалятора ферроценилнафталиндиимида (рис. 3.18). За счет присутствия достаточно длинных линкеров, разделяющих интеркалируемый фрагмент и электрохимически активную часть маркера, редокс-активность ферроценовых фрагментов сохраняется и после включения маркера в комплекс с двухцепочечной молекулой ДНК. Процесс интеркалирования протекает в 80 раз быстрее, чем взаимодействие маркера с одноцепочечным ДНК-зондом, а образующийся комплекс с двухцепочечной ДНК в 4 раза прочнее, чем с одноцепочечной. Указанные параметры превосходят параметры связывания фенотиразинов и антрациклинов, что обеспечивает более высокую чувствительность сигнала ДНК-сенсора.

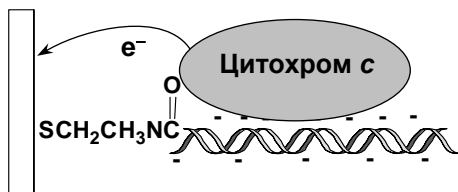
Интеркаляторы могут применяться совместно с медиаторами электронного переноса, которые участвуют в переносе электрона между ними и электродом. Например, присутствие метиленового синего в спирали двухцепочечной ДНК можно установить по току окисления (восстановления) феррицианида. Из-за собственного отрицательного заряда последний не взаимодействует с ДНК, но облегчает перенос электрона с интеркалированного метиленового синего (рис. 3.19). Помимо феррицианидов в качестве медиаторов



**Рис. 3.20.** Регистрация гибридизации за счет исключения субстрата из ферментативной реакции; S и P – субстрат и продукт ферментативной реакции

электронного переноса можно использовать аммиакатные комплексы  $Ru^{2+}$ , соединения  $Os^{2+}$  и некоторые другие электрохимически активные комплексы переходных металлов.

В роли диффузионно свободного медиатора электронного переноса может выступать белок цитохром *c*, способный участвовать в окислительно-восстановительных превращениях на электроде. Для регистрации сигнала маркера обычно используется золотой электрод, покрытый мономолекулярным слоем цистамина. К электроду пришивают ДНК-зонд, в котором концевой остаток модифицирован карбоксильными группами. Положительно заряженная глобула белка удерживается на отрицательно заряженной спирали ДНК, что способствует переносу электрона с активного центра цитохрома *c*:

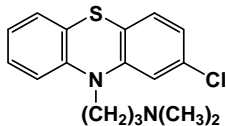


Если гибридизация не происходит, сигнал не наблюдается, поскольку одноцепочечные олигонуклеотиды не способны удерживать белок у поверхности электрода.

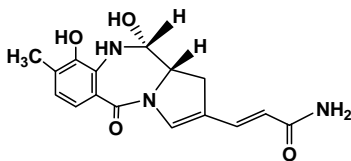
Разработаны способы регистрации гибридизационных взаимодействий, основанные на исключении субстрата из ферментативной реакции. С этой целью ДНК-зонд иммобилизуют на поверхности преобразователя сигнала или в полимерном носителе совместно с ферментом. Идея метода заключается в использовании стерических ограничений переноса субстрата к ферменту, обусловленных образованием комплекса между ДНК-зондом и биологической мишенью. В результате такого взаимодействия образуется инертный комплекс и возрастает диффузионное торможение переноса субстрата к ферменту (рис. 3.20).

### 3.3.2. Определение низкомолекулярных соединений

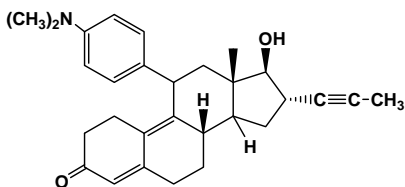
Среди ДНК-сенсоров для определения низкомолекулярных соединений наибольший интерес вызывают сенсоры для определения противораковых препаратов. Они используются как на предварительном этапе скрининга новых лекарственных веществ с определенным механизмом действия, так и в текущем биомедицинском контроле для оценки эффективности лекарственной терапии и подбора индивидуальной дозы противораковых препаратов. Ниже приведены структуры лекарственных препаратов, взаимодействие которых с ДНК изучено с применением биосенсоров:



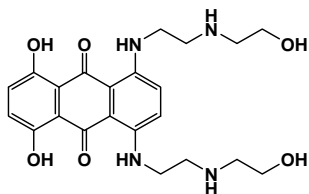
Хлорпромазин



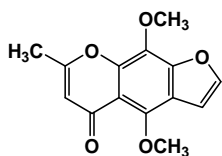
Антрамицин



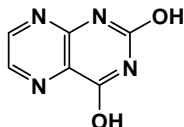
Мифепристон



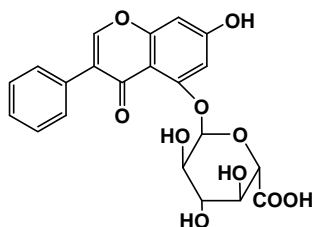
Митоксантрон



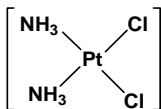
Келлин



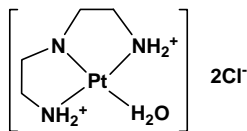
Люмазин



Байкалин



Цисплатин



Хлордиэтилтриаминоплатина(II)

Как и в случае маркеров-интеркаляторов, сигнал ДНК-сенсора определяется механизмом взаимодействия лекарственного вещества с ДНК. Если молекула препарата полностью входит в спираль ДНК, происходит частичное или полное блокирование переноса электрона с низкомолекулярного компонента на электрод. Поэтому сигнал биосенсора уменьшается. В том случае, когда интеркалирование затрагивает только часть молекулы (антрациклиновые препараты), сигнал может или уменьшиться из-за частичного блокирования активного центра молекулы или увеличиться, если окисляющиеся группы свободны, а их концентрация на преобразователе сигнала из-за комплексообразования с ДНК увеличивается. Примеры таких сигналов приведены в табл. 3.5.

Сигнал ДНК-сенсора может быть связан как с изменением характеристик реакций окисления (восстановления) самого лекарственного препарата, так и с изменением величин токов нуклеотидов

**Таблица 3.5. Сигналы амперометрических ДНК-сенсоров на лекарственные препараты**

Лекарственный препарат	Сигнал
Дауномицин	Уменьшение тока пика окисления дауномицина
Адриамицин	Уменьшение тока пика окисления адриамицина, появление сигнала 8-оксогуанина
Митоксантрон	Увеличение тока пика окисления митоксантрона, появление пиков окисления гуанина и аденина из-за нарушения структуры ДНК
Тиоридазин	Увеличение тока пика окисления тиоридазина
Хлорпромазин, фенотиазин, прометазин	Увеличение тока пика окисления фенотиазинов в комплексе с ДНК, снижение тока пика окисления гуанина
Мифепристон	Увеличение тока пика окисления мифепристона в присутствии двухцепочечной ДНК
Байкалин	Увеличение тока пика окисления байкалина в присутствии двухцепочечной ДНК
Люмазин	Уменьшение тока пика окисления люмазина и смещение его к анодным потенциалам
Келлин	Увеличение тока окисления в присутствии нативной ДНК
Хиназолины	Снижение тока окисления фенантролинового комплекса кобальта(II)
Митомицин С, цистамин, хлорди-этиленetriамино-платина(II)	Снижение тока окисления гуанина
Антрамицин	Снижение тока окисления антрамицина
Цистамин	Изменение каталитического тока выделения водорода в присутствии ДНК и/или антител к ДНК
Рифампицин	Уменьшение тока пика окисления гуанина и аденина

и продуктов их превращения. Например, митоксантрон при продолжительном контакте с ДНК вызывает нарушения ее структуры, проявляющиеся в появлении пиков окисления гуанина и аденина, отсутствующих на вольтамперных кривых ДНК до контакта с митоксантроном. При взаимодействии ДНК с адриамицином появляется пик окисления 8-оксогуанина, индикатора повреждения ДНК *in vivo* в условиях стресса.

Стехиометрия и количественные характеристики связывания лекарственных препаратов с ДНК обычно известны, в том числе благодаря исследованиям с применением биосенсорных технологий. Так, для дауномицина и нативной ДНК константа связывания составляет  $2,35 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$ , при этом одна молекула дауномицина приходится примерно на шесть пар нуклеиновых оснований. Этот

показатель изменяется в зависимости от нуклеотидного состава ДНК-зонда, так как антрациклиновые препараты координируются преимущественно по парам гуанин – цитозин. В случае менее избирательного митоксантрона одна молекула препарата приходится на три пары нуклеиновых оснований. Несмотря на стерические препятствия равновесие интеркалирования достигается достаточно быстро – в течение минуты или несколько больше.

Байкалин, выделенный из *Scutellaria Baicalensis Georgi* и проявляющий широкий спектр биологической активности (торможение репликации ВИЧ, противораковое, антимикробное, иммуномодулирующее действие), реагирует с одно- и двухцепочечной ДНК. При этом пик его окисления при 0,3 В (отн. НКЭ) уменьшается. Аналогично ведут себя индирубин и люмазин. В присутствии ДНК наблюдается закономерное смещение потенциалов пиков окисления препаратов, регистрируемое с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Сигнал можно использовать как для определения микромолярных количеств препаратов, так и для количественной оценки содержания нативной ДНК в растворе или на поверхности электрода.

Угольно-пастовый электрод, модифицированный нативной ДНК, используется для сорбционного концентрирования келлина, применяемого при лечении ряда заболеваний кожи. Пик анодного окисления келлина, регистрируемый методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии, пропорционален концентрации препарата в диапазоне концентраций от 0,05 до 0,1 мкмоль/л. Аналогичный способ накопления в виде комплекса с нативной ДНК с последующим окислением электрохимически активного препарата используется для определения эхиномицина на стационарном ртутном электроде. Митомицин С в тех же условиях ингибирует электрохимическое окисление самой ДНК; пик окисления гуанина, регистрируемый в условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии или инверсионной гальваностатической хронопотенциометрии, уменьшается при увеличении концентрации препарата в диапазоне от 0,1 до 5,0 мг/л. Такое же действие оказывают противораковые препараты на основе комплексов платины – цисплатин и хлордиэтилентриаминоплатина(II).

Мифепристон – синтетический рецептор прогестерона – взаимодействует только с двухцепочечной ДНК, адсорбированной на угольно-пастовом электроде. Это выражается в увеличении пика окисления препарата при 0,62 В (отн. НКЭ) на второй гармонике в условиях переменноточковой вольтамперометрии. Высота пика пропорциональна концентрации мифепристона в диапазоне 0,2–2,0 мкмоль/л (предел обнаружения 0,1 мкмоль/л). Так же ведет себя противомаларийный препарат хлороквин – 4-(7-хлор-4-хинолил-амино)пентилдиэтиламин, сигнал окисления которого при +0,7 В

после накопления на электроде с ДНК возрастает в 10 раз. Диапазон определяемых концентраций от 0,1 до 10 мкмоль/л.

С еще большей чувствительностью можно определять рифампицин – противотуберкулезный препарат, который взаимодействует с иммобилизованными на электроде одно- и двухцепочечными ДНК. Накопление препарата приводит к снижению пиков окисления гуаниновых и адениновых оснований ДНК при 0,86 и 1,016 В соответственно. Предел обнаружения рифампицина –  $10^{-18}$  моль/л.

Антимикробный препарат метронидазол – 1-(2-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол – связывается с нативной ДНК в растворе и на поверхности стеклоуглеродного электрода. Это приводит к уменьшению пиков его восстановления (окисления) при взаимодействии с ДНК в растворе и к их увеличению, если ДНК находится на поверхности электрода. Механизм электродного процесса включает последовательное ступенчатое восстановление нитрогруппы в молекуле метронидазола. На вольтамперограммах наблюдаются также пики окисления гуанина. В условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии ток пика окисления гуанина пропорционален концентрации метронидазола в диапазоне от 0,05 до 60 мкмоль/л. Аналогично ведут себя и другие нитроароматические соединения.

Следует заметить, что практически во всех упомянутых выше случаях использовались модельные растворы лекарственных препаратов, причем основное внимание уделялось не выбору условий их определения, а количественным и качественным оценкам взаимодействия этих препаратов с ДНК, включая параметры электронного переноса и влияние реакций комплексообразования на редокс-потенциалы деполаризаторов. По-видимому, не следует ожидать высокой селективности сигнала, поскольку многие препараты окисляются при достаточно близких потенциалах, а изменение электрохимических характеристик ДНК плохо воспроизводится и зачастую допускает лишь качественное описание.

В заключение рассмотрим определение свинца с помощью аптамера, проявляющего свойства фермента (aptazyme). Для этого используется олигонуклеотидная последовательность, проявляющая в присутствии ионов свинца нуклеазную функцию – способность катализировать гидролиз фосфодиэфирной связи рибонуклеотидной вставки. С одного конца аптамер модифицирован тиольной группой для иммобилизации на золотом электроде, а с другого – метиленовым синим. В исходном состоянии он представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий циклический свинец-связывающий участок из восьми нуклеотидных оснований, и имеющий достаточно жесткую структуру, так что метиленовый синий, находящийся на противоположном к электроду конце, не может участвовать в переносе электрона. Включение иона свинца в циклическую полость активирует нуклеазную функ-



цию, при этом слабая связь в месте включения аденин-рибозного фрагмента рвется с образованием двух отдельных фрагментов и на электроде остается одноцепочечный фрагмент, достаточно подвижный для сближения с электродом. В результате удастся зафиксировать пик окисления метиленового синего. Предел обнаружения ионов свинца – 10 мкмоль/л. Определению не мешают 100- и 1000-кратные количества ионов других переходных металлов. Аналогичные ДНК-сенсоры с электрохимическим и флуоресцентным окончанием предложены для определения ионов кальция и сериновой протеазы – тромбина.

Безусловно, рассмотренные примеры могут показаться «стрельбой из пушки по воробьям», поскольку для определения простых соединений, для которых имеется масса обычных методов, используются довольно сложные приемы геномики. Главное, на что следует обратить внимание, – это универсальность разработанных способов генерирования аналитического сигнала и его детектирования. Селективность определений достигается путем конструирования соответствующих аптамеров, под которыми понимают не только необходимую нуклеотидную последовательность, но и их пространственную ориентацию, достигаемую комбинацией ковалентных и нековалентных взаимодействий.

### **3.3.3. ДНК-повреждающие факторы и действие антиоксидантов**

Несмотря на противоположный характер действия, ДНК-повреждающие факторы и действие антиоксидантов целесообразно рассмотреть совместно, поскольку определение последних с помощью ДНК-сенсоров основано на разрушении ДНК в присутствии сильных окислителей. Неблагоприятное действие химических и физических факторов на ДНК обычно сводится к изменению пространственной структуры вследствие нарушения комплементарности связывания нуклеотидных пар (термическая денатурация, действие сильных кислот и щелочей и др.), изменению структуры нуклеотидов (окисление, метилирование, депуринизация и т. п.), а также разрыву фосфодиэфирных связей и уменьшению средней молекулярной массы. Поскольку речь идет о процессах *in vitro*, репарация ДНК не может повлиять на результаты эксперимента, что облегчает трактовку наблюдаемых изменений сигнала биосенсора по сравнению с аналогичными исследованиями с живыми клетками. По той же причине низкий «реализм» полученных данных при их применении в живых системах требует сопоставления результатов измерений с принятыми тестами генотоксичности. В ряде случаев такая работа уже проводится, что позволяет надеяться на прикладное использование соответствующих ДНК-сенсоров.

Предложено несколько способов оценки повреждающего действия простых соединений и сложных многокомпонентных объек-

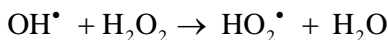
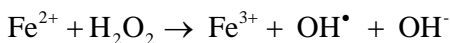
тов, оказываемого ими на ДНК в составе сенсоров. Наиболее изучены сигналы окисления отдельных нуклеотидов (гуанина, режа аденина), а также 8-оксогуанина. Исследования с антрациклинами показали, что образование 8-оксогуанина связано не только с генерированием анион-радикала кислорода, но и с взаимодействиями в аддукте ДНК-антрациклин. Интеркалирование увеличивает внутренний объем спирали ДНК, что является причиной изменения электрохимической активности отдельных нуклеотидов. Это приводит к тому, что сигнал сенсора изменяется разнонаправлено в зависимости от природы токсиканта, его активности, времени воздействия и способа включения ДНК в состав биосенсора.

Так, при изучении токсического действия ряда соединений в концентрациях 0,05–50 мг/л (заведомо превышающих ПДК) было установлено уменьшение величины пика окисления гуанина одно- и двухцепочечных ДНК, электростатически адсорбированных на печатном графитовом электроде. Наибольшее снижение сигнала зафиксировано в присутствии таких интеркаляторов, как 1,2-диаминоантрахинон, 2-антрамин, 2-нафтиламин, акридиновый оранжевый, 2-аминоантрацен. Дауномицин, цисплатин, полихлорированные бифенилы повышают величину сигнала гуанина на 30–40 %. Многие токсиканты, такие как афлатоксин, бисфенол А, нонилфенол и гидразин, на сигнал ДНК-сенсора влияют незначительно. Сопоставление результатов тестирования модельных и реальных объектов (например, природных и сточных вод) с помощью ДНК-сенсоров и других тестов генотоксичности показало наличие корреляции с тестами, представляющими собой вариации теста Эймса с штаммами бактерий, содержащими ген люциферазы (Tox-Alert™ и др.). Такие бактерии проявляют способность к биолюминесценции в случае мутаций, активирующих синтез необходимого фермента. Генотоксичные вещества увеличивают частоту обратных мутаций и, следовательно, уровень свечения культуры клеток. Результаты тестирования образцов сточных вод из промышленных регионов Италии и Испании с помощью Tox-Alert™ и ДНК-сенсора на основе печатного графитового электрода и нативной ДНК показали, что изменение показателя биолюминесценции в процентном выражении в 1,5–2 раза выше, чем ДНК-сенсора, и закономерно снижается при очистке сточных вод.

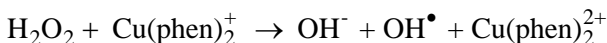
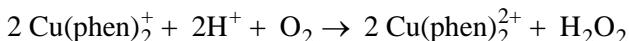
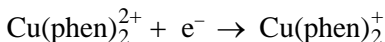
Аналогичный подход использован при тестировании органических загрязнителей почв. Модельными токсикантами служили аминопроизводные антрацена, нафталина, хлорированные анилины и ряд ароматических сульфокислот. В их присутствии наблюдается уменьшение пика окисления гуанина нативной ДНК, иммобилизованной в условиях электростатической адсорбции на печатном графитовом электроде. Для сопоставления токсичности модельных соединений по результатам эксперимента рассчитывали значения ЕС<sub>50</sub>, отвечающие концентрации токсиканта, при которой величина

сигнала составляет 50 % от максимального значения. Для большинства соединений величина  $EC_{50}$  находилась в микро- и субмикромольном диапазоне концентраций. Полученные значения  $EC_{50}$  в целом соответствуют классу опасности токсиканта.

Второй по распространенности способ установления повреждения ДНК – электрохимический контроль генерирования активных реагентов, расходующихся в реакции с ДНК. Классический пример – реакция Фентона, в ходе которой в присутствии пероксида водорода и ионов  $Fe^{2+}$  образуются гидроксидные и супероксидные радикалы. Поскольку реакция протекает в щелочной среде, ионы металла включают в комплексы с ЭДТА для повышения их гидролитической устойчивости, а для регенерации катализатора применяют либо катодную реакцию, либо химические восстановители, например аскорбиновую кислоту:



Аналогично образуются активные формы кислорода с участием комплексов ионов других переходных металлов, проявляющих интеркалирующее действие. Например, в присутствии бис-фенантролинового комплекса  $Cu^{2+}$  происходит окислительное расщепление ДНК, протекающее при  $-0,5$  В в присутствии растворенного кислорода:



Генерирование гидроксидных радикалов и других активных форм кислорода может осуществляться и с помощью других комплексов  $Cu^{2+}$ , например дипиридных или с тетраазамакроциклическими лигандами, а также соединений  $Mn^{2+}$ , дипиридных комплексов  $Ru^{2+}$ , фенантролиновых комплексов  $Co^{3+}$ . Эффективность генерирования активных форм кислорода контролируют по сигналам комплексов переходных металлов. Так, в случае  $Cu^{2+}$  обычно наблюдается снижение регистрируемых токов, что связано с интеркалированием фенантролиновых и дипиридных лигандов и влиянием этого процесса на доступность иона металла для окисления на электроде. Напротив, для комплексов  $Ru^{2+}$  и  $Co^{3+}$  наблюдается рост сигналов окисления восстановленной формы, поскольку соответствующие ионы сохраняют электрохимическую

активность и в интеркалированной форме. Такое поведение, несомненно, более удобно для измерения сигнала, связанного с повреждением ДНК, и его интерпретации.

Повреждения ДНК могут происходить и в восстановительной среде – при катодном восстановлении кислорода в присутствии аскорбиновой кислоты и других восстановителей. Это относится и к некоторым антиоксидантам, которые поначалу рассматривались исключительно как противораковые профилактические средства. В частности, участие галлата и кверцетина в мутагенезе получило экспериментальное подтверждение. Взаимодействие кверцетина и ДНК было изучено электрохимически по пикам окисления компонентов, находящихся в растворе, на стеклоуглеродном электроде. Медленное взаимодействие ДНК и кверцетина ускоряется в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . По-видимому, происходит интеркалирование комплекса в ДНК с последующим окислительным расщеплением спирали на фрагменты. С помощью спектроскопических исследований показано, что в ходе реакции образуется супероксидный анион, разрушающий спираль ДНК. Это приводит к большей доступности гуанина и аденина для окисления, при этом пики на вольтамперограммах возрастают во времени. Пик окисления 8-оксогуанина – индикатора окислительного стресса – также возрастает по величине. Если вольтамперометрические эксперименты проводить в бескислородной среде, то повреждение ДНК не наблюдается.

Помимо активных форм кислорода окислительное повреждение ДНК вызывают и другие промежуточные продукты электрохимических реакций, например нитрозосоединения, гидроксилamines и продукты их азосочетания, образующиеся при частичном восстановлении нитроимидазолов и нитрофенолов. Тиофен-S-оксид при катодном восстановлении в присутствии нативной ДНК образует в растворе аддукт, в котором сохраняет свою электрохимическую активность и в то же время провоцирует разрыв цепочек ДНК.

Электрохимические ДНК-сенсоры позволяют зарегистрировать также повреждения ДНК, обусловленные физическими воздействиями. Так, термическая денатурация ДНК в результате действия электрического тока изменяет эффективность воздействия окислителей, генерируемых в системе  $\text{Cu}^{2+}$  – аскорбиновая кислота – растворенный кислород. В качестве маркера служит фенантролиновый комплекс  $\text{Cu}^{2+}$ , сигнал которого закономерно увеличивается с ростом продолжительности термического воздействия на электрод.

Установление повреждения ДНК электрохимическими методами достаточно чувствительно для того, чтобы определить присутствие веществ, уменьшающих воздействие токсикантов. Это относится прежде всего к антиоксидантам, выступающим в качестве ловушек радикалов. Флавоноиды, другие полифенолы, неко-

торые витамины эффективно подавляют генерацию активных форм кислорода. Как правило, количественное определение антиоксидантов протекает в две стадии: генерирование активных форм кислорода и оценка защитного действия определяемого соединения по относительному изменению тока маркера или нуклеотидов. Так, реактив Фентона используется для оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов из *Peumus boldus*, *Baccharis genstelloides*, *Cymbopogon citrates*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* и *Camellia sinensis* с помощью печатного графитового электрода с нативной ДНК, электростатически адсорбированной на электродной поверхности. Сигналом служит ток окисления гуанина, регистрируемый методом квадратноволновой вольтамперометрии. В качестве стандартного используется фотометрический метод измерения скорости захвата стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила. Добавление реактива Фентона вызывает снижение пика окисления гуанина. В присутствии растительных экстрактов действие окислителей частично нивелируется. По результатам тестирования с помощью ДНК-сенсора установлено, что антиоксидантное действие экстрактов снижается в ряду: *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*.

Аналогичный электрод с маркером – фенантролиновым комплексом  $\text{Co}^{3+}$  – используется для оценки антиоксидантной активности полисахаридов дрожжей, а также ряда природных флаваноидов (рутин, кверцетин, эпигаллокатехин, галлат, катехин). В качестве модельного объекта в составе биосенсора используется термически денатурированная ДНК, более чувствительная к действию окислителей.

Помимо переходных металлов для регистрации антиоксидантного действия могут использоваться электрохимически активные интеркаляторы, эффективность связывания которых с ДНК изменяется вследствие окислительного действия активных форм кислорода. Примером может служить определение глутатиона и галловой кислоты по току восстановления маркера – метиленового синего. ДНК-сенсор представляет собой оптически прозрачный ИТО-электрод. При его облучении ультрафиолетовым светом инициируются фотохимические реакции образования пероксидных радикалов из воды и растворенного кислорода. Метиленовый синий в составе поверхностного комплекса с ДНК проявляет низкую электрохимическую активность, которая увеличивается при УФ-облучении. Метод позволяет определять миллимолярные концентрации антиоксидантов и оценивать эффективность их защитного действия.

В качестве маркеров в ДНК-сенсорах при определении антиоксидантов могут использоваться также гетерогенные медиаторы электронного переноса, например ферроцен, ковалентно связанный

с терминальным концом ДНК-зонда. Повреждение олигонуклеотида, комплементарного зонду, активными формами кислорода, генерированными с помощью реактива Фентона, приводит к нарушениям комплементарного связывания и как следствие – к снижению сигнала ферроцена, регистрируемого с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Тиомочевина, изопропанол и бензоат уменьшают повреждение ДНК, правда, в достаточно больших количествах (10 ммоль/л).

### 3.4. ИММУНОСЕНСОРЫ

Как уже отмечалось выше, иммунные взаимодействия включают образование комплекса между защитным белком – иммуноглобулином (антителом) и чужеродным биологически активным субстратом (антигеном). Как правило, антиген – это высокомолекулярный биополимер или субклеточный компонент, но антигенной активностью обладают и некоторые низкомолекулярные соединения (гаптены), которые в организме предварительно образуют комплексы (конъюгаты) с белками или иными высокомолекулярными носителями. Иммуноанализ направлен на определение либо самого антигена, либо специфических к нему антител, которые выступают в качестве биологических маркеров присутствия антигенов в организме. Традиционный иммуноанализ стал рутинным инструментом современной клинической практики, а рынок иммунотестов, содержащих подготовленные иммунореагенты и проявляющие вещества – хромогены или флуорогены, относится к числу наиболее стабильных и быстрорастущих среди средств медицинской диагностики. Реализация сенсорного варианта, т. е. совмещение иммунной реакции и генерации сигнала на поверхности трансдьюсера, предполагает объективизацию результатов измерений, т. е. исключение ошибок, связанных с необходимостью дозирования реагентов и их переносом на твердый субстрат (большинство методов иммуноанализа относится к твердофазным), и повышение точности аппаратурной регистрации. Поскольку равновесие в системе антиген – антитело смещено в сторону образующегося комплекса (константа связывания  $10^6$ – $10^{12}$  л·моль<sup>-1</sup>), большинство разработанных иммунотестов являются одноразовыми. Это не смущает потенциальных потребителей, так как применение одноразовых устройств позволяет избежать влияния чужеродных материалов и связанных с этим диагностических ошибок. Хотя имеются достаточно проработанные методы регенерации иммуносенсоров, в том числе при измерениях в потоке, они ориентированы преимущественно на одноразовое применение. В последнее время в качестве платформы все чаще используются наиболее дешевые и миниатюрные преобразователи сигнала – печатные графитовые электроды, микроэлектронные устройства и др. Вероятно, именно одноразовые иммуносенсо-

ры в перспективе могут рассчитывать на коммерциализацию, хотя по производительности и себестоимости они пока проигрывают традиционным вариантам иммуноферментного анализа на луночных полистирольных планшетах с фотометрической (флуоресцентной) регистрацией сигнала. Разработаны многоканальные анализаторы, в которых планарные печатные электроды размещены на дне лунок иммунохимического планшета стандартной геометрии. Это позволяет использовать стандартное иммунохимическое оборудование для отмывки пробы, добавления реагентов с помощью многоканальных дозаторов и т. д.

Взаимодействие антигена Ag и антитела Ab характеризуется константой равновесия

$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}.$$

Для задач иммуноанализа подходят антитела, обеспечивающие значение  $K$  не менее  $10^8$  л·моль<sup>-1</sup>. Несмотря на то что гетерогенные условия должны влиять на характеристики связывания антиген – антитело, применение подходов гомогенного иммуноанализа в иммуносенсорах в целом дает удовлетворительные результаты и может быть использовано для предварительного скрининга иммунореагентов.

Классификация иммуносенсоров по способу измерения сигнала в целом аналогична классификации методов иммуноанализа.

Большинство из них предполагает введение в один из реагентов – антиген или антитело – метки, сигнал которой регистрируется электрохимически. Введение метки осуществляют стандартными способами, разработанными для ковалентной модификации белков, – использование глутарового альдегида, карбодиимидов, сукцинимиды, которые образуют ковалентные сшивки между амино-, карбокси- и тиольными группами белка и метки. Те же реакции могут применяться для ковалентной пришивки иммунореагентов к носителю (электроду). В том случае, когда в качестве метки выступает фермент, продукт сшивки часто называют конъюгатом. Аналогичным образом получают конъюгаты гаптенных и белковых, необходимые для иммобилизации на электроде и последующего определения гаптенных в конкурентных методах анализа. В качестве носителей гаптенных обычно применяют альбумин различного происхождения или соевый ингибитор трипсина. Введение метки является важной стадией создания иммуносенсора, поскольку от нее зависит чувствительность регистрации сигнала связывания антигена и антитела. Выбор способа сшивки определяет сигнал метки и стерическую доступность центров связывания антигена или антитела для второго компонента реакции после включения их в состав иммуносенсора.

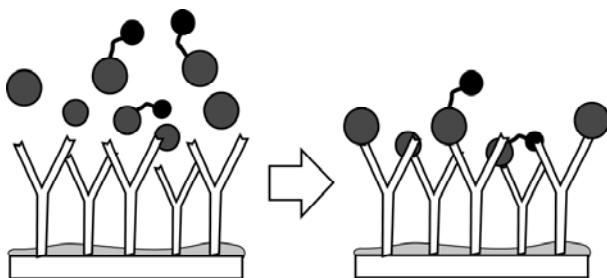
**Таблица 3.6. Ферменты, применяемые в амперометрических иммуносенсорах, и условия измерения сигнала**

Фермент	Субстрат	Условия измерения сигнала	Лит-ра*
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	Глюкозо-6-фосфат, NAD <sup>+</sup>	Платинированный графит, +150 мВ	[1]
Каталаза	Пероксид водорода	Pt, –600 мВ	[2]
Пероксидаза	Гидрохинон, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Печатный платиновый электрод, –600 мВ	[3]
	Тетраметилбензидин	Стеклоуглерод, +100 мВ	[4]
	Иодид, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	УПЭ, +127 мВ	[5]
	Метиленовый синий	Печатный графитовый электрод	[6]
Щелочная фосфатаза	Глюкозо-6-фосфат	Глюкозный ферментный сенсор	[7]
	Фенилфосфат	Pt, +870 мВ	[8,9]
	<i>n</i> -Аминофенилфосфат	Печатный графитовый электрод, +300 мВ	[10]
	Индоксилфосфат	Печатный графитовый электрод, –150 мВ	[11]
Глюкозооксидаза	Глюкоза	По сигналу ферроцена, стеклоуглерод, +190 мВ	[12]
$\beta$ -Галактозидаза	<i>n</i> -Аминофенил- $\beta$ -галактозид	Лакказный ферментный сенсор	[13]
Лакказа	Кислород	Pt-электрод, 0,0 В	[14]

\* [1] *Athley D., McNeil C. J., Bailey W. R. et al. // Biosens. Bioelectron. 1993. Vol. 8. P. 415.* [2] *Aizawa M., Morioka A., Suzuki S. // Anal. Chim. Acta. 1980. Vol. 115. P. 61.* [3] *Romero J. M. F., Stiene M., Kast R. et al. // Biosens. Bioelectron. 1998. Vol. 13. P. 1107.* [4] *Volpe G., Compagnone D., Draisci R., Palleschi G. // Analyst. 1998. Vol. 123. P. 1303.* [5] *Abdel-Hamid I., Ghindilis A. L., Atanasov P., Wilkins E. // Anal. Lett. 1999. Vol. 32. P. 1081.* [6] *Evtugyn G. A., Eremin S. A., Shaljamova R. P. et al. // Biosens. Bioelectron. 2006. Vol. 22. P. 56.* [7] *Kim E. J., Yanagita Y., Haruyama T. et al. // Sensors Actuators B. 2001. Vol. 79. P. 87.* [8] *Wehmeyer K. R., Halsall H. B., Heineman W. R. et al. // Anal. Chem. 1986. Vol. 58. P. 135.* [9] *Jenkins S. H., Halsall H. B., Heinemann W. R. // Anal. Biochem. 1988. Vol. 168. P. 292.* [10] *O'Regan T. M., Pravda M., O'Sullivan C. K., Guibault G. G. // Talanta. 2002. Vol. 57. P. 501.* [11] *Fanjul-Bolado P., González-García M. B., Costa-García A. // Ibid. 2004. Vol. 64. P. 452.* [12] *Robinson G. A., Cole V. M., Forrest G. C. // Biosensors. 1987/1988. Vol. 3. P. 147.* [13] *Bier F. F., Ehrentreich-Förster E., Bauer Ch. G., Scheller F. W. // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. Vol. 354. P. 861.* [14] *Ghidilis A. L., Skorobogat'ko O. V., Yaropolov A. I. // Biomed. Sci. 1991. Vol. 2. P. 520.*

При создании иммуносенсоров чаще всего используются конъюгаты, разработанные для традиционных вариантов иммуноанализа или для иммунизации животных (получение антител различной специфичности). Многие коммерчески доступные конъюгаты в качестве метки содержат пероксидазу, активность которой





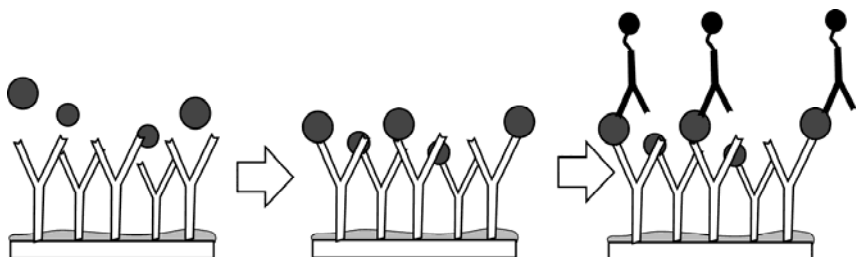
**Рис. 3.21.** Схема конкурентного иммуноанализа

определяют с помощью электрохимически активных субстратов – тетраметилбензидина, *o*-дианизидина, гидрохинона, иодида. Для определения активности пероксидазы в составе иммуносенсоров используются также производные ферроцена и электропроводящие матрицы. Вторым по распространенности ферментом-меткой является щелочная фосфатаза. Примеры ферментов и субстратов, применяемых в составе амперометрических иммуносенсоров, приведены в табл. 3.6.

В зависимости от способа взаимодействия иммунореагентов различают конкурентные и неконкурентные иммуносенсоры. В конкурентном варианте используется меченный аналог определяемого вещества, который добавляют в пробу. В результате инкубирования иммуносенсора и последующей отмывки соотношение меченого и немеченого иммунокомплексов на его поверхности соответствует соотношению концентраций определяемого вещества и его аналога, содержащего метку, в растворе. Общая схема конкурентного иммуноанализа приведена на рис. 3.21.

Чем выше сигнал метки, тем меньше концентрация определяемого вещества в пробе. Для подавления неспецифической сорбции меченных частиц на преобразователе сигнала иммуносенсор обрабатывают инертным белком, например альбумином, заполняющим потенциальные центры связывания. Применение самоорганизующихся монослоев и пленок Ленгмюра–Блодже как носителей антител (антигенов) в значительной степени решает проблему неспецифической сорбции вследствие полного заполнения поверхности электрода гидрофобными соединениями. Конкурентный анализ позволяет определять до  $10^7$  молекул/мл пробы (аффинность должна быть не хуже  $K = 10^{12}$  л·моль<sup>-1</sup>).

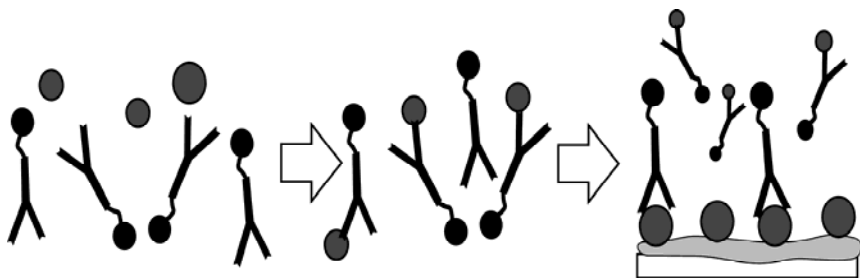
Среди неконкурентных вариантов иммуноанализа наиболее распространен сэндвичевый анализ (рис. 3.22). В этом случае после образования комплекса антиген-антитело иммуносенсор обрабатывают вторым видом антител, называемых видоспецифичными. Они могут связываться с антигенами в составе иммунных комплексов,



**Рис. 3.22.** Схема сандвичевого иммуноанализа

но не со свободными антителами, иммобилизованными на поверхности сенсора. Последние содержат ковалентно связанную метку, сигнал которой регистрируется. В отличие от конкурентного иммуноанализа сандвичевый вариант характеризуется симбатной зависимостью отклика от концентрации определяемого вещества: чем больше молекул антигена в пробе, тем выше концентрация видоспецифичных антител, несущих метку, на электроде. Благодаря этому минимально определяемые концентрации антигена оказываются примерно в 10–15 раз ниже, чем в условиях конкурентного иммуноанализа. К недостаткам сандвичевого иммуноанализа относят его длительность и многостадийность. Необходимость в стадиях отмывки и инкубирования практически нивелирует преимущества иммуносенсоров – простоту и удобство использования. Как и в условиях конкурентного иммуноанализа большое значение имеет неспецифическая сорбция белков на поверхности электрода. Особенно это касается меченых антител, адсорбция которых определяет предел обнаружения, достигаемый с помощью данного варианта иммуноанализа.

Следует отметить, что при определении гаптенів возникают сложности, связанные с небольшими размерами молекул определяемых соединений. Их ковалентная модификация может в заметной степени исказить аффинность связывания, принимаемую а priori одинаковой для меченого и немеченого иммунореагентов. Кроме того, в этом случае образование иммунного комплекса незначительно изменяет характеристики иммуноглобулина, что затрудняет детектирование процесса. Для устранения указанных ограничений разработаны специальные схемы, примером которых является гомогенно-гетерогенный метод, называемый также непрямым конкурентным иммуноанализом (рис. 3.23). В нем на поверхности электрода иммобилизуют конъюгат гаптена с белком. Анализируемую пробу, предположительно содержащую гаптен, смешивают с мечеными антителами к гаптenu. Они реагируют с определяемым веществом, образуя устойчивый комплекс. Конъюгат гаптена на поверхности иммуносенсора реагирует с избытком

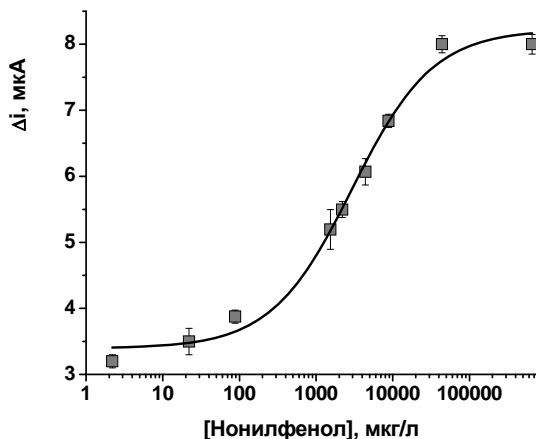


**Рис. 3.23.** Схема непрямого конкурентного иммуноанализа

меченых антител, но не с комплексом гаптен-антитело, остающим-ся в растворе. После отмытки определяют концентрацию метки, которая изменяется антибатно концентрации гаптена в пробе. По чувствительности этот метод приближается к классическому конкурентному иммуноанализу, но требует достаточно строгого подбора концентраций конъюгатов, поскольку определяемый избыток меченых антител должен полностью реагировать с конъюгатом гаптена на поверхности иммуносенсора. Кроме того, аналитические характеристики определения гаптен-антител с помощью непрямого конкурентного иммуноанализа очень чувствительны к природе конъюгатов – строению и длине линкеров, способу иммобилизации, природе белка и связывающего агента. Эти факторы определяют стерическую доступность центров связывания при взаимодействиях в растворе и на поверхности сенсора.

Во всех рассмотренных вариантах градуировочный график определения антигена (гаптена) имеет сигмоидный вид и описывается логистической четырехпараметрической функцией. В качестве примера на рис. 3.24 приведен градуировочный график определения нонилфенола с помощью иммуносенсора, содержащего в качестве индикаторного фермента пероксидазу (субстрат – метиленовый синий, сигналом служит изменение тока восстановления окисленной формы субстрата после инкубирования сенсора в растворе гаптена).

Представленные варианты функционирования иммуносенсоров в целом подобны традиционному твердофазному иммуноанализу, поэтому основные этапы их создания связаны с оптимизацией состава конъюгатов антител и способов иммобилизации иммунореагентов на поверхности преобразователя сигнала, играющего роль планшетного носителя ELISA. Некоторые особенности вносит природа электрода, которая определяет схемы ковалентной сшивки, не применяемые на полистирольных планшетах. Речь идет об использовании тиолированных производных при иммобилизации на золоте, а также о мягких способах включения реагентов в самоорганизующиеся слои. В последнее время для иммобилизации ис-



**Рис. 3.24.** Градуировочный график определения нонилфенола с помощью иммуносенсора с пероксидазной индикаторной реакцией

пользуются не только антитела, но и их составные части (мономерные единицы), которые получают путем направленного разрыва дисульфидных связей. Мономерные единицы антител сохраняют высокое сродство к антигену, а при иммобилизации на золотых электродах обеспечивают более регулярное строение поверхностного слоя, особенно при сравнении с белковыми матрицами, когда положение антител в слое полностью рандомизировано и лишь часть из них взаимодействует с антигенами.

Помимо природных антител в современной иммунологии используются их фрагменты, содержащие части тяжелых и легких цепочек. Их получают методами генной инженерии. Такие фрагменты легче модифицировать, а также вносить точечные изменения в аминокислотные последовательности, что позволяет направленно изменять аффинность связывания определяемых соединений. Следует заметить, что пока белковые аналоги природных антител в составе иммуносенсоров используются редко, но они представляют собой существенный ресурс для повышения селективности, а иногда и чувствительности определения соединений близкого строения.

Сравнивая возможности электрохимических иммуносенсоров и традиционных планшетных вариантов ELISA с флуоресцентной (хемилюминесцентной) индикацией сигнала метки, отметим следующее. Амперометрическая индикация сигнала в целом проигрывает по чувствительности флуоресцентным способам детектирования, например, при определении активности щелочной фосфатазы, более чем на порядок величины концентрации фермента. Вместе с

тем, электрохимические варианты позволяют более надежно исключить неспецифическую адсорбцию меченых реагентов, что компенсирует различия в чувствительности определений вблизи нижней границы определяемых содержаний. Электрохимические иммуносенсоры просты по конструкции, не требуют дорогих реагентов и могут быть реализованы в виде одноразовых дешевых устройств, совместимых со стандартным измерительным оборудованием. Такие сенсоры имеют преимущество там, где число проб относительно невелико, например при определении загрязнителей окружающей среды в полевых условиях. Примеры реализации стандартных схем иммуноанализа приведены в табл. 3.7.

Число соединений, которые определяют с помощью амперометрического иммуноанализа превышает сотню, включая варианты с иммуноконцентрированием и последующим определением после разрушения иммунокомплексов. Помимо рассмотренных примеров, разработаны оригинальные способы реализации иммунных взаимодействий, не имеющие прямых аналогов в твердофазном варианте. Остановимся на некоторых из них более подробно. В общем, можно выделить следующие варианты генерирования сигналов иммуносенсоров, основанные на особенностях массопереноса и сочетании нескольких индикаторных реакций в пределах поверхностного биочувствительного слоя:

- исключение субстрата;
- обеспечение электрического контакта между электродом и индикаторным ферментом;
- использование приемов усиления сигнала, связанных с электродными реакциями;
- усиление сигнала с помощью магнитного сепарирования и образования (разрушения) липосом.

По первому варианту на поверхности электрода совместно иммобилизуют иммунореагент (антитело или антиген) и индикаторный фермент. Образование комплекса антиген-антитело блокирует стерически фермент и снижает скорость ферментативного превращения субстрата, которую контролируют электрохимически. Примером может служить определение антител к ДНК, образующихся при аутоиммунных заболеваниях. В качестве индикаторных ферментов применяют холинэстеразу или пероксидазу, которые иммобилизуют совместно с антигенами в полимерной матрице из нитрата целлюлозы или альбумина с помощью глutarового альдегида. При инкубировании сенсора в разбавленной сыворотке крови больного в состав поверхностного слоя входят объемные молекулы иммуноглобулинов, которые снижают сигнал субстратов – эфиров тиохолина для холинэстеразы или гидрохинона для пероксидазы, что формально соответствует варианту конкурентного ингибирования. Результаты определений хорошо согласуются с данными,

**Таблица 3.7. Примеры реализации в амперометрических иммуносенсорах традиционных вариантов ферментного иммуноанализа**

Фермент	Определяемое соединение	Преобразователь сигнала	Вариант иммуноанализа	Лит-ра*
Щелочная фосфатаза	Цитокин	Печатный графитовый электрод (ПГЭ)	Конкурентный	[1]
Щелочная фосфатаза	Афлатоксин В1	ПГЭ	Конкурентный	[2]
Щелочная фосфатаза	Эстрадиол Е2	ПГЭ	Конкурентный	[3]
Щелочная фосфатаза	Белок, связывающий жирные кислоты	ПГЭ	Сандвичевый	[4]
Глюкозооксидаза	Иммуноглобулин G человека	Пероксидазный сенсор на основе Рт-электрода	Сандвичевый	[5]
Глюкозооксидаза	Иммуноглобулин G кролика	ПГЭ	Конкурентный	[6]
Глюкозооксидаза	Хлорсульфурон	Пероксидазный сенсор (ПГЭ)	Конкурентный	[7]
Глюкозооксидаза	$\alpha$ -Фетопротейн	ПГЭ (платинированный графит)	Сандвичевый	[8]
Пероксидаза	Компонент С3 комплемента	Эпоксиграфитовый электрод	Конкурентный	[9]
Пероксидаза	Амфетамины	ПГЭ	Сандвичевый	[10]
Пероксидаза	Вирус табачной мозаики	Ртутный электрод	Сандвичевый	[11]
Пероксидаза	Азинфос-метил	Стеклоуглерод	Конкурентный	[12]

\* [1] Crowley E., O'Sullivan C., Guilbault G. G. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 389. P. 171. [2] Ammida N. H. S., Micheli L., Palleschi G. // Ibid. 2004. Vol. 520. P. 1592. [3] Pemberton R. M., Mottram T. T., Hart J. P. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2005. Vol. 63. P. 201. [4] O'Regan T. M., Pravda M., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G. // Talanta. 2002. Vol. 57. P. 5013. [5] Campanella L., Attioli R., Colapicchioni C., Tomassetti M. // Sensors Actuators. 1999. Vol. B 55. P. 23. [6] Darain F., Park S., Shim Y.-B. // Biosens. Bioelectron. 2003. Vol. 18. P. 773. [7] Dzantiev B. B., Yazykina E. V., Zherdev A. V. et al. // Sensors Actuators. 2004. Vol. B 98. P. 254. [8] Kim E. J., Yanagita Y., Haruyama T., Kobatake E., Aizawa M. // Ibid. 2001. Vol. B 79. P. 87. [9] Liu G.-D., Yan J.-T., Shen G.-L., Yu R.-Q. // Ibid. Vol. B 80. P. 95. [10] Butler D., Pravda M., Guilbault G. G. // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 556. P. 333. [11] Sun W., Jiao K., Zhang S. // Talanta. 2001. Vol. 55. P. 1211. [12] Ivanov A. N., Evtugyn G. A., Budnikov H. C. et al. // Anal. Lett. 2008. Vol. 41. P. 392.

полученными с помощью стандартного сандвичевого иммуноанализа с применением конъюгатов антител с пероксидазой (спектрофотометрическое определение продукта пероксидазного окисления 4-аминоантипирина). В отличие от последнего, указанный метод не требует синтеза, выделения и очистки конъюгатов антител с ферментами, что снижает себестоимость анализа.

Иммобилизация иммунореагентов и холинэстеразы в нитроцеллюлозной мембране позволяет получить амперометрический отклик на ряд бактериальных антигенов (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), а также аллерген-специфичные антитела. В отличие от определения антител к ДНК в данном случае можно зарегистрировать не только снижение активности фермента. В некоторых случаях активность холинэстеразы возрастает, по-видимому, за счет ее аллостерической активации. Чувствительность определений можно повысить, если использовать амальгамированный серебряный электрод, индикаторный к тioxолину – продукту холинэстеразного гидролиза субстрата.

Аналогичный по сути принцип реализован в иммуносенсоре на основе платинового электрода с бислойным покрытием из наночастиц золота, покрытых продуктом электрополимеризации *o*-фенилендиамина, и берлинской лазури. В слой включают антитела из сыворотки против вируса рубеллы. Образование комплекса с биологической мишенью блокирует перенос электрона с участием берлинской лазури.

Второй вариант – обеспечение электрического контакта между электродом и индикаторным ферментом – предполагает определенную взаимную ориентацию отдельных компонентов поверхностного биочувствительного слоя, выполняющих роль цепи переноса электрона. Метод имеет не вполне переводимое на русский язык название *enzyme channeling immunosensor*. Примером может служить иммуносенсор для определения IgG как модели иммуносенсоров общего назначения. В нем на поверхности электрода в матрице полиэтиленimina иммобилизуют глюкозооксидазу и антитела к иммуноглобулину IgG. Измерение проводят в варианте конкурентного иммуноанализа, добавляя в раствор смесь антител и их конъюгатов с пероксидазой. После инкубирования в раствор добавляют глюкозу и иодид калия. Если на поверхности электрода произошла иммунная реакция и образовался конъюгат с пришитой пероксидазой, последняя включается в ферментативную реакцию окисления глюкозы, при этом продукт реакции – пероксид водорода – участвует в последующем окислении иодида. За скоростью реакции следят по величине тока восстановления образующегося иода. Поскольку концентрация пероксида водорода, образующегося в реакции с участием глюкозооксидазы, мала, его вовлечение во вторую ферментативную реакцию возможно только в случае, когда оба фермента располагаются максимально близко друг к другу, исключая диффузионные потери субстрата. Это позволяет, в частности, проводить определение без промежуточной отмывки несвязанных реагентов. Схему включения второго фермента можно усложнить, добавляя, например, каталазу для разложения пероксида водорода, присутствующего в образце.

Предложена обратная комбинация пероксидазного сенсора и конъюгата глюкозооксидазы. Повышение чувствительности достигается включением глюкозооксидазы в липосомы в сочетании с медиаторами электронного переноса – ферроценом или ферроцен-содержащим конъюгатом. Описан также прямой электронный перенос между конъюгатом пероксидазы и электродом (определение антигена карциномы 125).

Вариантом указанного способа можно считать иммуносенсор на нонилфенол, в котором в качестве индикаторного фермента выступает пероксидаза. Сигналом образования комплекса антиген (нонилфенол) – антитело служит рост величины тока, обусловленного пероксидазным окислением субстратов – метиленового синего или иодид-ионов. Его увеличение происходит за счет включения в биокаталитический цикл нонилфенола, играющего роль конкурентного донора электронов при включении в состав поверхностного иммунокомплекса.

Разработаны способы электрохимического повышения чувствительности сигнала иммуносенсоров. В качестве примера можно привести регенерацию субстрата в процессе пероксидазного окисления и катодной регенерации производных гидрохинона. При использовании производных ферроцена в сочетании с глюкозооксидазной индикаторной реакцией коэффициент усиления на планарных гребенчатых электродах достигает 20. В этих же целях применяют инверсионную вольтамперометрию, позволяющую с высокой чувствительностью регистрировать наночастицы золота или сульфида кадмия (после их растворения), включаемые в качестве метки в состав конъюгатов антител. Эффективность определения наночастиц золота можно повысить, если перед вольтамперометрическим определением их покрыть тонким слоем серебра, например химическим восстановлением солей серебра гидрохиноном. Поскольку чувствительность инверсионно-вольтамперометрического определения серебра во много раз выше, чем золота, это позволяет снизить пределы обнаружения меченых иммунореагентов более чем на порядок по сравнению с определением наночастиц золота до их серебрения.

Оригинальный подход к определению иммунных взаимодействий развит в серии работ, в которых в качестве преобразователя сигнала используется ансамбль микроэлектродов, разделенных между собой тонкими непроводящими промежутками. При поляризации таких электродов на них протекают реакции окисления – восстановления медиатора электронного переноса – гидрохинона. Образование комплексов затрудняет перенос промежуточных продуктов реакции между соседними электродами, а значит, вызывает уменьшение фарадеевского тока. Таким образом удалось достичь высокой чувствительности определений. Так, при использовании 25 пар микродисковых электродов диаметром 2,4 мкм, разделен-



ных барьерами шириной 1,6 мкм, удалось достичь чувствительности определения IgG мыши на уровне 3,5 фмоль.

Другим вариантом амперометрического определения комплексов антиген-антитело является сочетание иммунных реакций с редокс-превращениями электрополимеризованного полипиррола. Если антитела иммобилизовать на поверхности полипиррола, их взаимодействие с антигенами можно зафиксировать по скорости электрохимической релаксации полимера. Для этого применяют кратковременные импульсы потенциала, приводящие к симметричному окислению или восстановлению полипиррола, и регистрируют релаксационный ток, величина которого после взаимодействия иммунных компонентов снижается. Метод нашел применение при определении полихлорированных бифенилов в диапазоне концентраций 0,3–100 нг/мл. Аналогичным образом определяют антитела к ДНК. При этом сверхокисленный полипиррол на поверхности электрода играет роль матрицы, электростатически удерживая отрицательно заряженную ДНК, являющуюся в данном случае антигеном. Предложены иммуносенсоры на основе проводящих полимерных слоев полианилина, политиофена и полипиррола с потенциометрической и импедансометрической индикацией сигнала.

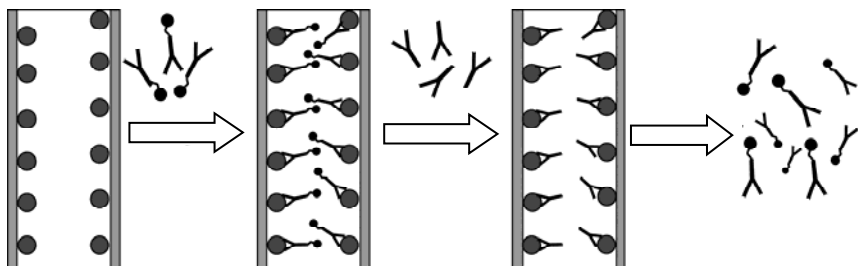
Разработаны способы эффективного усиления сигнала иммуносенсоров с помощью магнитного сепарирования. Для этого используются парамагнитные наночастицы, на поверхности которых иммобилизованы антитела. Реакцию с антигеном и его производным, несущим метку, проводят в растворе. После этого образующиеся комплексы отделяют и концентрируют на электроде или мембранном фильтре с помощью магнита. Использование магнитного разделения не только упрощает процедуру иммуноанализа, но существенно повышает поверхностную концентрацию метки, сигнал которой регистрируют амперометрически. Это связано с тем, что реакции на поверхности наночастиц стерически не ограничены и протекают более эффективно, чем на поверхности электрода, что позволяет получать более высокие удельные концентрации меток, а значит, и более высокие токи. В частности, разработаны способы магнитного сепарирования для определения полихлорированных бифенилов и клеток патогенных микроорганизмов. В последнем случае парамагнитные наночастицы закрепляют непосредственно на поверхности мембраны клетки, увеличивая концентрацию меток и облегчая их последующее закрепление на электроде в магнитном поле.

Предложены амперометрические сенсоры, в которых для усиления сигнала применяются липосомы. Данный способ первоначально использовался для оптической регистрации сигнала – липосомы содержали молекулы органического красителя. При этом разрушение липосом сопровождалось появлением окраски. В амперо-

метрическом варианте липосомы содержали аскорбиновую кислоту, а их оболочка – антитела, взаимодействующие с антигенами. После инкубирования липосомы разрушали, обрабатывая иммуносенсор Тритоном-Х-100 (ПАВ). Сигнал регистрировали по току окисления аскорбиновой кислоты на печатном графитовом электроде. Такой иммуносенсор позволяет определять до 1 мкг/л атразина и тербутилазина при продолжительности анализа 3 мин. Применение липосом позволило совместить на одном носителе стадии разделения пестицидов и их последующего определения. Для этого использовали планарный тонкопленочный электрод, в котором зона формирования липосомальных комплексов отделена от зоны измерения сигнала тонким каналом. Липосомы с включенными иммунореагентами за счет капиллярных и электростатических сил поднимаются в зону измерения сигнала, где разрушаются. Такие сенсоры получили название иммуномиграционных. Для усиления сигнала в липосомы помещают глюкозооксидазу и определяют активность фермента электрохимически (с помощью производного ферроцена как акцептора электронов) или спектрофотометрически.

Достаточно много примеров иммунохимического определения биологически активных соединений, в которых взаимодействие со специфическими антителами способствует их концентрированию. Далее они вовлекаются в ферментативные реакции в качестве эффекторов и субстратов либо непосредственно реагируют на электроде. Иммунохимическое концентрирование можно проводить непосредственно по месту протекания иммунной реакции, например, на фильтре или в поверхностном слое иммуносенсора, либо отдельно, перенося концентрат с носителем в другую среду и проводя измерение сигнала в условиях, отличных от условий концентрирования (иммунохимическое сепарирование). Методы иммуноконцентрирования родственны аффинной хроматографии и особенно часто используются в сочетании с проточно-инжекционным или проточным определением продукта концентрирования. Строго говоря, иммуносенсоры, в которых стадии иммунной реакции и определения продукта разделены в пространстве (использование колонок или фильтров с иммуносорбентами), не считаются иммуносенсорами, но их традиционно рассматривают в биосенсорике.

Схема проточного иммуноанализа выглядит следующим образом (рис. 3.25). Сорбент, обычно коммерческий продукт, разработанный для аффинной хроматографии, модифицируют иммунореагентами. После этого через него пропускают раствор меченых антител (конъюгатов), образующих устойчивые комплексы на поверхности сорбента. Далее через колонку пропускают пробу, содержащую определяемый (немеченый) компонент. В результате замещения компонентов в иммобилизованном иммунокомплексе на выходе из колонки в растворе обнаруживаются меченые антитела в количестве, пропорциональном их содержанию в пробе. Та-



**Рис. 3.25.** Схема проточного заместительного иммуноанализа

кой способ называется также заместительным (displacement) иммуноанализом. Заместительный иммуноанализ проигрывает традиционным вариантам сандвичевого и конкурентного иммуноанализа по чувствительности до двух порядков концентраций определяемых веществ. Результаты определений в значительной степени зависят от соотношения констант связывания меченого и немеченого антител: чем константы связывания ближе между собой по величине, тем выше чувствительность определений.

Вариантом заместительного иммуноанализа является проведение определений в две стадии; сначала проводят накопление определяемых антител (антигенов) в колонке с иммуносорбентом, а затем их вымывают с помощью подходящего реагента (раствор электролита, ПАВ, специально подобранный буферный раствор) и определяют традиционным способом. Методы иммуноконцентрирования удобны, когда необходимо определять низкие концентрации реагентов в отрыве от лабораторной базы. В этом случае для концентрирования могут применяться модифицированные соответствующим образом концентрирующие патроны и сорбционные фильтры, а само определение проводят позднее в специализированной лаборатории. Мы не будем подробно останавливаться на сорбентах для иммуноконцентрирования и способах его проведения, поскольку этот вопрос выходит за рамки содержания книги.

Примеры определения некоторых высоко- и низкомолекулярных соединений в конкретных объектах с помощью амперометрических иммуносенсоров приведены в табл. 3.8. Указанные в ней диапазоны определяемых концентраций имеют оценочный характер и могут изменяться в зависимости от варианта иммуноанализа и объекта контроля.

В некоторых случаях речь может идти о прямом определении веществ без пробоподготовки. Так, при анализе молока или питьевой воды предусматривается разбавление проб буферными растворами, во всех остальных случаях необходима предварительная экстракция с очисткой экстракта и удалением растворителя. Экстракцию можно совмещать с гомогенизацией пробы. Избыток белков

**Таблица 3.8. Примеры применения амперометрических иммуносенсоров в анализе реальных объектов (по обзорам [1–5]\*)**

Определяемое соединение	Характеристики определения	Объект анализа	Определяемое соединение	Характеристики определения	Объект анализа
Афлатоксины	0,01–2 нг/мл	Кукуруза, молоко	Атразин	0,016–1,2 нг/мл	Апельсиновый сок
Домоевая кислота	5–70 нг/мл	Моллюски	Охратоксин А	0,06–2,5 нг/мл	Пшеница
Сульфамиды	1–100 нг/мл	Молоко, сыворотка крови цыплят	Стрептомицин	15–70 нг/г	Молоко, мед, мясо
2,4-Д	10–130 нг/мл	Почвы	Атразин и тербутил-азин	До 1 мкг/л	Почвы
Эритроциты	(3–10)·10 <sup>8</sup> клеток/мл	Цельная кровь	Salmonella	–	Продукты питания
Schistosoma japonicum	1 мкг/мл	Сыворотка крови кролика	Лактатдегидрогеназа	0,3–4 IE/мл	Сыворотка крови
Пенициллин G	До 10 мкг/кг	Молоко	Протеин, связывающий жирные кислоты	4–250 нг/мл	Цельная кровь
Прогестерон	0,5–25 нг/мл	Коровье молоко	Аллерген-специфичные IgE	0,09 нг/мл (C <sub>lim</sub> )	Плазма крови

\* [1] Ricci F., Volpe G., Micheli L., Palleschi G. // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 605. P. 111. [2] Setford S. J. // Trends in AC. 2000. Vol. 19. P. 330. [3] Stefan R.-I., van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y. // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. Vol. 366. P. 659. [4] Lippa P. B., Sokoll L. J., Chan D. W. // Clin. Chim. Acta. 2001. Vol. 314. P. 1. [5] Warsinke A., Benkert A., Scheller F. W. // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. Vol. 366. P. 622.

помимо экстракции удаляют с помощью термической денатурации или ферментативного разложения. Как и для большинства ферментативных методов анализа, удаление органического растворителя считается обязательной стадией, поскольку растворители оказывают денатурирующее действие на ферменты-метки и антитела, снижая чувствительность определений. Однако в ряде случаев зафиксировано повышение чувствительности определений. Так, при анализе почвенных экстрактов, содержащих 2,4-Д, с помощью иммуносенсора в варианте непрямого конкурентного иммуноанализа с пероксидазными конъюгатами установлено увеличение сигнала на 40 % при внесении в буферный раствор 30 об. % метанола. Ак-

тивирующее действие органических растворителей, смешивающихся с водой, связывают с конформационными изменениями комплексов антител и конъюгатов на поверхности сенсора.

Метки, отличные от ферментов, в составе амперометрических иммуносенсоров применяются редко. В частности, разработан амперометрический иммуносенсор на гонадотропин хориона человека, в котором в состав конъюгата включена ферроценмонокарбоновая кислота, а сигналом служит изменение тока медиатора вследствие образования иммунного комплекса. Ферроценальдегид применяется в составе иммуносенсоров для определения IgG. С этой же целью используется аналог ферроцена – ( $\eta^5$ -циклопентадиенил)-трикарбонил марганца. Описаны ДНК-сенсоры для определения аутоиммунных антител к ДНК, в которых в качестве маркеров применяются интеркаляторы – производные  $Pt^{2+}$ , фенотиазиновые красители, сигнал которых в различной степени зависит от присутствия антител, блокирующих процесс интеркалирования. С той же целью используются наночастицы золота или серебра, которые после иммуноконцентрирования определяют по токам их анодного растворения (вариант инверсионной анодной вольтамперометрии). Описаны попытки применения в составе иммуносенсоров углеродных нанотрубок, однако пока они осуществляют лишь функции удобной электропроводящей матрицы, повышающей удельную поверхностную концентрацию антител на поверхности электрода, но в качестве меток не используются.

### 3.5. МИКРОБНЫЕ СЕНСОРЫ

Микроорганизмы как биологический материал, включаемый в состав биосенсоров, имеют ряд преимуществ перед другими биологическими компонентами. В первую очередь это относится к характеристикам ферментных и микробных сенсоров, поскольку микроорганизмы чаще всего используются в качестве источника ферментативной активности. К таким преимуществам относятся:

- исключение дорогостоящих операций выделения и очистки ферментных препаратов;
- повышение устойчивости ферментов в живых клетках по сравнению с изолированными ферментами вследствие сохранения привычного микроокружения и наличия систем репарации, включая биосинтез в процессе жизнедеятельности клеток и их деления;
- одновременное присутствие в клетке кофакторов, необходимых для функционирования фермента, а также систем их регенерации;
- возможность целенаправленного получения требуемых ферментов с использованием генно-инженерных подходов;

- наличие простых и универсальных способов измерения активности ферментов по общим показателям жизнедеятельности клеток – респираторной активности, концентрации основных метаболитов, таких как ионы водорода, углекислый газ и аммиак.

Для включения микроорганизмов в состав биосенсоров в основном применяются нековалентные методы – физическая адсорбция на поверхности носителей и включение в гели. Ковалентная иммобилизация неприемлема, поскольку при этом используются токсичные для живой клетки реагенты. Описаны также методы аффинной иммобилизации с использованием специфических антител, а также наночастиц золота и парамагнитных материалов. В последнем случае иммобилизация является обратимой и обеспечивает эффективное удерживание и обновление по мере надобности поверхностного слоя клеток в постоянном внешнем магнитном поле. Значительная часть публикаций по микробным сенсорам посвящена использованию суспензий микроорганизмов как естественного происхождения (активный ил биологических очистных сооружений, культуры почвенных микроорганизмов), так и монокультур, получаемых в лабораторных условиях (плесневые грибы, некоторые штаммы патогенных микроорганизмов и т. д.).

В амперометрических микробных сенсорах в качестве транзьюсера чаще всего применяется кислородный электрод. Основная сфера использования таких сенсоров – измерение суммарного содержания легкоокисляющихся органических соединений, аналога гидрохимического показателя БПК. Классический скляночный метод позволяет определить этот показатель лишь после 5 или 20 суток инкубирования тестируемых вод и малопригоден для их оперативного контроля. Помимо этого, потребление кислорода может рассматриваться как ответная реакция на микробialное окисление индивидуальных соединений. Недостаток селективности микробных сенсоров может частично компенсироваться применением адаптированных микроорганизмов. Для этого их выращивают на культурах, содержащих в качестве источника органического углерода определяемое соединение. После этого микроорганизмы начинают ускоренно потреблять данное соединение даже в присутствии других, легче окисляющихся органических субстратов. Классическим примером такого подхода является определение фенола с помощью кислородного электрода с иммобилизованными дрожжевыми грибами. Избыток фенола ингибирует перенос электрона, что выражается в снижении скорости потребления кислорода, а первичная адаптация микроорганизмов к низким концентрациям фенола позволяет получить положительный сигнал (увеличение скорости потребления кислорода) при концентрациях фенола на уровне 0,1–1 мг/л.

Разработан селективный микробный сенсор на *n*-нитрофенол с использованием бактерий *Arthrobacter JS 443* и *Moraxella sp.*, выделенных из сообщества почвенных микроорганизмов, отобранных на земельных участках, загрязненных нитрофенолами. Бактерии иммобилизуют на поверхности мембраны из нафiona или включают непосредственно в графитовую пасту.

Аналогичным образом определяют поверхностно-активные вещества с помощью адаптированных штаммов *Acetobacter peroxydans* и уксусную кислоту – с помощью *Fusarium solani*. Разработаны промышленные микробные сенсоры для обнаружения биологической коррозии изделий из металлов. В них применяются штаммы *Acetobacter sp.*, выделенные с пострадавших от коррозии участков металлических конструкций производственных помещений. Некоторые примеры использования микробных сенсоров для определения индивидуальных соединений приведены в табл. 3.9.

Многие вещества определяют с использованием не одного, а нескольких штаммов микроорганизмов. Так, для определения этанола применяют биосенсоры на основе *Tricho-sporon brassicae*, *Acetobacter aceti*, *Candida vini*, *Gluconobacter suboxydans*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Pichia methanolica*. Они отличаются высокой чувствительностью, но низкой селективностью. Ее можно повысить, включив в систему медиаторы электронного переноса. Например, в случае феррицианида можно выделить сигнал этанола в присутствии глюкозы (биосенсор на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в триацетате целлюлозы). Аналогичным образом действуют покровные полимерные мембраны, осуществляющие разделение субстратов по их размеру на этапе переноса к иммобилизованным микроорганизмам. Описано большое число микробных сенсоров для определения фенолсодержащих соединений на основе *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas putida*.

Примером использования в составе биосенсоров генетически модифицированных микроорганизмов может служить определение фосфорорганических соединений – пестицидов и отравляющих веществ нервно-паралитического действия. Первоначально они включали фермент – гидролазу эфиров фосфорной кислоты, выделенную из некоторых микроорганизмов. Однако оказалось, что более высокая стабильность отклика, как и чувствительность определения, достигается при внедрении гена, ответственного за синтез фермента, в клетки бактерий-деструкторов. Получены генетически модифицированные штаммы *Moraxella sp.* и *P. putida* с ферментом, локализованным на внешней липидной мембране клеток. Это позволило сократить время отклика, поскольку определяемым соединениям не нужно переходить внутрь клетки. Сигналом микробного сенсора служит ток окисления *n*-нитрофенола, выделяющегося в

**Таблица 3.9. Примеры применения амперометрических микробных биосенсоров**

Соединение	Микроорганизм	Определяемые содержания	Преобразователь сигнала	Лит-ра*
Танниновая кислота	<i>Aspergillus ustus</i>	0,025–1,025 ммоль/л	Кислородный электрод	[1]
Глюкоза	<i>Aspergillus niger</i>	До 6 ммоль/л	УПЭ	[2]
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,1–4 ммоль/л	Графитовый электрод, модифицированный полипирролом и медиаторами	[3]
Анионные ПАВ	<i>Trichosporon cutaneum</i>	0,1–4,0 мг/л	Кислородный электрод	[4]
Параоксон и его аналоги	<i>Moraxella sp.</i> (с геном синтеза органофосфатгидролазы)	До 40 мкмоль/л параоксона, 170 мкмоль/л метилпаратиона	УПЭ с бактериями в угольной пасте	[5]
		От 0,1 мкмоль/л параоксона	Кислородный электрод	[6]
Молочная кислота	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,03–1 ммоль/л	УПЭ (феназин-метосульфат)	[7]
Кофеин	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,1–1 мг/л	Кислородный электрод с золотым катодом	[8]
Нитрит	<i>Nitrobacter vulgaris</i>	От 10 мкмоль/л	Кислородный электрод	[9]
Этанол	<i>Candida vini</i>	От 0,2 мг/л	Кислородный электрод	[10]
Акриламид	<i>Brevibacterium sp.</i>	0,01–0,1 г/л	Кислородный электрод	[11]
Аспартам	<i>Bacillus subtilis</i>	0,07–0,1 ммоль/л	Кислородный электрод	[12]

\* [1] Zhao Y. B., Wen M. L., Li. S. Q. et al. // Microchem. J. 1998. Vol. 60. P. 201. [2] Katrlík J., Brandsitetter R., Šivorc J. et al. // Anal. Chim. Acta. 1997. Vol. 356. P. 217. [3] Odaci D., Kayahan S. K., Timur S., Toppare L. // Electrochim. Acta. 2008. Vol. 53. P. 4104. [4] Nomura Y., Ikebukuro K., Yokoyama K. et al. // Biosens. Bioelectron. 1998. Vol. 13. P. 1047. [5] Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. Ibid. 2001. Vol. 16. P. 433. [6] Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 568. P. 217. [7] Garjonyte R., Melvydas V., Malinauskas A. // Bioelectrochem. 2006. Vol. 68. P. 191. [8] Sarath Babu V. R., Patra S., Karanth N. G. // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 582. P. 329. [9] Reshetilov A. N., Ilyasov P. V., Knackmuss H. J., Woronin A. M. // Anal. Lett. 2000. Vol. 33. P. 29. [10] Mascini M., Memo-li A., Olana F. // Enzyme Microb. Technol. 1989. Vol. 11. P. 297. [11] Ignatov O. V., Rogatcheva S. M., Kozulin S. V., Khorkina N. A. // Biosens. Bioelectron. 1997. Vol. 12. P. 1. [12] Renneberg R., Riedel K., Scheller F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. Vol. 21. P. 180.



результате гидролиза пестицида метафоса и боевых отравляющих веществ.

Описаны холинэстеразные сенсоры для определения фосфорорганических соединений, в которых в качестве источника ферментативной активности выступают генетически модифицированные дрожжевые грибы *Kluyveromyces lactis*, содержащие ген синтеза данного фермента.

Предложен селективный способ определения ионов меди с помощью биосенсора на основе рекомбинантного штамма *S. cerevisiae*, содержащего плазмиды с  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцируемым промотором гена *lacZ*. В присутствии ионов меди рекомбинантный штамм приобретает способность к окислению лактозы, что вызывает увеличение потребления кислорода. Аналогичная схема предложена для определения иона кадмия по его взаимодействию с промотором в рекомбинантной *E. coli*. И в том и в другом случае микробные сенсоры позволяют определять наномолярные концентрации металлов в течение нескольких минут.

Микробные сенсоры для измерения БПК включают бактерии-деструкторы *Torulopsis candida*, *Trichosporon cutaneum*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis*, *Arxula adeninevorans*, *Serratia marcescens*, *Hansennula anomala*, а также термофильные бактерии и дрожжевые грибки. Поскольку индивидуальные микроорганизмы характеризуются относительно узким спектром органических субстратов, предпочтительнее использовать несколько различных штаммов, а также природные микробиологические сообщества, например, сообщество активного ила биологических очистных сооружений. Измеряемым сигналом служит изменение концентрации растворенного кислорода, регистрируемое после введения субстрата.

Микробные БПК-тестеры отличаются достаточно высокой устойчивостью сигнала (время жизни микробного слоя до двух месяцев) и сравнительно быстрым временем отклика (обычно до 10 мин). Применение микробных реакторов увеличивает время отклика до 30–40 мин, но облегчает замену биологического компонента – суспензии микроорганизмов, помещаемой в колонку или рабочую ячейку биосенсорного устройства. БПК-тестеры калибруют по концентрации легко окисляющихся соединений (глюкоза, крахмал) или по растворенному кислороду. Предложен ряд промышленных разработок, ориентированных на контроль работы биологических очистных сооружений (Toxiguard) или источников питьевого водоснабжения. Примером может служить автоматизированная система, включающая рабочую ячейку объемом 36 мкл с трехэлектродной системой, через которую прокачивается вода. Микроорганизмы *Rhodococcus erythropolis* и *Issatchenkia orientalis* иммобилизуют на поверхности фильтра из триацетата целлюлозы или размещают в проточном реакторе. Ток восстановления кисло-

рода на платиновом микродисковом электроде регистрируют при  $-900$  мВ.

Другое приложение амперометрических микробных биосенсоров – определение соединений, угнетающих развитие микроорганизмов. Предложены биосенсоры для определения цианидов и синильной кислоты по подавлению респираторной активности *Nitrosomonas europaea*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas fluorescens*. Разработана проточная система CellSense с микробными биосенсорами на основе печатных графитовых электродов с иммобилизованными *Escherichia coli*, сигналом которых служит ток восстановления, измеряемый в присутствии медиатора электронного переноса – феррицианида калия. Система прошла апробацию на очистных сооружениях ряда предприятий Барселоны (Испания). Показано соответствие динамики изменения сигнала сенсора (нормализованного значения подавления метаболической активности) и уровня загрязненности вод, оцениваемого с помощью ГЖХ-МС. Получены градуировочные зависимости сигнала от концентраций ряда эталонных токсикантов, таких как хлорароматические соединения, нонилфенол и поверхностно-активные вещества.

Применение микробных биосенсоров для контроля ингибирующего действия объектов сложного и переменного состава, к которым относятся сточные воды, осложняется проблемой интерпретации получаемых данных. Как и в случае ингибиторных ферментных сенсоров, действие отдельных токсикантов на респираторную активность микроорганизмов неаддитивно, что не позволяет корректно распространять данные измерений для модельных растворов (стандартных образцов загрязнителей) на сточные воды в целом. В этой связи наилучшим выходом видится проведение сопоставительных исследований применения микробных биосенсоров и принятых методов биотестирования, в которых мерой содержания токсичных веществ является изменение биологического сигнала. Наиболее часто упоминаются тесты на канцерогенные (мутагенные) свойства веществ – варианты Microtox™ (Toxalert™, Mutatox™ и др.). На сегодняшний день накоплена достаточно большая база данных, позволяющая использовать микробные сенсоры для определения опасных уровней загрязнения тяжелыми металлами и некоторыми органическими соединениями (хлорфенолы, ПАВ, пестициды).

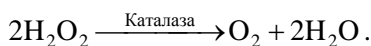
Среди других показателей микробной активности, полученных с помощью биосенсоров, описана оценка нитратредуктазной активности как мера загрязнения почв тяжелыми металлами. Предложены системы для оценки гербицидного действия различных соединений с помощью одноклеточных микроводорослей. Сигналом служит величина фототока, регистрируемого при освещении суспензии микроводорослей в присутствии медиатора электроно-

го переноса – феррицианид-иона или duroхинона. С аналогичной целью применяются биосенсоры с тилакоидными мембранами. Они дают высокочувствительный сигнал на пестициды и другие соединения, блокирующие фотосинтез. Например, при иммобилизации тилакоидных мембран в гидрогели на основе ПВХ тестирование гербицидов атразина, симазина и цианазина свидетельствует о возможности их определения на уровне концентраций от  $1 \cdot 10^{-10}$  до  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

### 3.6. ТКАНЕВЫЕ СЕНСОРЫ

Наряду с микроорганизмами и бактериями для изготовления биосенсоров применяются тканевые материалы растительного и животного происхождения. Как отмечалось выше, биоматериалы создают естественное окружение для ферментов, поэтому сенсоры на их основе, как правило, служат намного дольше, чем ферментные; тканевые материалы достаточно долго сохраняют высокую специфичность, тогда как выделенные ферменты в тех же условиях быстро теряют свою активность.

Исторически тканевые амперометрические биосенсоры появились позже ферментных и микробных сенсоров. Впервые возможность использования фрагмента ткани печени быка, закрепленной на кислородном электроде, была продемонстрирована на примере сенсора для определения пероксида водорода. Печень быка содержит каталазу, которая катализирует реакцию



Для изготовления сенсора использовали срез печени толщиной 0,1 мм, который удерживали на кислородном электроде с помощью нейлоновой сетки. Измерения проводили в 0,05 моль/л фосфатном буферном растворе с pH 6,8. По сравнению с каталазным ферментным электродом указанный сенсор проявляет более высокую активность к пероксиду водорода, менее чувствителен к присутствию мешающих компонентов (глюкоза, спирты, аминокислоты и др.), изменениям pH и температуры, имеет больший срок службы и проще в изготовлении.

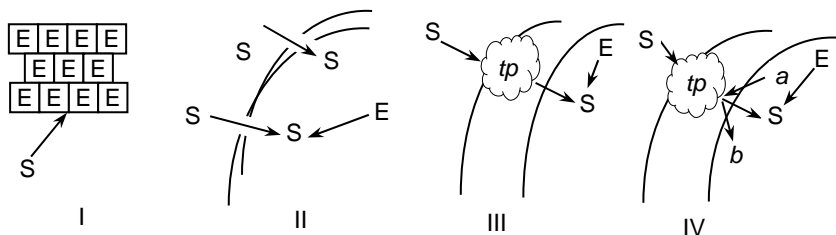
В табл. 3.10 приведены примеры применения амперометрических тканевых биосенсоров для определения различных субстратов. Конструкция первых электродов была основана на использовании электрода Кларка, на поверхности которого закрепляли ткань растительного или животного происхождения, содержащую тот или иной фермент. В последнее время для создания сенсоров все шире применяются модифицированные тканевыми материалами угольно-пастовые электроды, что заметно уменьшает время отклика. Созданы тканевые биосенсоры на основе УПЭ, модифицированных бананом, хреном, свеклой, томатами, огурцами, картофе-

**Таблица 3.10. Примеры применения амперометрических тканевых биосенсоров**

Аналит	Биоматериал	Электрод	Лит-ра*
Аскорбиновая кислота	Огурец	O <sub>2</sub>	[1]
	Цуккини	УПЭ	[2]
Атразин	Картофель	O <sub>2</sub>	[3]
Катехол	Картофель	O <sub>2</sub>	[4]
	Баклажан	O <sub>2</sub>	[5]
	Банан	УПЭ	[6]
Допамин	Банан	O <sub>2</sub>	[7]
	Банан	УПЭ	[8]
	Шпинат	УПЭ	[9]
	Цуккини	УПЭ	[10]
Флаванолы	Банан	УПЭ	[11]
	Яблоко	УПЭ	[12]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Табак	УПЭ	[13]
	Спаржа	УПЭ	[14]
	Репа	УПЭ	[15]
Парацетамол	Авокадо	УПЭ	[16]
Фенолы	Грибы	УПЭ	[17]
Спирты	Семена томатов	УПЭ	[18]

\* [1] *Macholan L., Chmelikova B.* // Anal. Chim. Acta. 1986. Vol. 185. P. 187. [2] *Fatibello-Filho O., Vieira I. C.* // J. Braz. Chem. Soc. 2000. Vol. 11. P. 412. [3] *Mazzei F., Botre F., Lorenti G. et al.* // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 316. P. 79. [4] *Botre F., Mazzei F., Lanzi M. et al.* // Ibid. 1991. Vol. 255. P. 59. [5] *Dinckaya E., Akyilmaz E., Telefoncu A., Ahgol S.* // Indian J. Biochem. Biophys. 1999. Vol. 36. P. 36. [6] *Feng T.* // Anal. Lett. 1993. Vol. 26. P. 1557. [7] *Chen Y., Tan T. C.* // Sens. Actuators B. 1995. Vol. 28. P. 39. [8] *Wang J., Lin M. S.* // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. P. 1545. [9] *Zhihong L., Wenjean Q., Meng W.* // Anal. Lett. 1992. Vol. 25. P. 1171. [10] *Lupetti K. O., Ramos L. A., Vieira I. C., Fatibello-Filho O.* // Farmaco. 2005. Vol. 60. P. 179. [11] *Eggins B. R., Hickey C., Toft S. A., Zhou D. M.* // Anal. Chim. Acta. 1997. Vol. 347. P. 281. [12] *Cummings E. A., Milley P., Linquette-Mailley S. et al.* // Analyst. 1998. Vol. 123. P. 1975. [13] *Navaratne A., Rechnitz G. A.* // Anal. Chim. Acta. 1992. Vol. 257. P. 59. [14] *Oungpipat W., Alexander P. W., Sounthwell-Keely P.* // Ibid. 1995. Vol. 309. P. 35. [15] *Chut S. L., Li J., Ngim-Tan S.* // Anal. Lett. 1997. Vol. 30. P. 1993. [16] *Fatibello-Filho O., Lupetti K. O., Vieira I. C.* // Talanta. 2001. Vol. 55. P. 685. [17] *Bonakdar M., Vilchez J., Mottola H.* // J. Electroanal. Chem. 1989. Vol. 266. P. 47. [18] *Wang J.* // Electroanalysis. 1991. Vol. 3. P. 255.

лем, шпинатом, яблоками, грибами для определения допамина, аскорбиновой кислоты, катехола, пероксида водорода, оксалатов, этанола, фенолов и др. Так, введение измельченной ткани банана в пасту УПЭ позволяет определять допамин с пределом обнаружения  $1,3 \cdot 10^{-8}$  моль/л. Такой электрод имеет короткое время отклика, про-



**Рис. 3.26.** Модели взаимодействий субстрат–фермент в тканевых биосенсорах

S – субстрат; E – фермент; *tp* – транспортный белок

должительное время жизни, высокую стабильность и невысокую стоимость.

Следует заметить, что механизм функционирования тканевых биосенсоров довольно сложен и зависит от транспортных свойств молекул субстрата и продуктов реакции в иммобилизованном на электроде слое ткани. Для описания взаимодействий между субстратом и ферментом в тканевом слое предложен ряд моделей, некоторые из них представлены на рис. 3.26.

В модели I наружный слой ткани полностью разрушен, и фермент находится на ее поверхности. По мере старения ткани мертвые клетки удаляются с поверхности и новый слой клеток генерирует свежую порцию фермента. В этой модели не рассматривается процесс проникновения субстрата в клетку.

Модель II описывает случай, когда иммобилизованные клетки ткани повреждены до такой степени, что молекулы субстрата и продукта реакции свободно диффундируют внутрь клеток и наружу через образовавшиеся каналы, но не настолько, чтобы фермент диффундировал в объем раствора. Подобные каналы возникают в ткани в процессе ее иммобилизации на электроде либо при промывании тканевого слоя реагентами, либо при оттаивании замороженного материала.

Моделям III и IV соответствуют случаи, когда клетки иммобилизованной ткани остаются неповрежденными. При этом модель III предполагает наличие транспортных белков, обеспечивающих проникновение субстрата через клеточные мембраны, а в модели IV помимо транспортного белка необходим источник энергии для ее пополнения в процессах переноса субстрата и продукта реакции.

Вместо тканей в качестве модифицирующих добавок можно использовать свежесжатые соки или экстракты (гомогенаты) тканей, содержащие соответствующие ферменты. Например, в биосенсоре для определения фенолов в качестве источника полифенолоксидазы служит экстракт *Alocasia macrhoriza*. Указанный сенсор позволяет определять пирогаллол, катехол, фенол и *n*-крезол в

сточных водах в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л с временем отклика от 1 до 4 мин. Особый интерес экстракты тканей представляют при определении субстратов в условиях проточно-инжекционного анализа. Так, огуречный сок используется в качестве реагента-носителя при определении аскорбиновой кислоты методом ПИА. В другом случае для определения полифенолов в условиях ПИА использовались экстракты (гомогенаты) из мякоти банана и листьев шпината.

Оценивая возможности биохимических сенсоров, заметим, что они привлекают внимание ученых по разным причинам. При этом не стоит исключать и того, что термин «биосенсор» зачастую звучит заманчиво и даже загадочно. Однако многие публикации по этой проблеме заставляют задуматься о том, все ли факторы учитываются при организации отклика биосенсора или биосенсорного устройства, особенно когда последний имеет пространственную протяженность. Эти сомнения послужили толчком для написания статьи дискуссионного характера «Сверхмалые дозы биохимически активных веществ и отклик биосенсоров в аналитических системах» (Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин. – Журн. аналит. химии, 2001, Т. 56, С. 655).

«Попытки объяснения природы эффектов сверхмалых доз (СМД) находятся пока на уровне предположений, и их обсуждение за рамками данного письма. Можно лишь сказать, что помимо вполне традиционных теорий, опирающихся на специфику микроокружения биологических объектов, имеются достаточно экзотические объяснения, например, связанные с туннельным переносом микрообъектов через активационный барьер или нарушениями флуктуационных равновесий структуры воды.

Нельзя не отметить еще одну проблему, связанную с самой возможностью корректного исследования и обсуждения эффектов СМД. Общеизвестно, что проблемы определения ультрамикромол концентраций в экспериментальном плане отличаются деликатностью и даже некоторой опасностью для репутации ученых, на что обращают внимание специалисты, занимающиеся исследованиями в области СМД. Это связано с методическими трудностями. Работая с очень большими разбавлениями веществ практически невозможно контролировать их конечную концентрацию на уровнях порядка  $10^{-15}$ – $10^{-23}$  моль/л, даже если исследователь имеет в своем распоряжении высокочувствительную современную аппаратуру. Действительно, при использовании сильно разбавленных растворов чрезвычайно сложно избежать сорбции молекул определяемого вещества на стенках не только посуды (например ячеек для измерений, в которую помещен биосенсор), но и на составляющих элементах самого биосенсора или иного измерительного устройства. Особенно трудно учесть вклад сорбционной составляющей, когда

измерительное устройство имеет сложную конструкцию. Речь идет о мембранах большой площади, физических преобразователях, коммуникациях, системах ввода проб и прокачки растворов и т. д. Даже абстрагируясь от проблемы сорбционных эффектов, трудно учесть неравномерность распределения молекул определяемого вещества в процессе многократного разбавления растворов.»

Расширение диапазона функционирования биосенсоров в сторону крайне низких концентраций требует исключения возможных побочных процессов адсорбции определяемых веществ на элементах конструкции и стенках ячейки. Эти части устройства при контрольном измерении могут генерировать аналит, который и будет определен биосенсором. В то же время селективность и предел обнаружения не могут не зависеть от фундаментальных характеристик процесса биологического распознавания, т. е. от констант связывания при аффинном взаимодействии, растворимости мембраны (материала покрытия) и т. д. А эти величины конечны.

## Глава 4

# Модифицированные электроды в электрохимическом анализе

Модифицированные электроды применяются в анализе производственных материалов, разнообразных объектов гео- и биохимии, медицины и биологии, лекарственных препаратов и, конечно, объектов окружающей среды. Они привлекают к себе внимание именно потому, что с их помощью можно достаточно просто и селективно определить органические и неорганические соединения в различных средах, в том числе *in vivo*.

### 4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ

Решение многих важных проблем контроля токсичных веществ в природных и сточных водах, воздухе, почве и продуктах питания связано с определением ионов тяжелых металлов. Для снижения нижней границы определяемых концентраций обычно проводят адсорбционное концентрирование следов элементов на поверхности электрода или в его объеме с помощью экстракции и сорбции. Один из эффективных способов увеличения фарадеевского тока, позволяющий на несколько порядков снизить предел обнаружения, – предварительное концентрирование определяемых элементов на поверхности ртутной капли. Наряду с электрохимическим выделением можно использовать реакции комплексообразования ионов металлов с органическими лигандами, адсорбированными на электроде. Например, сильная адсорбция комплекса молибдена с 8-оксихинолином позволяет определять этот металл в морской воде с пределом обнаружения  $n \cdot 10^{-10}$  моль/л. Использование хелатообразующих реагентов трифенилметанового ряда и гидроксизосоединений для концентрирования ионов металлов в результате образования адсорбирующихся комплексов обеспечивает регистрацию сигнала при определении Al, Ce, Fe, Ga, La, Mn, Ti, Zr и других металлов на уровне  $\sim 10^{-10}$  моль/л.

Высокую адсорбционную активность имеют смешанно-лигандные комплексы ионов металлов с хелатообразующими реагентами (купферон, дифенилгуанидин и др.) и оксалат- и ацетат-ионами. Так, с пределом обнаружения  $5 \cdot 10^{-9}$  моль/л определяют Zr в рудах методом импульсной полярографии. Показана возможность определения следовых количеств Mo в почвах и растениях в виде ком-



плекса с купфером на фоне 0,2 моль/л уксусной кислоты и ацетата калия. Этот же прием применяют при определении следов урана в воде.

В настоящее время в вольтамперометрии наблюдается тенденция вытеснения ртутных электродов другими, изготовленными из нетоксичных материалов, в основном углеродсодержащих, которые имеют ряд привлекательных свойств при определении ионов металлов. Научные публикации по данной проблеме в соответствии с типом применяемых электродов условно можно разделить на шесть групп. К первой группе относятся работы по применению электродов на основе стеклоуглерода, ко второй – угольно-пастовых электродов, к третьей – углеродсодержащих композитных, к четвертой – импрегнированных графитовых, к пятой – печатных (screen-printed) и толсто пленочных графитсодержащих электродов и к шестой – ультрамикроэлектродов из углеродных материалов и их ансамблей. Наибольшее число работ посвящено электродам на основе стеклоуглерода, однако в последние годы интерес вызывают планарные тонкопленочные и толсто пленочные графитсодержащие электроды, полученные методами трафаретной и струйной печати.

Электроды из стеклоуглерода изотропны, практически газонепроницаемы, имеют малую пористость и высокую твердость, хорошо проводят электрический ток, устойчивы в агрессивных средах. Однако они имеют невысокую адсорбционную способность по сравнению с другими углеродными материалами, что объясняет сравнительно низкую чувствительность определений на немодифицированных электродах. В качестве модификаторов стеклоуглеродных электродов служат металлы (Bi, Au, Ir, Cd, Cu), органические вещества, биологически активные соединения, полимеры, нанотрубки. Как правило, иммобилизацию водорастворимых компонентов на поверхности электрода проводят в режиме *in situ*, а малорастворимых – в режиме *ex situ*. В табл. 4.1 приведены примеры применения модифицированных стеклоуглеродных электродов для вольтамперометрического определения неорганических ионов.

Для повышения избирательности иногда используют сочетание режимов *in situ* и *ex situ*. Например, на электрод предварительно наносят пленку электропроводящего полимера, а в раствор вносят селективный органический реагент, который взаимодействует с определяемым ионом и адсорбируется на поверхности электрода. При этом происходит двухслойное модифицирование электродной поверхности. В некоторых случаях наращивают до трех модифицирующих слоев, каждый из которых выполняет определенную функцию. Так, послойное модифицирование электрода глиной, катионообменным полимером и ртутью позволяет получить на поверхности стеклоуглерода модифицирующий слой с катионообменными свойствами, способный образовывать амальгаму с определяемыми металлами.

**Таблица 4.1. Модифицированные стеклоглеродные электроды для вольтамперометрического определения неорганических ионов**

Модификатор	Способ модифицирования	Определяемый ион	Объект анализа	Лит-ра*
Hg	in situ	Ni <sup>2+</sup>	Гальванические покрытия	[1]
Hg	in situ	Pd <sup>2+</sup>	Хлоридсодержащие растворы	[2]
Hg	in situ	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Озерная вода	[3]
Hg	in situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Морская вода	[4]
Hg	ex situ	Tl <sup>+</sup>	Природные воды	[5]
Hg	ex situ	Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Сточные воды	[6]
Hg, оксин	in situ	Mo <sup>6+</sup>	Биолог. материалы	[7]
Hg, ДМГ	in situ	Ni <sup>2+</sup>	Почвы	[8]
Hg, меркаптан	ex situ	Cd <sup>2+</sup>	Морская вода	[9]
Hg, катехол	in situ	Sn <sup>4+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Биолог. материалы	[10]
Hg, ДМГ	ex situ/in situ	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Биолог. жидкости	[11]
Au	ex situ	As <sup>3+</sup>	Природные воды	[12]
Au (наночастицы)	ex situ	As <sup>3+</sup>	Речные воды	[13]
Cd	in situ	Hg <sup>2+</sup>	Природные воды	[14]
Bi	in situ	Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Водопроводная вода	[15]
Bi, ДМГ	ex situ/in situ	Co <sup>2+</sup>	Природные воды	[16]
8-Оксихинолин	in situ	Sn <sup>2+</sup>	Фармпрепараты	[17]
Ализарин	ex situ	Cu <sup>2+</sup>	Водный раствор	[18]
Каликс[4]арен	ex situ	Hg <sup>2+</sup>	Природные воды	[19]
Нафион	ex situ	Sn <sup>4+</sup>	Волосы	[20]
Нафион/Hg	ex situ	Cd <sup>2+</sup>	Кровь	[21]
Нафион/Hg	ex situ	Cu <sup>2+</sup>	Пиво	[22]
Нафион/Hg	ex situ/in situ	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Сточные воды	[23]
Нафион/Hg-Cu	ex situ	Pb <sup>2+</sup>	Природные воды	[24]
Нафион/Bi	ex situ/in situ	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Растворы ПАВ	[25]
Нафион/ДМГ	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Сточные воды	[26]
Нафион/8-оксихинолин/Hg	ex situ	Te <sup>4+</sup>	Водный раствор	[27]
Тосфлекс	ex situ	Hg <sup>2+</sup>	Природные воды	[28]

Модификатор	Способ модифицирования	Определяемый ион	Объект анализа	Лит-ра*
Тосфлекс/Hg	ex situ	$\text{Bi}^{3+}$	Грунтовые воды	[29]
Тосфлекс/8-оксихинолин/Hg	ex situ	$\text{Te}^{4+}$	Водный раствор	[30]
Ацетилцеллюлоза	ex situ	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Модельный раствор	[31]
Поливинилпиридин/Hg	ex situ	$\text{Pb}^{2+}$	Грунтовые воды	[32]
Поливинилпиридин/Hg	ex situ	$\text{Tl}^{3+}$	Грунтовые воды	[33]
Ацетилцеллюлоза/Hg	ex situ	$\text{Pb}^{2+}$	Модельный раствор	[34]
Дрожжи	ex situ	$\text{Au}^{3+}$	Водный раствор	[35]
УНТ	ex situ	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Озерная вода	[36]

\* [1] Надеждина Л. С., Константинова С. А., Филановский Б. К. // Журн. аналит. химии. 1991. Т. 46. С. 2442. [2] Надеждина Л. С., Лобнова О. А., Панкина И. А. // Там же. 1998. Т. 53. С. 171. [3] Fischer E., Berg C. M. G. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 385. P. 273. [4] Sun Y.-C., Tu Y.-L., Mierzwa J. // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. Vol. 360. P. 550. [5] Козина С. А. // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58. С. 1067. [6] Brett C. M. A., Brett A. M.O., Tugulea L. // Anal. Chim. Acta. 1996. Vol. 322. P. 151. [7] Adeloju S. B. O., Pablo F. // Electroanalysis. 1995. Vol. 7. P. 476. [8] Rocha M., Neto M., Yorres M., Varennes A. // Ibid. 1997. Vol. 9. P. 145. [9] Turyan I., Mandler D. // Anal. Chem. 1994. Vol. 66. P. 58. [10] Adeloju S. B. O., Pablo F. // Electroanalysis. 1995. Vol. 7. P. 750. [11] Brett C. M. A., Brett A. M.O., Tugulea L. // Ibid. 1996. Vol. 8. P. 639. [12] Rasul S. B., Munir A. K. M., Hossain Z. A. et al. // Talanta. 2002. Vol. 58. P. 33. [13] Dai X., Nekrassova O., Hyde M. E., Compton R. G. // Anal. Chem. 2004. Vol. 76. P. 5924. [14] Каменев А. И., Вумер И. П. // Журн. аналит. химии. 1993. Т. 48. С. 1197. [15] Kefala G., Economou A., Voulgaropoulos A., Sofoniou M. // Talanta. 2003. Vol. 61. P. 603. [16] Krollicka A., Bobrowski A., Kalcher K. et al. // Electroanalysis. 2003. Vol. 15. P. 1859. [17] Yang Z., Alafandy M., Boutakhrit K. et al. // Ibid. 1996. Vol. 8. P. 25. [18] Komura T., Isogai S., Yamaguchi T. et al. // J. Electroanal. Chem. 2000. Vol. 490. P. 70. [19] Lu J., He X., Zeng X. et al. // Talanta. 2003. Vol. 59. P. 553. [20] Yang S., Tian H., Wang D., Tang Y. // J. Electroanal. Chem. 1995. Vol. 383. P. 31. [21] Krusma J., Nei L., Hardcastle J. L. et al. // Electroanalysis. 2004. Vol. 16. P. 399. [22] Gutierrez C. A., Hardcastle J. L., Ball R. G., Compton R. G. // Analyst. 1999. Vol. 124. P. 1053. [23] Brett C. M. A., Brett A. M.O., Matysik F. M. et al. // Talanta. 1996. Vol. 43. P. 2015. [24] Zen J.-M., Ting Y.-S. // Anal. Chim. Acta. 1996. Vol. 332. P. 59. [25] Wang J., Deo R. P., Thongngamdee S., Ogorevc B. // Electroanalysis. 2001. Vol. 13. P. 1153. [26] Zen J.-M., Hsu F.-S., Chi N.-Y. et al. // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 310. P. 407. [27] Yang H.-Y., Sun I.-W. // Ibid. 1998. Vol. 358. P. 285. [28] Ugo P., Moretto L., Mazzocchi G. A. // Ibid. 1995. Vol. 305. P. 74. [29] Yang H.-Y., Chen W.-Y., Sun I.-W. // Talanta. 1999. Vol. 50. P. 977. [30] Yang H., Sun I.-W. // Electroanalysis. 1999. Vol. 11. P. 195. [31] Hoyer B., Sorensen G., Jensen N., Christensen M. K. // Ibid. P. 940. [32] Zen J.-M., Wu J.-W. // Anal. Chem. 1996. Vol. 68. P. 3966. [33] Zen J.-M., Wu J.-W. // Electroanalysis. 1997. Vol. 9. P. 302. [34] Christensen M. K., Hoyer B. // Ibid. 2000. Vol. 12. P. 35. [35] Lack B., Duncan J., Nyokong T. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 385. P. 393. [36] Wu K., Hu S., Fei J. et al. // Analyst. Chim. Acta. 2003. Vol. 489. P. 215.

Многочисленную группу стеклоуглеродных электродов составляют электроды, модифицированные полимерными пленками. Для получения ультратонких ( $\sim 300$  нм) пленок предложен оригинальный способ электростатического распыления, заключающийся в получении «спрей-полимера» под действием электрического поля. В частности, для нанесения пленки ацетата целлюлозы смесь, состоящую из раствора полимера и перхлората магния (порообразователь) в ацетоне, распыляют в электрическом поле напряженностью 14 кВ. При этом происходит дробление капель жидкости на более мелкие капли и электрод покрывается тонкой, равномерной и однородной пленкой.

Для повышения избирательности в структуру полимеров встраивают хелатообразующие реагенты. Например, высокая селективность достигнута при иммобилизации на поверхности стеклоуглеродного электрода полимеров с привитыми ЭДТА-группами. Краун-эфир, выполняющий роль «хозяев» для ионов металлов, используются для определения Au, Cd, Cu, Hg, Pb при иммобилизации реагентов в пленку нафтона.

К пионерским работам относятся исследования по применению нанотрубок для модифицирования стеклоуглеродных электродов. Однако для внедрения таких электродов в практику необходимо решить вопросы структурной упорядоченности слоя нанотрубок на электродной поверхности, влияющей на точность определений, а также уменьшить стоимость модифицирующего материала.

По сравнению с электродами из стеклоуглерода угольно-пастовые электроды проявляют повышенную адсорбционную способность ко многим веществам, что с успехом используется в вольтамперометрии при определении неорганических ионов. Введение в пасту электрода или иммобилизация на его поверхности соединений, содержащих специфические к ионам металлов функциональные группы, повышает селективность и чувствительность определений. Наиболее широко применяется введение модификатора в пасту. Чаще всего в качестве модификаторов служат вещества с комплексообразующими свойствами, ионообменные материалы, неорганические и полимерные сорбенты: органические реагенты, краун-соединения, кремнеземы, глины, природные и искусственные ионообменники, гетероциклические соединения. Предложены электроды на основе кремнезема с самоорганизующимися монослоями, которые позволяют определять Cu, Pb, Cd, а также УПЭ, модифицированные лишайниками и  $\alpha$ - и  $\beta$ -циклодекстринами. Примеры применения модифицированных угольно-пастовых электродов для вольтамперометрического определения ионов металлов приведены в табл. 4.2.

Основным недостатком УПЭ является невысокая точность определений ( $S_r \approx 0,2-0,3$ ), обусловленная плохой воспроизводимостью поверхности электрода при ее обновлении. Решение этой про-

**Таблица 4.2. Модифицированные угольно-пастовые электроды для вольтамперометрического определения неорганических ионов**

Модификатор	Способ модифицирования	Определяемый ион	Объект анализа	Лит-ра*
Au	in situ	Hg <sup>2+</sup>	Питьевая вода	[1]
Hg	in situ	Zn <sup>2+</sup>	Питьевая вода	[2]
Bi	in situ	Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Модельный раствор	[3]
ЭДТА	in situ	Fe <sup>3+</sup>	Речная вода	[4]
Тиоридазин	in situ	Pd <sup>2+</sup>	Питьевая вода	[5]
Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ex situ	Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Вода	[6]
Наночастицы Au	ex situ	As <sup>3+</sup>	Водный раствор	[7]
Краун-эфир	ex situ	Pb <sup>2+</sup>	Почва, снег, вода	[8]
Азакраун-эфир	ex situ	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Водный раствор	[9]
Тиакраун-эфир	ex situ	Ag <sup>+</sup>	Вода	[10]
Кремнеземы	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , U <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Морские и природные воды	[11–18]
Вермикулит	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Модельные растворы	[19–21]
Монтмориллонит	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Природные воды	[22–24]
Дауэкс	ex situ	Cu <sup>2+</sup>	Сточные воды	[25]
Амберлит	ex situ	Cd <sup>2+</sup>	Речная вода	[26]
Дуолит	ex situ	Hg <sup>2+</sup>	Речная вода	[27]
2,3-Дициано-1,4-нафтохинон	ex situ	Ag <sup>+</sup>	Водный раствор	[28]
Дитизон	ex situ	Pb <sup>2+</sup>	Речная вода	[29]
Тиогидразон	ex situ	Cu <sup>2+</sup>	Речная вода	[30]
ПАН	ex situ	Mn <sup>2+</sup> , Mn <sup>7+</sup>	Морская вода	[31]
Производные тиомочевин	ex situ	Ag <sup>+</sup>	Водный раствор	[32]
Фенилфлуорон	ex situ	Sb <sup>3+</sup>	Почва, волосы	[33]
Морин	ex situ	Zr <sup>4+</sup>	Руда	[34]
Лишайники	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Природные и питьевые воды	[35]
α- и β-ЦД	ex situ	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Водный раствор	[36,37]
Трибутилфосфат	ex situ	In <sup>3+</sup> , Ga <sup>3+</sup>	Модельная смесь	[38]

\* [1] Svancara I., Matousek M., Sikora E. et al. // Electroanalysis. 1997. Vol. 9. P. 827. [2] Svancara I., Pravda M., Hvizdalo M. et al. // Ibid. 1994. Vol. 6. P. 663. [3] Flechsig G.-U., Korbout O., Hecavar S. B. et al. // Ibid. 2002. Vol. 14. P. 192. [4] Bai Z.-P., Nakamura T., Izutsu K. // Electroanalysis. 1990. Vol. 2. P. 75. [5] Raber G., Kalcher K., Neuhold C. G. et al. // Ibid. 1995. Vol. 7. P. 138.

- [6] Pauliukaite R., Metelka R., Svancara I. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. Vol. 374. P. 1155. [7] Simm A. O., Banks C. E., Wilkins S. J. et al. // Ibid. 2005. Vol. 381. P. 979. [8] Шайдарова Л. Г., Улахович Н. А., Аль-Гахри М. А. и др. // Журн. аналит. химии. 1995. Т. 50. С. 755. [9] Шайдарова Л. Г., Улахович Н. А., Федорова И. Л. и др. // Там же. 1996. Т. 51. С. 746. [10] Tanaka S., Yoshida H. // Talanta. 1989. Vol. 36. P. 1044. [11] Walkarius A., Despas C., Bessiere J. // Electroanalysis. 1997. Vol. 9. P. 707. [12] Yantasee W., Lin Y., Fryxell G. F. et al. // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 502. [13] Etienne M., Bessiere J., Walkarius A. // Sensors and Actuators. 2001. Vol. B 76. P. 531. [14] Marino G., Bergamini M. F., Teixeira M/ F. S. et al. // Talanta. 2003. Vol. 59. P. 1021. [15] Aleixo L. M., Souza M. F. B., Godinho O. E. S. et al. // Anal. Chim. Acta. 1993. Vol. 271. P. 143. [16] Sayen S., Etienne M., Bessiere J. et al. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14. P. 1521. [17] Yantasee W., Lin Y., Fryxell G. F. et al. // Ibid. 2004. Vol. 16. P. 870. [18] Bond A. M., Miao W., Smith T. D. et al. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 396. P. 203. [19] Kalcher K., Grabec I., Raber G. et al. // J. Electroanal. Chem. 1995. Vol. 386. P. 149. [20] Ogorevc B., Cai X., Grabec I. // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 305. P. 176. [21] Svegl I. G., Kolar M., Ogorevc B. et al. // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. Vol. 361. P. 358. [22] Huang W., Yang C., Zhang S. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. Vol. 374. P. 998. [23] Kula P., Navratilova Z. // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. Vol. 354. P. 692. [24] Kula P., Navratilova Z., Kulova P. et al. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 385. P. 91. [25] Labuda J., Korgova H., Vanickova M. // Ibid. 1995. Vol. 305. P. 42. [26] Agraz R., Sevilla M. T., Pinilla J. M. et al. // Electroanalysis. 1991. Vol. 3. P. 393. [27] Agraz R., Sevilla M. T., Hernandez L. // J. Electroanal. Chem. 1995. Vol. 390. P. 47. [28] Khodari M., Krisha M. M. A., Fandy R. // Talanta. 1994. Vol. 41. P. 2179. [29] Molina-Holgado T., Pinilla-Macias J. M., Hernandez-Hernandez L. // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 309. P. 117. [30] Ruiperez J., Mendiola M. A., Sevilla M. et al. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14. P. 532. [31] Khoo S. B., Soh M. K., Cai Q. et al. // Ibid. 1997. Vol. 9. P. 45. [32] Guttman M., Beyer K.-H. L. // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. Vol. 356. P. 263. [33] Khoo S. B., Zhu J. // Analyst. 1996. V. 121. P. 1983. [34] Liu S., Li J., Mao X. // Electroanalysis. 2003. Vol. 15. P. 1751. [35] Connor M., Dempsey E., Smyth M. R. Et al. // Ibid. 1991. Vol. 3. P. 331. [36] Roa-Morales G., Ramirez-Silva M. T., Gonzalez R. L. et al. // Ibid. 2005. Vol. 17. P. 694. [37] Roa-Morales G., Ramirez-Silva M. T., Romero-Romo M. A. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2003. Vol. 377. P. 763. [38] Курбатов Д. И., Булгакова Л. Ю. // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. С. 410.

блемы многие исследователи видят в использовании промышленных углеродсодержащих электродов, изготовленных с применением современных технологий и новых композиционных материалов. Так, для определения Cu, Pb, Zn предложены кремний-углеродные электроды, модифицированные ртутью, диметилглиоксимом (ДМГ) – для определения Ni, 9-фенил-3-флюороном – для определения Os, неocupфероном и производными фенантролина – для определения Cu, Fe и Ni.

В аналитической практике нашли применение импрегнированные графитовые электроды, пропитанные смесью парафина с полиэтиленом или эпоксидными смолами. Для определения неорганических ионов электроды модифицируют металлами, полимерными пленками, оксокомплексами молибдена, органическими реагентами, специфичными к определяемым ионам. Как правило, модифицированию подвергают поверхность электрода, хотя есть примеры объемного модифицирования. Широкому применению таких электродов препятствует трудоемкость технологии их изготовления,

начиная от механической обработки и пропитки графитовых стержней под вакуумом и кончая вклеиванием в корпус из пластмассы и шлифованием поверхности.

Для массового производства недорогих, простых в изготовлении и, самое главное, воспроизводимых электродов используются технологии поточных серийных производств, применяемые в микроэлектронике. Изготовленные с их помощью электроды имеют, как правило, планарную конструкцию – в англоязычной научной литературе screen-printed, strip-sensor или thick-film electrode. Способы изготовления таких электродов рассмотрены в разд. 1.1.1. Их стоимость невелика, можно произвести до 1000 штук/ч, поэтому они годятся для одноразового использования.

Следует заметить, что воспроизводимость технических характеристик печатных электродов довольно высокая, поэтому они имеют близкие параметры и сигнал электрода хорошо воспроизводится. Первые публикации, в которых упоминаются одноразовые электроды, относятся к середине 1980-х годов и связаны с разработкой биосенсоров для определения глюкозы в крови больных диабетом. Чуть позже были предложены толстопленочные печатные электроды для определения ионов цветных и тяжелых металлов. Конструкция и технология изготовления таких электродов позволяют довольно легко модифицировать их поверхность либо вводить модификаторы в объем электрода. В табл. 4.3 приведены примеры применения модифицированных пленочных электродов для определения неорганических ионов. В качестве модификаторов наиболее широко применяются металлы, макроциклические соединения, органические реагенты, катионообменные смолы. Пределы обнаружения ионов металлов при использовании модифицированных пленочных электродов находятся на уровне  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  моль/л.

В отличие от пленочных графитовых электродов ультрамикроэлектроды используются в основном в исследовательских целях либо при измерениях в средах с низкой электропроводностью, а также в качестве детекторов в проточных системах и для определения биологически активных веществ *in vivo*. Нижняя граница определяемых концентраций для единичного немодифицированного углеродного или графитового волокна находится на уровне  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  моль/л. Более низкие пределы обнаружения достигнуты на модифицированных ультрамикроэлектродах. В качестве модификаторов, как правило, применяются Hg, Au и Bi.

В последние годы появились работы по применению электродов с иммобилизованными наночастицами для следового анализа неорганических соединений методом инверсионной вольтамперометрии. В частности, электрод, модифицированный наночастицами золота, используется для определения мышьяка методом ИВА. Заметим, что пока сделаны только первые шаги на пути использования наночастиц металлов и биметаллов в вольтамперометрии.

**Таблица 4.3. Модифицированные планарные углеродсодержащие электроды для вольтамперометрического определения неорганических ионов**

Модификатор	Способ модифицирования	Определяемый ион	Объект анализа	Лит-ра*
Ag	in situ	Pb <sup>2+</sup>	Водные растворы	[1]
Наночастицы Au	ex situ	As <sup>3+</sup>	Вода	[2]
Bi	ex situ	Pb <sup>2+</sup>	Питьевая вода	[3]
Hg	in situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Вода, кровь, почва	[4–6]
Hg	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Урина, природная и питьевая вода, вино, почва	[7–9]
HgO	ex situ	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Озерная вода	[10]
Каликсарены	ex situ	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Речная вода	[11, 12]
ПАН	ex situ	Pb <sup>2+</sup>	Грунтовые воды	[13]
Ализарин	ex situ	Al <sup>3+</sup>	Почва	[14]
ДМГ	ex situ	Ni <sup>2+</sup>	Речная вода	[15]
Дауэкс	ex situ	Cu <sup>2+</sup>	Питьевая вода	[16]

\* [1] Bagel O., Lagger G., Girault H. H. et al. // *Electroanalysis*. 2001. Vol. 13. P. 100. [2] Simm A. O., Banks C. E., Wilkins S. J. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. Vol. 381. P. 979. [3] Wang J., Lu J., Hocesvar S. B. et al. // *Electroanalysis*. 2001. Vol. 13. P. 13. [4] Brainina Kh. Z., Bond A. M. // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67. P. 2586. [5] Brainina Kh., Schafer H., Ivanova A. et al. // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 330. P. 175. [6] Liu T. Z., Lai D., Osterioh J. D. // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 3539. [7] Wang J., Tian B. // *Anal. Chem.* 1992. Vol. 64. P. 1706. [8] Jasinski M., Grundler P., Flechsig G.-U. et al. // *Electroanalysis*. 2001. Vol. 13. P. 34. [9] Hart J. P., Wring S. A. // *Ibid.* 1996. Vol. 8. P. 617. [10] Choi J.-Y., Seo K., Cho S.-R. et al. // *Anal. Chim. Acta*. 2001. Vol. 443. P. 241. [11] Honeychurch K. C., Hart J. P., Cowell D. C. et al. // *Electroanalysis*. 2002. Vol. 14. P. 177. [12] Honeychurch K. C., Hart J. P., Cowell D. C. et al. // *Sensors Actuators*. 2001. Vol. B 77. P. 642. [13] Honeychurch K. C., Hart J. P., Cowell D. C. // *Anal. Chim. Acta*. 2001. Vol. 431. P. 89. [14] Akhtar P., Devereaux H. A., Downard A. et al. // *Ibid.* 1999. Vol. 381. P. 49. [15] Wang J., Nascimento V. B., Lu J. et al. // *Electroanalysis*. 1996. Vol. 8. P. 635. [16] Neuhold C. G., Wang J., Nascimento V. B. et al. // *Talanta*. 1995. Vol. 42. P. 1791.

Нанотехнология открывает новые возможности для разработки модифицированных электродов с включенными медиаторами. Применение наноструктурированных материалов (наночастицы металлов, сплавов, нанокомпозиты на их основе, нанотрубки) позволило создать электроды нового поколения. С помощью этих электродов удастся определять такие важные низкомолекулярные соединения, как монооксид азота в биомедицинских объектах, поскольку этот нейромедиатор участвует в физиологических процессах организма.



Для определения монооксида азота разработан электрод, состоящий из платинового микроэлектрода, покрытого пленкой поливинилпиридина с осажденным на ней наноккомпозитом  $\text{Pd}(\text{Ir}_2\text{O}_3)$ . Сверху слой модификатора покрывают защитной пленкой нафiona. Электрод проявляет высокую каталитическую активность при окислении NO. Каталитический отклик связан с переносом электрона в редокс-системе  $\text{IrO}_2/\text{Ir}_2\text{O}_3$ . При этом поливинилпиридин обеспечивает электропроводность модифицирующего слоя, а частицы Pd повышают стабильность каталитического отклика. Сигнал NO регистрируют в условиях циклической или импульсной вольтамперометрии. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций  $5,8 \cdot 10^{-8} \div 6,4 \cdot 10^{-6}$  моль/л с коэффициентом корреляции 0,9985. Предел обнаружения –  $1,5 \cdot 10^{-8}$  моль/л. На величину отклика не влияет присутствие аскорбиновой кислоты, допамина и нитрит-ионов.

Для детектирования NO в биологических объектах применяют электрод на основе угольного волокна, покрытого неорганической пленкой состава  $\text{Cu}[\text{PtCl}_6] \cdot \text{Cu}[\text{PtCl}_4]$ . Модификатор проявляет высокую каталитическую активность к NO при потенциале +0,7 В. Для устранения мешающего влияния нитрит-ионов электрод покрывают пленкой нафiona. Линейная зависимость отклика электрода от концентрации NO наблюдается в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-8}$  до  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л с пределом обнаружения 5 нмоль/л при отношении сигнал/шум 3:1.

Предложен электрод для определения NO на основе пленки полиэлектролита, содержащей наночастицы золота, стабилизированные 4-(диметиламино)пиридином. В качестве электродов для определения NO используются также электроды на основе наночастиц золота, осажденных на наноструктурированной поверхности электрода из оксидов In и Sn (ITO), равномерно распределенные наночастицы Pt и Fe на поверхности стеклоглуглера, которые проявляют высокую каталитическую активность при окислении нитрит-ионов (предел обнаружения –  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л).

Для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  применяют различные электроды. Среди оксидов платиновых металлов, включенных в угольную пасту или чернила, лучшим катализатором является диоксид иридия. Сопоставлены отклики  $\text{H}_2\text{O}_2$  при восстановлении и окислении этого субстрата на электродах из Pt, Ir и стеклоглуглера, модифицированных электрохимически осажденными пленками оксидов иридия  $\text{IrO}_x$  или наночастицами Ir, нанесенными по золь-гель технологии. Восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$  протекает на подложке, а в его окислении участвует пленка  $\text{IrO}_x$  и величина сигнала-отклика не зависит от природы подложки. Каталитическая активность  $\text{IrO}_x$  в реакции окисления  $\text{H}_2\text{O}_2$  такая же, как у Pt, но электрод с пленкой  $\text{IrO}_x$  имеет лучшую стабильность, нечувствителен к мешающим компонентам, совместим с биологической матрицей.

В качестве амперометрического биосенсора на пероксид водорода предложен ультрамикрoэлектрод на основе угольного волокна, модифицированного наночастицами платины. Последние облегчают перенос электронов между электроактивными центрами фермента, в качестве которого служит пероксидаза хрена, и ультрамикрoэлектродом. Ток электрода линейно зависит от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в диапазоне от  $6,4 \cdot 10^{-7}$  до  $3,6 \cdot 10^{-3}$  моль/л с коэффициентом корреляции 0,9953 и пределом обнаружения  $3,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л при отношении сигнал/шум 3:1. Каталитический отклик на пероксид водорода композитных электродов на основе оксидов платиновых металлов и частиц Pd, диспергированных в полимерную пленку, лежит в основе действия биосенсоров на глюкозу.

Применение медиаторов электронного переноса позволяет повысить чувствительность определений гидразина и гидроксиламина. Высокочувствительный отклик на гидразин получен на стеклоуглеродном электроде, модифицированном пленкой нафiona с включенными частицами Ru, или покрытом пленкой поливинилпиридина с включенными частицами Pd, а также на УПЭ, модифицированном Cu и Pd. Электрод на основе УПЭ, модифицированного Pd, применяют для определения гидроксиламина.

Электроды, модифицированные гексацианоферратами металлов в качестве медиаторов, хорошо зарекомендовали себя в процессах электрокаталитического окисления анионов ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ), нейтральных молекул ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{N}_2\text{H}_4$ ,  $\text{SO}_2$ ), а также при восстановлении  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{CO}_2$  и др. Для амперометрического определения гидразина предложено использовать графитовый электрод, модифицированный гексацианоферратом кобальта. Зависимость величины тока от концентрации гидразина линейна в диапазоне от  $2,0 \cdot 10^{-5}$  до  $2,8 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Нижний предел определяемых концентраций –  $9,8 \cdot 10^{-6}$  моль/л при отношении сигнал/шум 3:1. Электрод отличается простотой изготовления, высокой чувствительностью, быстротой действия и стабильностью отклика.

Сопоставлена электрокаталитическая активность гексацианоферратов  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  при окислении ионов  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Указанные соединения катализируют реакцию окисления тиосульфат-ионов с участием редокс-пары  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  с различным внешнесферным окружением иона железа. В зависимости от состава комплексов образуются следующие продукты реакции: для In, Ni и Co – ионы  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ , а для Fe – ионы  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Оценивая перспективы применения модифицированных электродов в анализе неорганических веществ, заметим, что развитие вольтамперометрии, как и других методов электрохимического анализа, все больше смещается в сторону, связанную с разработкой новых электродов, сенсоров и датчиков, позволяющих проводить определения «быстрее, дешевле, проще и лучше». Обилие публикаций по применению и выбору модификаторов, их иммобилиза-

ции на поверхности электрода, использованию медиаторов электронного переноса убедительно свидетельствует об интересе к этой проблеме. Однако феноменологический этап при проведении исследований еще не закончился. До сих пор не решен ряд вопросов, препятствующих широкому применению модифицированных электродов. Особенно это касается технологий получения электродов со стабильным электрохимическим откликом, который не зависит от методов подготовки поверхности электрода перед измерениями. Попытки замены ртути другими металлами, как правило, приводят к потере чувствительности и избирательности определений.

Еще одна проблема – относительно малая продолжительность «жизни» большинства электродов, их «старение» со временем, которое проявляется в изменении состава и структуры модифицирующего слоя и ухудшении его аналитических характеристик. Длительность работы электродов существенно ограничена необходимостью регенерации поверхности после каждого измерения. Именно поверхность электрода является источником большинства проблем. Даже для хорошо изученного стеклоуглеродного электрода до сих пор продолжается дискуссия о природе ртутной пленки на его поверхности – является ли она однородной с толщиной от 0,5 до 10 мкм или же ртуть выделяется в виде мелких капель со статистическим распределением на поверхности электрода.

На этапе создания и применения модифицированных электродов необходимо ответить на целый ряд вопросов: как свойства модифицирующего слоя влияют на параметры сигнала-отклика; как механическая или электрохимическая обработка поверхности влияют на активность модификатора и электродный процесс; как сделать поверхность модифицирующего слоя воспроизводимой и устойчивой; как исключить загрязнение электрода мешающими веществами, ухудшающими его аналитические характеристики.

## **4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

Эффект адсорбционного накопления, проявляющийся в случае комплексов металлов с органическими лигандами, используется в вольтамперометрии для определения органических соединений. Так, с помощью адсорбционного концентрирования с последующей регистрацией катодных вольтамперограмм проводят определение лекарственного препарата дилтиазема до  $4 \cdot 10^{-9}$  моль/л. Этот же способ используется для снижения предела обнаружения фунгицидов на основе этиленбисдитиокарбаминовой кислоты и ее солей более чем в 250 раз по сравнению с классической вольтамперометрией. Увеличение сигнала-отклика вследствие накопления определяемого вещества на поверхности электрода наблюдается при определении следов антибиотиков – гидрохлорида тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина – с пределом обнару-

жения  $6 \cdot 10^{-10}$ – $2 \cdot 10^{-9}$  моль/л и  $S_r = 0,008$ – $0,020$  в зависимости от природы вещества.

Наряду с адсорбцией определяемых компонентов концентрирование органических веществ на электроде можно осуществлять за счет образования поверхностно-активных комплексов с ионами металлов и комплексов типа «гость-хозяин», протекания химических реакций с материалом электрода, экстракционного и сорбционного накопления в его объеме. В частности, пестициды фозалон, карбофос и карбатион при адсорбции на электродной поверхности образуют поверхностно-активные комплексы с  $\text{Co}^{2+}$  и краун-эфирами. Экстракционное извлечение производных гидрохинона и флаваноидов органическим связующим УПЭ используется для их определения в косметических изделиях и лекарственных препаратах. Для определения ароматических нитросоединений и хлорфенолов предложены УПЭ, модифицированные бентонитами, силикагелями, углеродными и полимерными сорбентами. Экстракция в объем УПЭ используется для определения лекарственных веществ: цефалоспорины, имипрамина, индометацина.

Нижнюю границу определяемых концентраций можно понизить с помощью каталитических реакций, протекающих на электроде. Так, электроды, модифицированные платиновыми металлами, применяются для определения низших алифатических и ароматических спиртов, альдегидов, органических кислот. Среди платиновых металлов наибольшую каталитическую активность к органическим кислотам (муравьиной, щавелевой, гликолевой) проявляет Pd. Родий проявляет каталитическую активность при окислении гидрохинона, пирокатехина и их производных. Этанол и ацетальдегид окисляются на электроде, модифицированном Pt и соединениями Ru.

Модифицирование электродов металлическими катализаторами позволяет уменьшить перенапряжение окисления органических соединений и повысить чувствительность определений. Новые разработки направлены на создание электродов, модифицированных низшими оксидами, которые имеют более высокую каталитическую активность, что в итоге предопределяет возможность их использования в аналитических целях.

Эффективным способом повышения электрокаталитической активности металлов платиновой группы является их иммобилизация на электродах, покрытых полимерными пленками. Так, предел обнаружения щавелевой кислоты на стеклогуглеродном электроде, покрытом пленкой поливинилпиридина с иммобилизованными частицами Pd, или гидрохинона и пирокатехина на стеклогуглеродном электроде с пленкой поливинилпиридина, содержащей частицы Rh, снижается на один-два порядка по сравнению с немодифицированными электродами (табл. 4.4).

**Таблица 4.4. Модифицированные электроды для вольтамперометрического определения органических соединений**

Аналит	Электрод	Модификатор	$C_{\min}$ , моль/л	Лит-ра*
Этанол	УПЭ	RuO <sub>2</sub>	$6,5 \cdot 10^{-8}$	[1]
	СУ	Нафион/Ru <sup>3+</sup>	$1 \cdot 10^{-6}$	[2]
Гидрохинон	СУ	ПВП/Rh	$5 \cdot 10^{-7}$	[3]
Формальдегид	СУ	Pt – Pd	$3 \cdot 10^{-11}$ моль	[4]
Ацетальдегид			$1,6 \cdot 10^{-10}$ моль	
Пропиональдегид			$3 \cdot 10^{-11}$ моль	
Муравьиная кислота	СУ	ПВП/Pd	$1 \cdot 10^{-5}$	[5]
Щавелевая кислота	СУ	Pd	$1,5 \cdot 10^{-7}$ моль	[5, 6]
		Pd	$1 \cdot 10^{-4}$	[7]
		Pd	$1 \cdot 10^{-5}$	[8]
		ПВП/Pd	$5 \cdot 10^{-7}$	[9]
Мочевая кислота	УПЭ	ПВП	$2 \cdot 10^{-7}$	[10]
L-Пролин	УПЭ	β-Циклодекстрин	$5 \cdot 10^{-6}$	[11]
Аминокислоты	УПЭ	Краун-эфиры	$2 \cdot 10^{-6}$	[12]
Цистеин	УПЭ	Дифенилдитио-карбамат Ru <sup>3+</sup>	–	[13, 14]
		Тетрасульфонат фталоцианина Ni	–	
Тирам, дисульфирам	УПЭ	Фталоцианин Со	$(2-7) \cdot 10^{-8}$	[15]
Фозалон, карбофос	УПЭ	Комплекс Со с 2,2'-дипиридилом	$(1-5) \cdot 10^{-9}$	[16]
Карбатион	УПЭ	Краун-эфиры	$4 \cdot 10^{-9}$	[16]
Фенитоин, фено-барбитал	УПЭ	Нафион/Fc	$2 \cdot 10^{-7}$	[16]
Производные гидрохинона	УПЭ	Парафин	$7 \cdot 10^{-5}$ г/л	[17]
Флавоноиды	УПЭ	Нуйол	$\sim 10^{-8}$	[18, 19]
2-Нитрофенол	УПЭ	Бентонит	$2 \cdot 10^{-4}$ г/л	[20, 21]
2-Метил-4,6-динитрофенол	УПЭ	Тальк	$3,2 \cdot 10^{-6}$	[22]
Допамин, мочевая кислота	УПЭ	Нафион	$3 \cdot 10^{-9}$ , $2 \cdot 10^{-7}$	[23]
Цефалоспорин, ацетоклофенак	УПЭ	Жирные кислоты	$\sim 10^{-8}$	[24, 25]
Фенилэприн	УПЭ	Катионит	$2 \cdot 10^{-6}$	[26]
Имипрамин	УПЭ	Жирные кислоты	$1 \cdot 10^{-9}$	[27]
		β-Циклодекстрин	$7 \cdot 10^{-9}$	[28]
Тримипрамин	УПЭ	β-Циклодекстрин	$2 \cdot 10^{-8}$	[28]

Аналит	Электрод	Модификатор	C <sub>min</sub> , моль/л	Лит-ра*
Нифурооксазид	УПЭ	Полиэфир	1·10 <sup>-9</sup>	[29]
Азотреонам	УПЭ	Желатин	8·10 <sup>-8</sup>	[30]
Индометацин	УПЭ	Нуйол	3·10 <sup>-8</sup>	[31]
		Силиконовое масло		
Празосин	УПЭ	Нафийон	3·10 <sup>-11</sup>	[32]
		Октан	8·10 <sup>-10</sup>	[33]
Бупренорфин	УПЭ	Парафин	1·10 <sup>-8</sup>	[34]
Эстроген	УПЭ	Олеиновая кислота	4·10 <sup>-7</sup>	[35]
Эфедрин	УПЭ	Сепиолит	3·10 <sup>-6</sup> г/л	[36]
Кокаин	УПЭ	Парафин	2·10 <sup>-7</sup>	[34]

\* [1] *Leech D., Wang J., Smyth M.R.* // *Electroanalysis*. 1991. Vol. 3. P. 37. [2] *Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К.* // *Журн. аналит. химии*. 2005. Т. 60. С. 603. [3] *Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К.* // Там же. 2004. Т. 59. С. 1138. [4] *Wang J., Pamidi P. V. A., Cepria G.* // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 330. P. 151. [5] *Casella I. G., Zamboni C. G., Prete F.* // *Chromatography*. 1999. Vol. A 833. P. 75. [6] *Casella I. G.* // *Electrochim. Acta*. 1999. Vol. 44. P. 3353. [7] *Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К.* // *Журн. аналит. химии*. 2003. Т. 58. С. 992. [8] *Шайдарова Л. Г., Челнокова И. А., Гедмина А. В. и др.* // Там же. 2006. Т. 61. С. 409. [9] *Zen J. M., Chen Y. J., Hsu C. T., Ting Y. S.* // *Electroanalysis*. 1997. Vol. 9. P. 1009. [10] *Stefan R.-I., Van Staden J. F., Aboul-Eneim H. J.* // *Anal. Letters*. 1998. Vol. 31. P. 1787. [11] *Шайдарова Л. Г., Улахович Н. А., Федорова И. Л. и др.* // *Журн. аналит. химии*. 1996. Т. 51. С. 746. [12] *Nalini B., Narayanan S. S.* // *Electroanalysis*. 1998. Vol. 10. P. 779. [13] *Perez E. F., Kubota L. T., Tanaka A. A., Neto G. D.* // *Electrochim. Acta*. 1998. Vol. 43. P. 1665. [14] *Fernandez C., Revieiro A. J., Pingarron J. M.* // *Analysis*. 1995. Vol. 23. P. 319. [15] *Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.* // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2001. Vol. 31. P. 311. [16] *Wang J.* // *Analyst*. 1995. Vol. 120. P. 2241. [17] *Zoulis N. E., Efstathiou C. E.* // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 320. P. 255. [18] *Volikakis G., Efstathiou C. E.* // *Talanta*. 2000. Vol. 51. P. 775. [19] *Rodriguez I. N., Leyva J. A., De Cisneros J. L.* // *Anal. Chim. Acta*. 1997. Vol. 344. P. 167. [20] *Rodriguez I. N., Leyva J. A., De Cisneros J. L.* // *Analyst*. 1997. Vol. 122. P. 601. [21] *Cordero-Rando M., Naranjo-Rodriguez I., De Cisneros J. L. H.* // *Anal. Chim. Acta*. 1998. Vol. 370. P. 231. [22] *Zen J. M., Chen P. J.* // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 5087. [23] *El Maali N. A., Ghandour M. A., Kauffmann J.-M.* // *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 1995. Vol. 38. P. 91. [24] *Posac J. R., Vazquez M. D., Tascon M. L. et al.* // *Talanta*. 1995. Vol. 42. P. 293. [25] *Perlado J. C., Zapardiel A., Bermejo E. et al.* // *Anal. Chim. Acta*. 1995. Vol. 305. P. 83. [26] *Khodari M., Mansour H., El Din H. S.* // *Anal. Letters*. 1997. Vol. 30. P. 1909. [27] *Ferankova A., Korgova E., Miko R., Labuda J.* // *J. Electroanal. Chem.* 2000. Vol. 492. P. 74. [28] *Buchberger W., Niessner G., Bakry R.* // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. Vol. 362. P. 205. [29] *El Maali N.* // *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 1998. Vol. 45. P. 281. [30] *Radi A.* // *Electroanalysis*. 1998. Vol. 10. P. 103. [31] *Arranz A., De Betono S. F., Echevarria C. et al.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. Vol. 21. P. 797. [32] *Arranz A., Moreda J. M., Arranz J. F.* // *Quim. Anal.* 2000. Vol. 19. P. 31. [33] *Garcia-Fernandez M. A., Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A.* // *Electroanalysis*. 2000. Vol. 12. P. 483. [34] *Hu S. S., Guo M. D., Hu G. Z., Jiang M.* // *Anal. Letters*. 1995. Vol. 28. P. 1993. [35] *Chicharro M., Zapardiel A., Bermejo E. et al.* // *Analysis*. 1995. Vol. 23. P. 131. [36] *Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A.* // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 328. P. 67.

Ионообменная пленка нафиона может удерживать большие по размеру катионы. Это ее свойство используется для включения в полимерную матрицу металлоорганических катионов платиновых металлов таких, как  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{3+}$  или  $[\text{Os}(\text{dipy})_3]^{3+}$ . Электроды на основе пленки нафиона, содержащей фенантролиновый комплекс  $\text{Ru}^{3+}$ , применяются для вольтамперометрического определения этанола, а электрод, содержащий дипиридилный комплекс  $\text{Os}^{3+}$ , – для определения производных пирокатехина. Наибольший каталитический эффект при окислении этанола наблюдается на электроде покрытом пленкой поливинилпиридина, содержащей соединения Pt и Os. Этот электрод применяют для вольтамперометрического определения этанола. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-6}$  моль/л.

Для вольтамперометрического определения органических соединений широко используются электроды, модифицированные пленками гексацианатов металлов. Так, стеклоуглеродный электрод, модифицированный пленкой гексацианорутената рутения, применяется для электрокаталитического определения этанола в кислой среде; каталитическая активность обусловлена тем, что на поверхности электрода образуется неорганическая пленка, содержащая  $\text{Ru}^{4+}$  и  $\text{Ru}^{6+}$ . При регистрации вольтамперограмм на таком электроде пики окисления модификатора возрастают с ростом концентрации этанола.

В качестве медиаторов электрохимического окисления органических соединений (допамина, аскорбиновой кислоты, гидрохинона, глутатиона, цистеина) хорошо зарекомендовали себя гексацианоферраты металлов (табл. 4.5). В комбинации с ферментами электроды, модифицированные гексацианоферратами, используются для изготовления сенсоров на глюкозу и глутамат. Электрод, модифицированный гексацианоферратом кобальта, применяется для определения глутатиона. В условиях жидкостной хроматографии он позволяет обнаружить глутатион на уровне  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Стабильную электроактивную пленку гексацианоферрата кобальта получают электроосаждением соответствующих комплексов на поверхности стеклоуглеродного электрода. Такой электрод проявляет высокую каталитическую активность при анодном окислении допамина в 0,1 моль/л  $\text{KNO}_3$  в присутствии фосфатного буфера (рН 7). Гексацианоферрат марганца, осажденный на графитовый порошок, диспергированный в метилтриметоксисилановый гель, применяют для изготовления композитного электрода для определения L-цистеина.

В последнее время в качестве медиаторов при определении органических и неорганических соединений все шире используются пленки из смешанных гексацианоферратов. В частности, пленки из гексацианоферрата Cu-Co проявляют высокую каталитическую активность при окислении гидроксилamina. Благодаря устойчивости

**Таблица 4.5. Модифицированные гексацианатами металлов стеклоуглеродные электроды для вольтамперометрического определения органических соединений**

Определяемое вещество	Модификатор – M' <sub>n</sub> [M''(CN) <sub>6</sub> ]	C <sub>min</sub> , моль/л	Лит-ра*
Аскорбиновая кислота	M' = Ni, M'' = Fe	2·10 <sup>-6</sup>	[1]
	M' = Co, M'' = Fe	3,3·10 <sup>-5</sup>	[2]
Морфин	M' = Co, M'' = Fe	5·10 <sup>-7</sup>	[3]
Тиопурин	M' = Ni, M'' = Fe	5·10 <sup>-7</sup>	[4]
Глутатион	M' = Cu, M'' = Fe	3,3·10 <sup>-5</sup>	[5]
	M' = Co, M'' = Fe	2,5·10 <sup>-6</sup>	[6]
Глюкоза	M' = Cu, M'' = Fe	1·10 <sup>-4</sup>	[7]
Изопреналин	M' = Co, M'' = Fe	8·10 <sup>-5</sup>	[8]
Метанол, N-нитрозо- дифениламин	Нафион/M' <sub>n</sub> [M''(CN) <sub>6</sub> ],	1 мкмоль,	[9]
	M' = Ru, M'' = Ru	1 нмоль	
Алифатические спирты	M' = Ru, M'' = Ru	–	[10]
Метанол	WO <sub>3</sub> /Ru-Ru/Pt;	–	[11]
	M' = Ru, M'' = Ru		[12]
Этанол	Ru–M (M = Cr, Ni, Cu, Ru)	–	[13]
	M' = Ru, M'' = Ru		[14, 15]
Альдегиды	M' = Ru, M'' = Ru	1 нмоль	[16]
Цистеин, тиоционат	M' = Ru, M'' = Ru	–	[17]
Инсулин	M' = Ru, M'' = Ru	1 нг/мл	[18, 19]
N-Нитрозоамины	M' = Ru, M'' = Ru	–	[20, 21]

\* [1] *Pournaghi–Azar M. H., Razmi–Nerbin H.* // J. Electroanal. Chem. 2000. Vol. 488. P. 17. [2] *Shankaran D. R., Narayanan S. S.* // Fresenius J. Anal. Chem. 1999. Vol. 364. P. 686. [3] *Xu Fang, Gao Mengnan, Wang Lin et al.* // Talanta. 2002. Vol. 58. P. 427. [4] *Zhang S., Huang F., Cao X. et al.* // Analyst. 2002. Vol. 127. P. 485. [5] *Shankaran D., Narayanan S. S.* // Bull. Chem. Soc. Jap. 2002. Vol. 75. P. 501. [6] *Shi G., Lu J., Xu F. et al.* // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 391. P. 307. [7] *Wang J., Zhang X., Prakash M.* // Ibid. 1999. Vol. 395. P. 1. [8] *Bonifacio V. G., Marcolino L. H., Teixeira M. F. S., Fatibello–Filho O.* // Microchem. J. 2004. Vol. 78. P. 55. [9] *Cox J. A., Alber K. S., Brockway C. A. et al.* // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 993. [10] *Cataldi T. R., Centonze D., Guerrieri A.* // Ibid. P. 101. [11] *Kulesza P. J., Grzybowska B., Malik M. A. et al.* // J. Electroanal. Chem. 2001. Vol. 512. P. 110. [12] *Kulesza P. J.* // Ibid. 1987. Vol. 220. P. 295. [13] *Kumar A. S., Zen J.–M.* // Electroanalysis. 2004. Vol. 16. P. 1211. [14] *Cataldi T. R. I., Centonze D., Desimoni E.* // Food Chem. 1996. Vol. 55. P. 17. [15] *Cataldi T. R. I., Centonze D., Desimoni E., Forastiero V.* // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 310. P. 257. [16] *Cataldi T. R. I., Campa C., Centonze D.* // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 3740. [17] *Cox J. A., Grey T. J.* // Ibid. 1990. Vol. 62. P. 2742. [18] *Cox J. A., Grey T. J.* // Ibid. 1989. Vol. 61. P. 2462. [19] *Kennedy R. T., Huang L., Atkinson M. A., Dush P.* // Ibid. 1993. Vol. 65. P. 1882. [20] *Gorski W., Cox J. A.* // Ibid. 1994. Vol. 66. P. 2771. [21] *Gorski W., Cox J. A.* // J. Electroanal. Chem. 1995. Vol. 389. P. 123.



таких пленок в нейтральных и щелочных средах появилась возможность определения гидроксиламина в широкой области pH. Использование модифицированного электрода позволяет снизить перенапряжение окисления гидроксиламина на 400 мВ. Зависимость сигнала-отклика электрода от концентрации субстрата линейна в диапазоне от  $4,6 \cdot 10^{-6}$  до  $1,8 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Предел обнаружения –  $2,1 \cdot 10^{-7}$  моль/л. Определению не мешают  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , а также глюкоза, фруктоза, щавелевая кислота, L-тирозин, L-аргенин, L-глутаминовая кислота.

Следует заметить, что физико-химические свойства неорганических пленок на основе гексацианатов металлов достаточно хорошо изучены. Проводятся интенсивные исследования по их использованию в вольтамперометрии и в качестве электрохимических детекторов в проточных методах анализа. Однако несмотря на многообразие модифицированных электродов, используемых для окисления и восстановления органических соединений, проблема выбора лучшей медиаторной системы для их определения остается нерешенной. Поэтому продолжается поиск новых материалов, способов изготовления на их основе электродов, которые с одной стороны обладали бы высокой каталитической активностью, а с другой – стабильностью отклика.

#### **4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Более половины публикаций, посвященных модифицированным электродам, относится к определению биологически активных веществ. Это обусловлено не только важностью проблемы их контроля в биологии, медицине и фармацевтике, но и тем, что с помощью модифицированных электродов можно проводить экспрессную оценку состояния здоровья человека в острых ситуациях или при массовых медицинских обследованиях населения.

Клиническая диагностика – основная область применения модифицированных электродов и биосенсоров на их основе. Как и в других прикладных областях анализа, определяющим фактором развития биосенсоров стал платежеспособный потребитель – медицина, которая постоянно испытывает острый дефицит в простых и экспрессных средствах биохимического контроля. Значительный объем средств, выделяемых в развитых странах на охрану здоровья, предопределил достаточно быстрое распространение биосенсоров, появившихся на рынке медицинского оборудования уже через 14 лет после разработки лабораторного прототипа глюкозного биосенсора. До настоящего времени биосенсоры медицинского назначения составляют большую часть рынка биосенсоров. Они применяются для определения мочевины, молочной и мочевой кислот, аминокислот, фосфатидилхолинов, ряда других важных метаболитов. Биосенсоры находят применение в микробиологиче-

ской промышленности, эколого-аналитическом контроле, биотехнологии, контроле пищевых продуктов, в решении теоретических и прикладных задач химии белков и нуклеиновых кислот, в том числе при расшифровке генома человека и поиске новых противораковых лекарственных препаратов.

Так, только для определения глюкозы предложены десятки ферментных электродов, отличающихся конструкцией и способом получения сигнала (см. разд. 3.2.1). Все они основаны на использовании глюкозооксидазы – катализатора окисления глюкозы. Однако ферментные электроды для определения глюкозы имеют ряд недостатков, например недостаточно стабильный отклик из-за изменения активности фермента во времени. Один из возможных путей решения этой проблемы – создание неферментных электродов для определения глюкозы.

Большинство исследований по непосредственному электроокислению глюкозы выполнено на платиновых или золотых электродах. Для снижения перенапряжения при переносе электрона используются различные способы модифицирования электродной поверхности. Например, осаждение на поверхности платинового электрода губчатой платины повышает чувствительность определений до  $9,6 \text{ мкА} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ . Электроосажденные на стеклоуглеродном электроде наночастицы золота размером от 10 до 30 нм облегчают электроокисление углеводов в щелочных средах. Последние адсорбируются на частицах золота благодаря образованию водородных связей между гидроксидными группами Au–ОН и аналита. Такой электрод дает стабильный и чувствительный отклик на глюкозу с пределом обнаружения  $6 \cdot 10^{-7}$  моль/л. С его помощью с высокой точностью определяют содержание глюкозы в биологических жидкостях методом проточно-инжекционного анализа или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Разработаны электроды на основе биметаллических систем. Модифицирование платинового или золотого электрода другими металлами имеет своей целью улучшение их характеристик. Например, полученный электроосаждением наночастиц меди на поверхность золота электрод характеризуется линейной зависимостью сигнала-отклика ( $E = +0,35 \text{ В}$ ) от концентрации глюкозы в диапазоне четырех порядков с пределом обнаружения 0,8 пмоль. Введение биметаллического катализатора в электропроводящие матрицы, в качестве которых используются полипиррол, полианилин или политиофен, также повышает чувствительность определения глюкозы. Так, осаждение Ru, Pb, Sn, Bi на частицах платины, диспергированных в пленке полипиррола, повышает каталитическую активность электрода при электроокислении глюкозы в нейтральной среде.

Для определения инсулина применяют графитовые электроды, модифицированные Ru или Ir. В частности, для обнаружения инсу-

лина при физиологических исследованиях используется электрод из углеродного волокна, модифицированный пленкой  $\text{RuO}_x$ . Такой электрод служит в качестве детектора при определении инсулина в проточных методах; наклон градуировочного графика составляет 72 пА/мкмоль с коэффициентом корреляции 0,999 (для диапазона концентраций от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л) и пределом обнаружения 23 нмоль. Отклик электрода стабилен в течение трех дней.

В клинической диагностике важной задачей является определение количественного состава аминокислот в биологических жидкостях, пищевых продуктах и лекарственных препаратах, поскольку нарушения в соотношении аминокислот в организме человека приводят к возникновению различных заболеваний. Описан метод проточно-инжекционного определения аминокислот и пептидов (метионина, гистидина, глицина и др.) на угольно-пастовом электроде, модифицированном  $\text{RuO}_2$ . Измерения проводят в щелочной среде при потенциале +0,45 В относительно хлоридсеребряного электрода. Предел обнаружения –  $n \cdot 10^{-5}$  моль/л. Селективность определения аминокислот (аланина, серина, аргинина) можно повысить, если использовать электроды, модифицированные электропроводящими полимерами.

При сопоставлении электрохимического поведения цистеина, цистина и метионина на графитовых электродах, модифицированных рутением и диоксидом рутения, установлено, что  $\text{RuO}_2$  более предпочтителен как катализатор. На таком электроде перенапряжение переноса заряда снижается на 300–800 мВ. При этом наблюдается многократное увеличение токов окисления аминокислот. Максимальный каталитический эффект проявляется в щелочных средах. Зависимость тока окисления аналита от концентрации линейна в диапазоне  $5 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л для цистеина,  $5 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л для метионина и  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л для цистина. Этот электрод применяется и для амперометрического детектирования серосодержащих аминокислот в условиях проточно-инжекционного анализа.

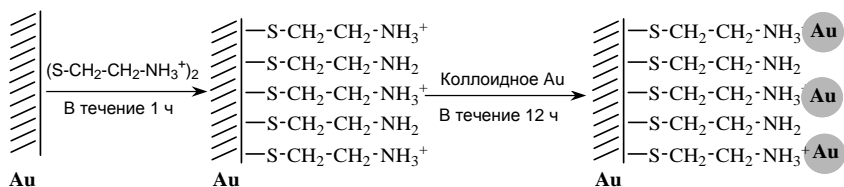
Другой важный объект анализа биологически активных соединений – нейромедиаторы. На графитовых электродах допамин, адреналин, аскорбиновая и мочевая кислоты окисляются практически при одних и тех же потенциалах с перекрыванием соответствующих пиков. Предложены различные электроды, позволяющие определять допамин, адреналин, норадреналин и серотонин селективно. Основная проблема вольтамперометрического определения катехоламинов – низкая концентрация ( $\sim 1 \cdot 10^{-7}$  моль/л) на фоне высоких концентраций мочевой и аскорбиновой кислот ( $\sim 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л).

В качестве модификаторов при определении нейропереносчиков чаще всего используются проводящие полимеры. Перенос электронов катализируется поли-3-метилтиофеном, полифениле-

ном, полианилином, полипирролом и др. Кроме того, исключается проблема отравления катализатора. Наилучшие каталитические свойства имеет политиофен. Для определения допамина или адреналина в присутствии аскорбиновой кислоты применяются производные политиофена, поли-*n*-аминобензола, поли-*o*-фенилендиамина, поли-4-метоксифенола. Модифицированные полимерами электроды используются также в качестве амперометрических детекторов в проточно-инжекционном анализе и в высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Амперометрический отклик на допамин позволяет оценить влияние нейрохимических изменений в мозге животных и человека на их поведение. Эта проблема является предметом изучения новой междисциплинарной области знаний, которую называют *нейроаналитической электрохимией*. Для определения допамина в режиме *in vivo* электрод должен иметь быстрый, чувствительный и селективный отклик, а также миниатюрные размеры. Обычно используется углеродное волокно диаметром 5 мкм и длиной ~ 100 мкм, поверхность которого модифицируют электропроводящими полимерами.

Для повышения чувствительности и селективности определений допамина и адреналина предложены электроды, модифицированные наноразмерными частицами металлов, позволяющими снизить перенапряжение окисления органических соединений, что способствует разделению анодных пиков. Так, определение допамина в присутствии аскорбиновой кислоты стало возможным благодаря золотому электроду, покрытому монослоем наночастиц золота. Такой электрод получают при образовании на его поверхности самоорганизующегося монослоя органических молекул с концевыми аминогруппами, которые взаимодействуют с наночастицами Au:



Благодаря высокой каталитической активности наночастиц Au потенциал окисления аскорбиновой кислоты смещается к менее положительным значениям и повышается обратимость электродной реакции. Наблюдаемое различие в потенциалах окисления допамина и аскорбиновой кислоты (~ 200 мВ) позволяет детектировать допамин при совместном присутствии. Предел обнаружения – 0,13 мкмоль.

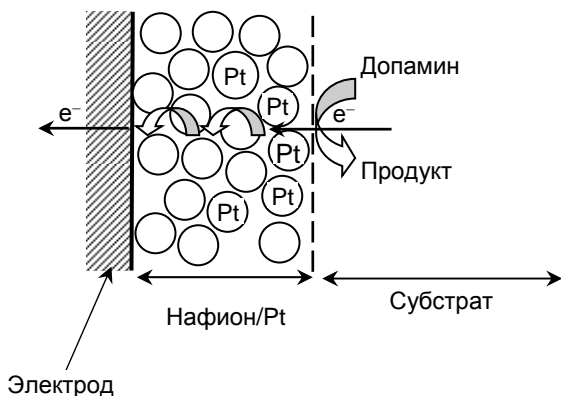
Электрод на основе стеклоуглерода, модифицированного наночастицами Au, применяется для определения адреналина в при-

сутствии аскорбиновой кислоты. Такой электрод проявляет высокую каталитическую активность. Разность потенциалов пиков окисления адреналина и аскорбиновой кислоты составляет около 180 мВ, что позволяет определять эти вещества при совместном присутствии. Зависимость величины отклика от концентрации адреналина линейна в диапазоне  $5 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л (рН 7,0). На основе электродов с иммобилизованными на стеклоуглероде наночастицами Au и ДНК разработаны биосенсоры, позволяющие определять допамин, серотонин и мочевую кислоту.

Селективное определение допамина в присутствии аскорбиновой и мочевой кислот возможно на электроде, модифицированном композитом из благородных металлов (Au–Ir) в пленке нафiona. На электродах Au/нафion/стеклоуглерод и Ir/нафion/стеклоуглерод чувствительность определения допамина повышается не только благодаря медиаторным свойствам металла, но и путем концентрирования катионной формы субстрата в матрице полимера. Аскорбиновая и мочевая кислоты, присутствующие в депротонированной форме, электростатически отталкиваются от катионообменной пленки полимера и не мешают определению допамина. Линейная зависимость величины тока от концентрации допамина наблюдается в диапазоне  $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Сочетание двух процессов на поверхности электрода – накопления аналита в полимерной матрице и электрокатализа – приводит к росту тока по сравнению с электродами Au/стеклоуглерод, Ir/стеклоуглерод и нафion/стеклоуглерод. Такие электроды применяются также в качестве амперометрических детекторов в условиях ПИА.

При окислении допамина и аскорбиновой кислоты на электродах, модифицированных электропроводящей пленкой политиофена и наночастицами Au, наряду с каталитическим эффектом наблюдается синергетический эффект. Включение наночастиц Au в пленку политиофена приводит к заметному увеличению пика окисления допамина по сравнению с пиком окисления аскорбиновой кислоты. Предел обнаружения допамина – 2 нмоль в присутствии 1 ммоль аскорбиновой кислоты. Селективность определений повышается при включении в пленку нафiona частиц Pt. Кластеры наноструктурированной Pt в пленке нафiona представляют собой набор нанокристаллитов, имеющих более высокую каталитическую активность по сравнению с осадком металла на графитовой подложке.

В общем виде схема электрокаталитического окисления допамина в присутствии мочевой и аскорбиновой кислот представлена на рис. 4.1. Зависимость тока окисления допамина на стеклоуглеродном электроде, модифицированном пленкой нафiona с включениями наночастиц Pt, от концентрации линейна в диапазоне  $1 \cdot 10^{-8}$  ÷  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л с пределом обнаружения  $8 \cdot 10^{-9}$  моль/л. На таком электроде допамин можно определять совместно с серотином.



**Рис. 4.1.** Электрокаталитическое окисление допамина на модифицированном стеклоуглеродном электроде

Пики окисления допамина и аскорбиновой кислоты хорошо разделяются также на электроде, модифицированном оксидной пленкой  $\text{RuO}_x$ . Селективное определение допамина возможно при включении оксида рутения в пленку нафiona. Предел обнаружения 0,1 мкмоль достигается за счет каталитической активности медиатора, ионообменных свойств пленки нафiona и концентрирования аналита на электроде в течение 60 с.

Модифицированные электроды с иммобилизованными биметаллическими катализаторами применяются в многокомпонентном анализе. Так, для определения допамина и аскорбиновой кислоты в кислой среде используются бинарные системы на основе палладия: Pd–Rh, Ir–Pd и Au–Pd. На таких электродах аскорбиновая кислота и допамин окисляются обратимо с образованием пиков с разностью потенциалов 200–250 мВ. Совместное определение аскорбиновой и мочевой кислот или допамина и мочевой кислоты в нейтральной среде проводят на электродах, модифицированных Au–Os или Au–Ru. В условиях переменноточковой вольтамперометрии на электроде, модифицированном Au–Ru, возможно определение аскорбиновой ( $E = +0,1$  В) и мочевой ( $E = +0,3$  В) кислот, а также допамина ( $E = +0,5$  В) при совместном присутствии. Указанные электроды находят применение в исследованиях биохимических реакций и при выполнении биохимических анализов.

Большое число работ по применению модифицированных электродов в вольтамперометрическом анализе биологически активных веществ посвящено поиску электродов для определения аскорбиновой кислоты – важного соединения, присутствующего в биологических жидкостях, соках, безалкогольных напитках, фармацевтических препаратах и др. Для ее определения используются

электроды с включениями металлов-катализаторов, например золотой электрод, покрытый осадком Pt или Pd. На таком электроде чувствительность определения аскорбиновой кислоты по сравнению с немодифицированными электродами существенно выше. На стеклоуглеродном электроде с иммобилизованными наночастицами золота, ковалентно связанными с поверхностью электрода через сульфгидрильные группы, возможно селективное определение аскорбиновой кислоты в присутствии допамина. Величина тока линейно зависит от ее концентрации в диапазоне  $6,5 \cdot 10^{-6} \div 1,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л с коэффициентом корреляции 0,998 и пределом обнаружения  $2,8 \cdot 10^{-6}$  моль/л.

Развитие методов определения аскорбиновой кислоты на электродах с проводящими полимерными пленками идет в двух направлениях. Во-первых, проводящие полимерные пленки применяют для повышения чувствительности определения аскорбиновой кислоты. Во-вторых, полимерными покрытиями покрывают электроды для предотвращения влияния мешающих компонентов. При определении аскорбиновой кислоты используются электроды, покрытые пленками полипиррола, политиофена и полианилина. Такие электроды отличаются простотой изготовления и высокой каталитической активностью.

Следует заметить, что для электрокатализа необходима высокая электропроводность полимерного слоя, которая зависит от состояния окисленной формы полимера и pH раствора. Как уже отмечалось выше, в случае полианилина только эмеральдин имеет хорошую электропроводность, причем он должен быть в протонированной форме, которая проявляет электропроводящие свойства в кислой среде при pH 2,5–3,0. При более высоких значениях pH эмеральдин не проводит электрический ток, хотя известны примеры электроокисления аскорбиновой кислоты в нейтральных средах на электродах, модифицированных полианилином. В частности, аскорбат-ионы окисляются при pH 7 ( $E = 0,1$  В отн. НКЭ) на стеклоуглеродном электроде, покрытом пленкой полианилинполивинилсульфоната. Предельный ток лимитируется скоростью массопереноса в диапазоне концентраций аскорбиновой кислоты от 5 до 40 мкмоль/л. Ток окисления аскорбиновой кислоты на электроде, покрытом пленкой полианилина-полипиррола или политиофена, от 5 до 15 раз выше, чем на немодифицированном электроде.

При определении аскорбиновой кислоты на стеклоуглеродном и печатном графитовом электродах, модифицированных полианилином, линейная зависимость сигнала-отклика от концентрации наблюдается в диапазоне от 0,4 мкмоль/л до 2 ммоль/л с пределом обнаружения 0,4 мкмоль/л. На микродисковом золотом электроде, модифицированном электрополимеризованным слоем сополимера анилина с 3,4-дигидроксibenзойной кислотой, перенапряжение переноса заряда снижается на 0,2 В. Такой электрод имеет высокую

чувствительность, малое время отклика (менее 2 с), высокую стабильность при длительном использовании в диапазоне измеряемых концентраций от 0,1 до 10 мкмоль/л.

Допированные полианилины проявляют редокс-активность в нейтральных растворах, поэтому они могут использоваться для определения аскорбиновой кислоты. Модифицированные такими пленками электроды проявляют высокую электрокаталитическую активность при окислении аскорбат-ионов с уменьшением перенапряжения на 0,2 В и линейной зависимостью тока от концентрации аскорбиновой кислоты в диапазоне от 2,4 до 6 ммоль/л.

В отличие от полианилина полипиррол проводит электрический ток и проявляет электрохимическую активность в нейтральных средах. Поэтому неудивительно, что аскорбиновая кислота окисляется на электродах, покрытых пленкой полипиррола, с высокими кинетическими характеристиками, что позволяет использовать такие электроды для ее определения. Так, при окислении аскорбиновой кислоты на электроде, модифицированном полипирролом, допированным додецилсульфатом, потенциал окисления снижается на 0,3 В. Этот электрод используется для определения витамина С в мультивитаминных препаратах.

Благодаря хорошему разделению пиков на квадратно-волновой вольтамперограмме, полученной на золотом электроде, модифицированном ультратонкой пленкой допированного додецилсульфатом полипиррола, можно одновременно определять аскорбиновую кислоту, допамин и мочевую кислоту в диапазоне концентраций от 1 мкмоль/л до 0,5 ммоль/л.

Другие примеры применения полимерных пленочных электродов для определения аскорбиновой кислоты в различных объектах представлены в табл. 4.6. Несмотря на улучшение формы и увеличение высоты аналитического сигнала, использование электродов с полимерной пленкой не всегда приводит к понижению предела обнаружения аскорбиновой кислоты. Заметное увеличение чувствительности определений получено на электродах, модифицированных полимерными пленками с включенными частицами платиновых металлов. Так, сигнал-отклик на стеклоуглеродных электродах, покрытых полимерными пленками поливинилпиридина и полианилина с электроосажденными частицами Pd, более высокий, чем на электродах, покрытых только полимерными пленками. Включение Pd в пленку увеличивает его каталитическую активность благодаря высокой дисперсности, а в случае полианилина – вследствие промотирующих свойств самой полимерной пленки. Применение электродов на основе композитов Pd-поливинилпиридин и Pd-полианилин повышает стабильность отклика и понижает предел обнаружения аскорбиновой кислоты по сравнению с немодифицированными электродами на два (до  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л) и четыре (до  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л) порядка соответственно.



**Таблица 4.6. Модифицированные электроды для вольтамперометрического определения биологически активных веществ**

Аналит	Электрод	Модификатор	$C_{\min}$ , моль/л	Лит-ра*
Глюкоза	Pt	Губчатая Pt	$1 \cdot 10^{-4}$	[1]
	Cu	Au (наночастицы)	$6 \cdot 10^{-7}$	[2]
	Au	Cu	$8 \cdot 10^{-12}$ моль	[3]
	УВ	$\text{IrO}_x\text{--PbO}_x$	$5 \cdot 10^{-5}$	[4]
	Pt	Полипиррол/Pb, Sn, Bi, Ru	$1 \cdot 10^{-6}$	[5]
Инсулин	УВ	$\text{RuO}_x$	$2,3 \cdot 10^{-8}$ моль	[6]
	Cu	$\text{IrO}_x$	$1 \cdot 10^{-7}$ моль	[7]
Аскорбиновая кислота	Cu	Au (наночастицы)	$2,8 \cdot 10^{-6}$	[8]
		Полианилин	$2,4 \cdot 10^{-6}$	[9]
		Поливинилпиридин/Pd	$1 \cdot 10^{-6}$	[10]
		Полианилин/Pd	$1 \cdot 10^{-8}$ моль	[11]
	Au	Pd	$(0,25\text{--}1,5) \cdot 10^{-5}$	[12]
		Pt	$7,8 \cdot 10^{-7}$	[13]
		Полипиррол	$(0,01\text{--}5) \cdot 10^{-4}$	[14]
Мочевая кислота	Au	Pd	$(0,19\text{--}1,0) \cdot 10^{-5}$	[15]
Допамин	Au	Au (наночастицы)	$1,3 \cdot 10^{-7}$	[16]
		Политиофен/Au	$2 \cdot 10^{-9}$	[17]
		Нафион/Pt	$8 \cdot 10^{-9}$	[18]
	Cu	$\text{RuO}_x$	$8 \cdot 10^{-4}$	[19]
		Нафион/ $\text{RuO}_2$	$1 \cdot 10^{-7}$	[20]
Адреналин	Cu	Au (наночастицы)	$(0,05\text{--}1) \cdot 10^{-4}$	[21]
		Pd- $\text{IrO}_2$	$5 \cdot 10^{-14}$ моль	[22]
		Поливинилпиридин/Rh	$5 \cdot 10^{-6}$	[23]
Норадреналин	Cu	Au (наночастицы)	$(0,05\text{--}1) \cdot 10^{-4}$	[24]
		Поливинилпиридин/Rh	$5 \cdot 10^{-6}$	[23]
Серотонин	Cu	Нафион/ $\text{RuO}_2$	$2 \cdot 10^{-9}$	[25]
Цистеин	УПЭ	$\text{RuO}_2$	$1 \cdot 10^{-6}$	[26]
Цистин			$1 \cdot 10^{-7}$	[27]
Метионин			$1 \cdot 10^{-5}$	
Гистамин	Cu	Au (наночастицы)	$6 \cdot 10^{-7}$	[28]
Гепарин		$\text{RuO}_2$	$9 \cdot 10^{-9}$	[29]
Кофеин		Нафион/ $\text{RuO}_x$	$2 \cdot 10^{-6}$	[30]

Аналит	Электрод	Модификатор	$C_{\min}$ , моль/л	Лит-ра*
Сульфонамиды	СУ	Полиптофен	$4 \cdot 10^{-6}$ – $6 \cdot 10^{-8}$	[31]
Парацетамол	СУ	Au (наночастицы)	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-3}$	[32]

\*[1] Park S., Chung T. D., Kim H. C. // Anal. Chem. 2003. Vol. 75. P. 3046. [2] Casella I. G., Destradis A., Desimoni E. // Analyst. 1996. Vol. 121. P. 249. [3] Casella I. G., Gatta M., Guascito M. R., Cataldi T. R. I. // Anal. Chim. Acta. 1997. Vol. 357. P. 63. [4] Gorski W., Kennedy R. T. // J. Electroanal. Chem. 1997. Vol. 424. P. 43. [5] Becerik I., Kadirgan F. // Synthetic Metals. 2001. Vol. 124. P. 379. [6] Gorski W., Aspinwall G. A., Lakey J. R. T., Kennedy R. T. // J. Electroanal. Chem. 1997. Vol. 425. P. 191. [7] Pikulski M., Gorski W. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 2696. [8] Zhang L., Jiang X. // J. Electroanal. Chem. 2005. Vol. 583. P. 292. [9] Sun J. J., Zhou D. M., Fang H. Q., Chen H. Y. // Talanta. 1998. Vol. 45. P. 851. [10] Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. прикл. химии. 2003. Т. 76. С. 783. [11] Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. С. 651. [12] Matos R. C., Augelli M. A., Lago C. L., Angnes L. // Anal. Chim. Acta. 2000. Vol. 404. P. 151. [13] Munos R. A. A., Matos R. C., Angnes L. // Talanta. 2001. Vol. 55. P. 855. [14] Gao Z., Huang H. // Chem. Commun. 1998. № 19. P. 2107. [15] Matos R. C., Augelli M. A., Lago C. L., Angnes L. // Anal. Chim. Acta. 2000. Vol. 404. P. 151. [16] Raj C. R. T., Okajima T., Ohsaka T. // J. Electroanal. Chem. 2003. Vol. 543. P. 127. [17] Kumar S. S., Mathiyarasu J., Phani K. // Ibid. 2005. Vol. 578. P. 95. [18] Selvaraju T., Ramaraj R. // Ibid. Vol. 585. P. 290. [19] Shakkthivel P., Chen Sh.-M. // Biosensors Bioelectronics. 2007. Vol. 22. P. 1680. [20] Zen J.-M., Chen I.-L. // Electroanalysis. 1997. Vol. 9. P. 537. [21] Raj C. R. T., Okajima T., Ohsaka T. // J. Electroanal. Chem. 2003. Vol. 543. P. 127. [22] Zhang W., Cao X., Wan F. et al. // Anal. Chim. Acta. 2002. Vol. 472. P. 27. [23] Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59. С. 1138. [24] Lu L., Wang Sh., Lin X. // Anal. Sci. 2004. Vol. 20. P. 1131. [25] Zen J., Chen I.-L., Shih Y. // Anal. Chim. Acta. 1998. Vol. 369. P. 103. [26] Шайдарова Л. Г., Зиганишина С. А., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58. С. 640. [27] Pedrero M., Salas P., Galvez R., Pingarron J. // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. Vol. 371. P. 507. [28] Carralero V., Gonzalez-Cortes A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M. // Electroanalysis. 2005. Vol. 17. P. 289. [29] Lewinski K., Hu Y., Griffin C. C., Cox J. A. // Ibid. 1997. Vol. 9. P. 675. [30] Zen J.-M., Ting Y.-Sh., Shih Y. // Analyst. 1998. Vol. 123. P. 1145. [31] Msagati T. A. M., Ngila J. C. // Talanta. 2002. Vol. 58. P. 605. [32] Goyal R. N., Gupta V. K., Oyama M., Bachheti N. // Electrochem. Commun. 2005. Vol. 7. P. 803.

#### 4.4. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ В ПРОТОЧНЫХ МЕТОДАХ АНАЛИЗА

Исследования, направленные на поиск путей автоматизации химического анализа, повышение селективности и чувствительности определений, нуждаются в сравнении возможностей различных методов детектирования веществ в потоке жидкости. Среди детекторов не последнее место занимают электрохимические, в том числе и вольтамперометрические (амперометрические) детекторы. Оригинальные работы по электрохимическим детекторам, опубли-

кованные на рубеже веков, рассмотрены в ряде обзоров и книг\*. Ниже они обсуждаются в сравнительном плане, т. е. с позиций преимуществ того или иного детектора для контроля зон в высокоэффективной жидкостной хроматографии, проточно-инжекционной анализе и в некоторой степени в капиллярном зонном электрофорезе.

Вопросам использования модифицированных электродов для детектирования в потоке жидкости стали уделять повышенное внимание в последнее время по нескольким причинам. Во-первых, как отмечалось выше, модифицирование электрода обычно рассматривается как способ достижения селективности сигнала по отношению к определяемым соединениям. Решение этой задачи применительно к массовым анализам приводит к сокращению расходов, времени измерений и к автоматизации анализа. Переход к проточным системам – естественный путь решения проблемы. Во-вторых, широкое применение модифицированных электродов в детекторах, функционирующих в потоке жидкости, обусловлено необходимостью адаптации сенсоров, разработанных для стационарных условий измерения сигнала, к функционированию в потоке. Это предполагает увеличение механической прочности чувствительного поверхностного слоя, исключение из конструкции водорастворимых и корродирующих элементов, повышение внимания к вопросам стабильности сигнала-отклика. Кроме того, измерения в потоке выдвигают достаточно жесткие требования к времени отклика и его обратимости, особенно в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного зонного электрофореза. В свою очередь короткое время отклика требует зачастую новых решений при подборе модифицирующих добавок, особенно в случае электрокатализа.

Традиционным способом повышения механической стабильности поверхностного слоя является использование дополнительных поверхностных мембран. Когда речь идет о биологических компонентах проточных биосенсоров, это зачастую единственный способ сохранения характеристик сигнала в потоке и защиты активных компонентов от вымывания. Однако следует помнить, что такая конструкция сенсора влечет негативные последствия, выражающиеся в существенном увеличении его инерционности, снижении сигнала и быстродействия, иногда в ухудшении селективности по отношению к компонентам матрицы. Правильнее решать задачи адаптации модифицированных электродов для использования в потоке комплексно, изменяя архитектуру не только сенсора, но и измерительного блока в целом. Такой подход позволяет учесть

---

\* См., например, Г. К. Будников, В. Н. Майстренко, М. Р. Вяселев. Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 592 с.

гидродинамические условия работы электрода, объем рабочего пространства, распределение анализируемого вещества в потоке или в зоне потока. Зачастую требования к стабильности сигнала заставляют вернуться к требованиям по чувствительности и обратимости отклика.

Влияние потока на конструкцию проточного сенсора, как правило, возрастает с увеличением скорости, давления и эффективности разделения. Так, в условиях проточно-инжекционного и непрерывного проточного анализа обычно можно работать с электродами, разработанными для стационарных условий. В то же время детекторы для ВЭЖХ и капиллярного зонного электрофореза требуют миниатюризации измерительной части, исключения жидкостных соединений (внутреннего раствора сравнения, полужидких гелевых мембран), повышенной механической прочности поверхностных слоев, в том числе к абразивному действию потока и к коррозии.

Важной особенностью функционирования детекторов в потоке является разнообразие гидродинамических условий вблизи поверхности электрода. Они значительно отличаются от условий диффузионного переноса деполяризатора к плоскому или полусферическому стационарному электроду в вольтамперометрии, что приводит к искажению пиков на вольтамперограммах. В свою очередь это обуславливает применение полуэмпирических способов подбора оптимальных условий измерения сигнала – модуляции рабочего напряжения, потенциала, параметров импульсов в нестационарных вольтамперометрических методах. Лишь в сравнительно медленных вариантах проточного анализа при объеме рабочей камеры, значительно превосходящем инжектируемый объем, используются традиционные способы подбора условий измерения – изучение вольтамперных и концентрационных характеристик, влияния температуры, скорости сканирования потенциала в стационарных условиях.

Учитывая более высокие требования к фактору времени и обратимости сигнала, в специализированных проточных детекторах большое внимание уделяется импульсным и переменноточковым вариантам вольтамперометрии, позволяющим не только повысить отношение сигнал/шум, но и достичь постоянной прибора (временного разрешения сигнала) в десятые доли секунды. Следует заметить, что трехэлектродные ячейки более требовательны к организации потока в измерительной камере и их применение целесообразно в тех случаях, когда сигналы компонентов разрешены по потенциалам. При не очень строгих требованиях к точности задания потенциала могут применяться двухэлектродные ячейки с противоэлектродом большой площади, играющим роль псевдоэлектрода сравнения. Например, в детекторах для определения аминокислот в ВЭЖХ в качестве катода используются вставки из нержавеющей

веющей стали, а в качестве рабочего электрода (анода) – медный электрод, покрытый оксидами меди, выполняющими роль медиаторов электронного переноса.

На фоне большого влияния условий массопереноса на величину сигнала-отклика гетерогенные факторы, такие как пассивация поверхности электрода продуктами электролиза, их адсорбция или адсорбция ПАВ, присутствующих в протекающей жидкости, влияют на сигнал детектора в меньшей степени по сравнению с откликом электрода в неподвижной жидкости. Наряду с высокой устойчивостью потока этот факт способствует уменьшению погрешности воспроизводимости сигнала – в ряде случаев менее 1 % в серии из ста и более измерений с одним и тем же электродом, что для твердых электродов в стационарных условиях в целом недостижимо. Тесты на устойчивость и надежность отклика в условиях многократных измерений в потоке одного и того же стандартного раствора деполяризатора обязательны для проточных электрохимических детекторов. Помимо оценки собственно погрешности измерения они призваны установить дрейф сигнала, возможное влияние матричных эффектов и в конечном итоге оценить время жизни электрода в условиях непрерывной эксплуатации.

Другая важная подразумеваемая а priori особенность сигнала-отклика проточного электрохимического детектора, в который проба вводится периодически (варианты ПИА, ВЭЖХ), – его неравновесность. Это, в частности, является причиной того, что при использовании электрокаталитических систем параметры, характеризующие их эффективность (отношение каталитического и некаталитического тока, снижение перенапряжения, зависимость сигнала от способа модуляции напряжения), при измерениях в потоке отличаются от установленных в неподвижной жидкости.

Алгоритм разработки новых или адаптации имеющихся электродов для измерений в потоке жидкости включает в себя комплекс исследований по изучению влияния на амперометрические отклики ряда факторов, среди которых:

- геометрические размеры рабочей ячейки;
- организация системы потока, включая диаметр и материал соединительных трубок, наличие вспомогательных колонок, инжекторов, ввод дополнительных реагентов-derivатизаторов, буферных систем, разбавителей и др.;
- состав потока носителя, его буферных свойств и pH;
- скорость потока, объем инжектируемого раствора, время (периодичность) ввода пробы;
- условия регенерации электрода после ввода пробы и измерения сигнала.

Определенную информацию о факторах, лимитирующих аналитические и операционные характеристики проточных электро-

химических детекторов, может дать сопоставление параметров откликов электродов в стационарных условиях и в потоке. Заметим, что влияние условий массопереноса на сигнал электрода в целом не зависит от конструкции детектора, поскольку они определяют концентрационный профиль деполяризатора лишь в зоне электрода. При оптимизации условий измерений это позволяет использовать результаты, полученные, например, с детекторами по электропроводности или спектрофотометрическими детекторами. Такой прием широко применялся в период, когда электрохимические детекторы выпускались промышленностью в ограниченном количестве и были труднодоступны, а также при разработке альтернативных способов определения содержания электрохимически активных компонентов в пробе. В действительности указанные аналогии имеют ограничения, обусловленные тем, что в отличие от других детекторов при вольтамперометрическом детектировании происходит изменение состава раствора вблизи электрода. Это особенно заметно, когда используется электрод с большим отношением его площади к объему ячейки, например в капиллярных или в тонко-слойных проточных ячейках.

Большинство предложенных проточных химических сенсоров с амперометрическим откликом предназначено для решения медико-биологических задач, т. е. для определения низкомолекулярных метаболитов, лекарственных препаратов, антиоксидантов, биологических добавок и других соединений биологического назначения. Внимание, уделяемое селективности и чувствительности определений, зависит от того, в каких системах планируется применение указанных сенсоров. Если поток выполняет в основном роль носителя, обеспечивая периодическое или непрерывное поступление пробы в измерительную ячейку, то селективность измерений играет не менее важную роль, чем чувствительность детектирования отдельных компонентов пробы. Так функционируют электрохимические детекторы в проточных анализаторах, в которых реализованы принципы проточно-инжекционного, непрерывного проточного, сегментированного проточного анализа и др. В том случае, когда проточная система используется для разделения компонентов пробы (хроматография, капиллярный зонный электрофорез), проблемы селективности сигнала отходят на второй план, а основным параметром является чувствительность детектора к определяемым компонентам. Этим, например, объясняется заведомо избыточное напряжение, устанавливаемое в амперометрических детекторах в аминокислотных анализаторах (~5–8 В). При этом происходит не только окисление отдельных аминокислот, разделяемых предварительно в соответствии с их подвижностью в средах с различной кислотностью, но и предотвращается пассивация электрода продуктами окисления.

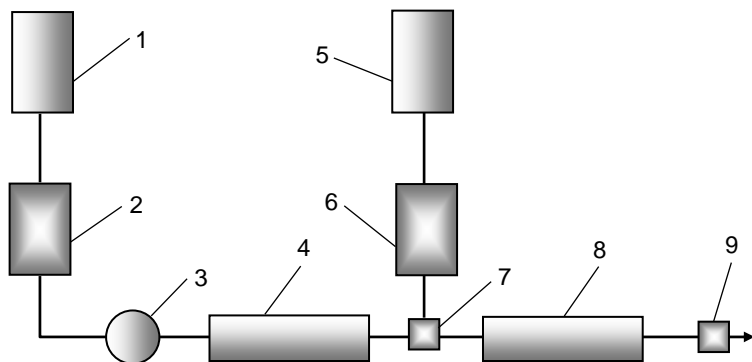
#### 4.4.1. Модифицированные электроды в высокоэффективной жидкостной хроматографии

В последние 10–15 лет основной поток информации в области проточных электрохимических сенсоров тем или иным образом связан с детекторами для высокоэффективной жидкостной хроматографии органических соединений. Перед тем как рассмотреть роль различных материалов в модифицировании электродов и в расширении круга определяемых веществ, совершим небольшой исторический экскурс в область детектирования в потоке жидкости и сопоставим характеристики электрохимических детекторов с другими детекторами, дающими отклик на органический субстрат не на принципах электрохимии.

Идея детектирования электрохимически активных органических веществ в жидкостной хроматографии была сформулирована в конце 1940-х годов. Вначале она выглядела достаточно очевидной, поскольку многие органические вещества способны восстанавливаться на РКЭ в условиях полярографии. Впервые классическую полярографию в жидкостной хроматографии применил Кемуля для детектирования изомеров нитроанилина при потенциале восстановления нитрогруппы. Роль хроматографа выполняла полоска хроматографической бумаги, с которой элюат по каплям поступал в полярографическую ячейку, содержащую буферный раствор. Однако даже в начале 1970-х годов электрохимическое детектирование в ВЭЖХ представлялось большинству исследователей скорее как любопытная и редкая по исполнению аналитическая технология. Только в 1990-х годах электрохимическое детектирование в ВЭЖХ стало рутинным методом.

Причина широкого распространения электрохимических детекторов – изобретение тонкослойной электрохимической ячейки и появление широкого набора электродов различной природы и формы, в том числе модифицированных, с повышенной надежностью, высокой селективностью и чувствительностью определений органических соединений и/или классов веществ. Помимо собственно вольтамперометрических систем, использующих потенциостатическую или импульсную технику, сканирование потенциала, к электрохимическим устройствам относятся также кондуктометрический детектор, основной в ионной хроматографии, и кулонометрический детектор, измеряющий общее количество электричества, расходующееся на полное окисление (восстановление) определяемого вещества. Далее более подробно рассмотрены амперометрические системы, в которых модифицированные электроды получили наибольшее распространение.

Наиболее удачным по конструкции среди электрохимических детекторов оказался амперометрический детектор, предложенный Киссинджером в 1970-х годах для определения катехоламинов. Его



**Рис. 4.2.** Схема установки для послеколоночной дериватизации в ВЭЖХ

1 – сосуд с элюентом; 2, 6 – насосы; 3 – узел ввода пробы; 4 – колонка;  
5 – сосуд с реагентом; 7 – камера смешения; 8 – реактор; 9 – детектор

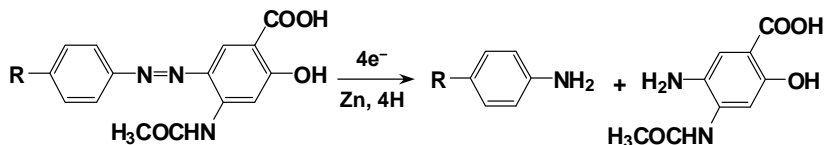
появление способствовало широкому распространению амперометрических детекторов в ВЭЖХ при определении легкоокисляющихся органических веществ в биомедицинской и пищевой химии. Преобладающее использование анодных процессов обусловлено отсутствием необходимости дегазации проточной системы и удаления растворенного кислорода, что значительно упрощает аппаратное оформление метода, а также большим разнообразием реакций окислительного превращения определяемых соединений.

Амперометрические детекторы в ВЭЖХ применяются в основном для определения нитросоединений, аминов, фенолов, гидразинов, некоторых гетероциклов, amino- и гидроксикислот. Основные классы органических соединений, особенно алифатического ряда, не проявляют электрохимической активности и не регистрируются на электроде в обычных условиях. То же относится к полиароматическим соединениям, хлорорганическим пестицидам и некоторым другим распространенным объектам медико-биологического и эколого-аналитического контроля. В то же время они могут быть детектированы с использованием методов дериватизации – получения электрохимически активных производных с помощью пред- и послеколоночных реакторов (рис. 4.2). Получение производных с использованием хорошо изученных органических реакций ацилирования, дансирования и т. п. преследует две цели – увеличение чувствительности детектора за счет введения в определяемые соединения электрохимически активных групп и повышение избирательности отклика за счет селективных (специфических) реакций, упрощающих анализ матриц сложного состава, особенно биологических.

Так, аналитические характеристики определения L-тироксина методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием суще-



ственно улучшаются после взаимодействия аналита с *o*-фталальдегид-N-ацетилцистеином. При определении 4'-замещенных 3-кар-боксит-4-гидроксит-6-ацетиламиноазобензолов (азокрасителей) в состав соединений вводят группы, способные окисляться на электроде, для чего проводят восстановление цинковой пылью:



Универсальным способом дериватизации является введение в молекулы определяемых соединений электрохимически активных ферроценовых фрагментов. При определении спермина, спермидина и других биологически активных полиаминов в моче человека проводят послеколоночную ферментативную реакцию с использованием иммобилизованной полиаминоксидазы из *Aspergillus terreus*. Заметим, что дериватизация упрощает определение органических компонентов в биохимических пробах и с помощью спектрофотометрических детекторов.

Перспективным способом расширения возможностей ВЭЖХ с электрохимическим детектированием является послеколоночная фотохимическая дериватизация определяемых веществ. Так, при экспертизе экстрактов сыворотки крови на содержание барбитуратов (фенобарбитал, тиопентал) фотодериватизация позволяет в десятки раз увеличить величину сигнала электрохимического детектора. Амперометрическое детектирование органических комплексообразователей используется для определения ионов металлов методом ион-парной ВЭЖХ.

Другой способ регулирования селективности и расширения возможностей электрохимических детекторов – использование каталитически активных электродных материалов. В этом случае электрод выступает не только как инертный материал, на котором происходит обмен электронами (например, при окислении вещества), но сам является участником электрохимической реакции. Для этих целей применяют металлические электроды, способные образовывать на поверхности наноразмерные слои оксидов (гидроксидов) с различными электрокаталитическими свойствами. Вольтамперометрический сигнал для различных веществ одного класса регистрируется при одном и том же значении потенциала, но величина отклика зависит от потенциала, необходимого для перевода электрода в каталитически активное состояние.

Материал электрода по возможности должен соответствовать требованиям, необходимым для его использования в ВЭЖХ. К ним относятся механическая устойчивость и химическая стабильность, легкость изготовления в условиях лаборатории, достаточная про-

**Таблица 4.7. Примеры применения импульсных (И) и потенциостатических (П) электрохимических детекторов в ВЭЖХ**

Определяемое соединение	Материал электрода (метод)
Углеводы	Au (И)
Углеводы в ферментационных растворах	Au (И)
Глюкоолигосахариды и гидролизат полисахаридов	Au (И)
Углеводы во фруктовых соках	Au (И)
Гликопротеины олигосахаридов	Au (И)
Спирты	Pt, Au (И)
Алколамины	Au (И)
Аминокислоты	Au (П)
Алифатические амины	Au (И)
Биогенные тиолы и дисульфиды	Au (П)
Этилентиомочевина в пиве	Au (И)
Серосодержащие пестициды	Au (И)

должительность функционирования с воспроизводимыми свойствами. Для изготовления электродов для проточных электрохимических детекторов используются различные материалы, но наибольшее применение нашел стеклогуглеродный электрод. Кроме него применяются металлические электроды из золота (определение сахаров и спиртов), платины (пероксид водорода, гидразин, сульфиты), серебра (галогениды), меди (аминокислоты), ртути (электровосстановление тиосульфат-ионов, окисление меркаптанов), амальгамы золота (электровосстановление нитрозамещенных органических соединений).

Широкое применение электродов из Pt и Au (табл. 4.7) во многом обусловлено их способностью катализировать окисление органических веществ в щелочных средах. Считается, что одной из причин, вызывающих каталитический эффект, является образование монослоя сорбированных гидроксидных радикалов, выполняющих функцию модификатора и участвующих в окислении определяемых соединений. При более положительных потенциалах на поверхности электродов формируются устойчивые оксидные пленки. Недостатком таких электродов является их чувствительность к присутствующим в растворе каталитическим ядам, а также ПАВ и другим хорошо сорбирующимся веществам. Многие органические соединения и продукты их окисления вызывают частичную пассивацию электродов, снижая их отклик и ухудшая метрологические характеристики.

Один из наиболее широко применяемых металлоксидных электродов – никелевый электрод, являющийся медиатором окисления различных алифатических соединений благодаря присутствию на его поверхности в щелочных средах слоев оксидов и гидроксидов  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{3+}$ . Соединения  $\text{Ni}^{3+}$ , образующиеся на поверхности электрода, окисляют определяемые вещества, восстанавливаясь при этом до соединений  $\text{Ni}^{2+}$ , которые вступают в очередной каталитический цикл, генерируя ток окисления. На этом электроде в щелочных средах при невысоких потенциалах окисляются углеводы и другие органические вещества.

Медный электрод в щелочных средах применяется для детектирования тех же классов органических веществ, что и никелевый электрод. Считается, что медь является медиатором окисления органических соединений благодаря образованию на ее поверхности слоев оксидов и гидроксидов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ . Однако имеющиеся экспериментальные факты указывают на отсутствие прямых аналогий между процессами окисления веществ на никелевом и медном электродах. Для объяснения процессов окисления веществ на УПЭ, содержащем оксиды меди, предложен другой механизм. Он предполагает образование на поверхности электрода сорбированных гидроксидных радикалов, окисляющих углеводы.

Полагают, что для большинства металлических электродов механизм окисления органических веществ не сводится только к простому медиаторному процессу с участием оксидов переменной валентности. По-видимому, он включает в себя более сложные каталитические стадии, которые требуют дальнейших исследований. Изучение продуктов электрохимических реакций позволило установить, что первичные спирты окисляются до карбоновых кислот, а вторичные – до кетонов, в то время как гликоли, глюкоспирты и глюконокислоты претерпевают окислительные превращения с образованием муравьиной, щавелевой кислот и диоксида углерода. Примеры применения металлоксидных электродов в высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием приведены в табл. 4.8.

Исследования показали, что одна из главных проблем электрохимических детекторов заключается в изменении свойств поверхности электрода из-за необратимой адсорбции органических веществ и/или продуктов их окисления. Это приводит к увеличению пределов обнаружения в ходе нескольких последовательных операций ввода пробы порой на 3–4 порядка, ухудшаются воспроизводимость и другие характеристики детекторов. Заметим, что такая проблема в принципе не характерна для других систем детектирования, в том числе для сопоставимого по селективности и чувствительности флуоресцентного детектора.

Сопоставление результатов определения аспартата и глутамата (маркеров при изучении повреждений мозга и клеточного метабо-

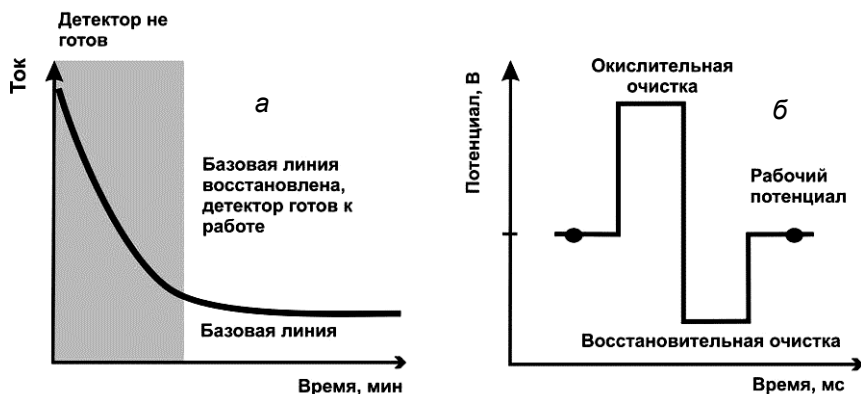
**Таблица 4.8. Примеры применения металлоксидных электродов в ВЭЖХ с электрохимическим детектированием**

Определяемое вещество	Материал электрода
Продукты ферментации сахаров, спирты	Ni
Спирты	Ni/стеклоуглерод
Углеводы	Ni, Cu, Rh, Co, Ag, Ir, Pd, Fe, Cu, сплавы Ni-Cu, Ni-Cr-Fe, Co/стеклоуглерод, Cu <sub>2</sub> O/эпоксиграфит
Аминокислоты, пептиды	Cu
Полипептиды, белки	Cu
Аминокислоты	Ni

лизма) в диализате мозга крыс после предколоночной дериватизации методами ВЭЖХ с флуоресцентным и электрохимическим детекторами свидетельствует о корреляции данных измерений, полученных с разными системами детектирования. Предел обнаружения для флуоресцентного детектора составляет 20–30 фмоль, а для электрохимического – 0,4 пмоль. Однако для получения воспроизводимых результатов при электрохимическом детектировании необходимы вторичная дериватизация определяемых веществ и регулярная переградуировка после 6–10 вводов пробы.

Очистку и обновление поверхности рабочих электродов после каждого ввода пробы выполняют различными способами. Наибольшее распространение получил способ *импульсного амперометрического детектирования*. Он заключается в наложении на электрод ступенчато изменяющегося потенциала, при котором попеременно происходит окислительная и восстановительная деструкция адсорбированных на электроде веществ (рис. 4.3, б). Эта операция выполняется перед вводом пробы и даже в процессе элюирования компонентов смеси. Критерием, определяющим необходимость выполнения такой операции, служит величина остаточного тока детектора (рис. 4.3, а). При анализе растворов сложного состава для очистки ячейки и электродов через детектор периодически пропускают кислоты или специальные моющие смеси. В другом способе для очистки и регенерации электродов применяют циклическое изменение потенциала с нарастающими по величине импульсами – так называемое *интегрированное вольтамперометрическое детектирование*.

Не вдаваясь в подробности организации потока в проточных системах, рассмотрим некоторые наиболее распространенные варианты электрохимических ячеек. Они различаются как концентрационными профилями деполяризатора вблизи электрода, так и скоростью обновления раствора, т. е. характеристиками, определя-

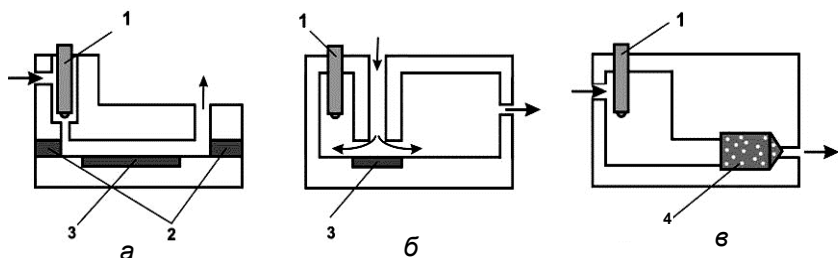


**Рис. 4.3.** Процедуры проверки готовности импульсного амперометрического детектора к вводу пробы (а) и электрохимической регенерации рабочего электрода (б)

ющими величину сигнала и скорость регенерации электрода после прохождения зоны определяемого вещества. Их можно отнести к одному из трех принципиально различающихся типов: тонкопленочным, «стенка – сопло» и «поток сквозь пористый электрод» (рис. 4.4). Последняя конструкция имеет существенные отличия от двух предыдущих. Она применяется в кулонометрических детекторах, когда требуется близкая к 100 % эффективность электрохимической реакции по току (100 % выход по току) и развитая поверхность рабочего электрода.

При амперометрическом детектировании степень превращения определяемого вещества невелика и аналитические характеристики детектора обеспечиваются тонкопленочными ячейками или ячейками типа «стенка – сопло». В обоих случаях рабочее пространство, в котором расположены торцы электродов (двух или трех), ограничено узкой щелью, что обеспечивает малый расход элюента. Амперометрические детекторы имеют более низкие пределы обнаружения по сравнению с кулонометрическими. По этой причине они преобладают в ВЭЖХ. Следует заметить, что грань между ними достаточно условна и различие определяется лишь степенью превращения определяемого вещества в ходе электрохимического процесса. Существуют и другие конструкции проточных электрохимических ячеек.

Большинство электрохимических детекторов в ВЭЖХ имеют ячейки с объемом, близким к 1 мкл, поэтому они легко адаптируются к микроколонной ВЭЖХ. Некоторые из ячеек совместимы с ПИА, хотя в последнем случае требования к рабочему объему и условиям конвективного переноса, несомненно, мягче. Предел обнаружения определяемого вещества в значительной степени зави-



**Рис. 4.4.** Конструкции проточных электрохимических ячеек: *а* – тонкопленочная; *б* – «стенка-сопло»; *в* – «поток сквозь пористый электрод»  
 1 – электрод сравнения; 2 – вспомогательный электрод; 3 – рабочий электрод; 4 – пористый рабочий электрод

сит от системы детектирования, конструкции рабочего электрода и природы модифицирующего слоя.

В табл. 4.9 приведены сравнительные характеристики детекторов, применяемых в ВЭЖХ. Во многом это сопоставление условно, поскольку разные соединения требуют различных условий детектирования в силу особенностей строения и природы функциональных групп. Наиболее универсален масс-селективный детектор, обеспечивающий не только низкие пределы обнаружения, но и зачастую расшифровку структуры соединения. Однако несмотря на универсальность масс-селективного детектора он пока еще не может претендовать на широкое применение из-за высокой стоимости, сложности аппаратного воплощения и требований высококвалифицированного обслуживания. Все вышесказанное относится и ко второму по чувствительности детектору – флуоресцентному, а также к диодно-матричному. Следует отметить, что они уступают масс-селективному детектору в универсальности. В рассматриваемом ряду электрохимические детекторы представляют достаточно удачное решение, в первую очередь по соотношению качество/цена, для определения окисляющихся органических соединений. В ряде случаев они позволяют достичь чувствительности определений, сопоставимой с наиболее чувствительными системами детектирования. Так, при определении смеси фенолов в природных водах методом ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектором на основе стеклоуглеродного электрода предел обнаружения при прямом вводе составляет 0,9–6 мкг/мл, а с диодно-матричным детектором – 0,5 мкг/мл и выше. Кулонометрический детектор с матрицей из 8 электродов при определении ряда фитоэстрогенов в сое и продуктах ее переработки обеспечивает пределы обнаружения на уровне 0,9–1,6 мкг/мл.

Следует помнить, что на предел обнаружения и аналитические характеристики при электрохимическом детектировании оказыва-

**Таблица 4. 9. Сравнительная характеристика методов детектирования органических веществ в ВЭЖХ**

Детектор	Предел обнаружения, моль/л	Селективность	Характеристики детектора
Спектрофотометрический	$10^{-5}$ – $10^{-7}$	Низкая	Низкая стоимость, универсальность
Диодно-матричный	$10^{-5}$ – $10^{-8}$	Высокая	Возможность получения спектральной информации, в том числе о чистоте анализа
Флуоресцентный	$10^{-7}$ – $10^{-10}$	Высокая	Высокая чувствительность
Масс-селективный	$10^{-10}$	Очень высокая	Возможность получения структурной информации
Электрохимический	$10^{-8}$ – $10^{-10}$	Высокая	Селективен для электроактивных веществ
Рефрактометрический	$10^{-5}$	Низкая	Универсальность

ют влияние и другие факторы, такие как присутствие кислорода и воды в подвижной фазе, градиент температуры, размывание хроматографических пиков и т. д. С учетом этих факторов нижняя граница определяемых содержаний примерно в пять раз выше предела обнаружения. Для наиболее распространенных спектрофотометрических детекторов она составляет 500 пг, в то время как предел обнаружения – 100 пг. Электрохимические детекторы также позволяют определять пикограммовые содержания веществ, отличаясь в то же время высокой селективностью. Дополнительные преимущества дает сочетание нескольких систем детектирования (комбинированные детекторы). Так, при использовании УФ- и электрохимического детекторов с помощью ВЭЖХ можно контролировать процессы разложения взрывчатых веществ, содержащих нитро-группы (ди- и тринитротолуолы, пикриновая кислота, нитрамины – гексоген, октоген, тетрил и др.), в объектах окружающей среды. Амперометрическое детектирование более предпочтительно при определении ароматических аминов и фенолов – производных взрывчатых веществ, тогда как УФ-детектирование обеспечивает большую информативность при определениях нитроароматических соединений.

Для контроля эстрогенов в крови беременных женщин методом ВЭЖХ также применяют УФ- (определение эстриол-3-сульфата) и электрохимический (определение эстриола) детекторы. При определении пестицида дифлубензурина – [1-(4-хлорфенил)-3-(2,6-дифторбензоил)мочевина] – и шести его метаболитов в растительных объектах некоторые соединения определяют с помощью

диодно-матричного детектора, другие – с помощью амперометрического детектора. Контроль за содержанием кодеина, его метаболитов и конъюгатов в моче и крови осуществляют методом ВЭЖХ с использованием УФ- (определение кодеина, норкодеина, кодеин-6-глюкуронида, норкодеинглюкуронида и морфин-3-глюкуронида) и амперометрического детекторов (определение морфин-6-глюкуронида, норморфина и морфина). Комбинированное УФ- и кулонометрическое детектирование применяют при исследовании мембранной проницаемости метионин-энкефалинамида. Кулонометрическое детектирование обеспечивает селективность при определении этого соединения и тирозинсодержащих метаболитов, тогда как УФ-детектор позволяет определять его ароматические метаболиты и ингибиторы ферментативной реакции.

Очевидно, что электрохимические (амперометрические, кулонометрические) детекторы на основе модифицированных электродов в сочетании с методами ВЭЖХ-разделения компонентов смеси органических веществ представляют собой селективные и чувствительные аналитические устройства, которые могут применяться для решения задач биохимического анализа в клинической и пищевой химии, экологии. Тем не менее сочетание ВЭЖХ с электрохимическим детектором порой выглядит как искусство, а не только как наука. Зачастую на практике системы электрохимического детектирования относят к нестандартным способам решения аналитических проблем, когда искусство оператора или конструктора детектора является критерием успеха. Это связано с тем, что для успешного применения электрохимических детекторов требуется понимание достаточно сложных, многостадийных электрохимических реакций на границе электрод/раствор. Можно полагать, что новые электродные материалы, успехи приборостроения и потребность в селективных и чувствительных системах детектирования приведут и уже приводят исследователей к расширению области применения электрохимических детекторов в ВЭЖХ. Доказательство этому – коммерческая доступность ряда амперометрических детекторов для определения разнообразных органических соединений, например антиоксидантов.

#### **4.4.2. Модифицированные электроды как детекторы в проточно-инжекционном анализе**

В последнее десятилетие стала очевидной эффективность применения модифицированных электродов в качестве детекторов не только в ВЭЖХ, но и в ПИА. Разнообразие соединений, проявляющих электрохимическую активность на различных электродах, определяет интерес исследователей к использованию электрохимических детекторов в проточных методах анализа. Естественно, что этот интерес связан, прежде всего, с задачами исследований, при-



родой объекта анализа и составом матрицы. Направление основного вектора исследований по применению модифицированных электродов в ПИА – это прежде всего анализ биологических, медицинских (фармацевтических) и экологических объектов. Так, в объектах окружающей среды для повышения производительности анализа тяжелые металлы, гербициды и пестициды во многих лабораториях определяют в условиях ПИА. Все чаще ПИА применяется для определения содержания действующих компонентов в лекарственных формах. Не меньшее распространение ПИА находит в анализе биологических жидкостей (кровь, плазма, сыворотка, моча). Ниже рассмотрены некоторые примеры применения модифицированных электродов в качестве амперометрических детекторов в ПИА, показывающие направление движения идей и разнообразие объектов анализа, а также возможности детектирования, выраженные количественными параметрами.

Если следовать статистике, наибольшее внимание исследователей, разрабатывающих способы определения веществ в потоке жидкости, привлекают глюкоза и биогенные амины, субстанции различных фармацевтических препаратов и аскорбиновая кислота. Реже определяют тяжелые металлы, загрязняющие объекты окружающей среды, поскольку существуют альтернативные высокочувствительные спектральные методы их определения, хотя и не столь производительные. Примером использования модифицированных электродов в неорганическом анализе может служить определение низких концентраций Zn, Cd, Pb и Cu в природных и сточных водах промышленных предприятий с помощью модифицированного нафтионом ртутного пленочного электрода в условиях объемного инжектирования с применением квадратно-волновой инверсионной вольтамперометрии. В поток вводят пробу объемом 50 мкл и регистрируют анодный ток после электронакопления металлов на электроде. Присутствие поверхностно-активных веществ не оказывает заметного влияния на ток детектора. Чувствительность определений можно повысить, если использовать ансамбль электродов из углеродных волокон.

Другой пример – определение нафтохинонов, извлеченных из персидской ромашки *Pyrethrum roseum* (три соединения, содержащие гидроксидные и метильные группы). В условиях проточно-инжекционного анализа их определяют, как правило, со стеклоуглеродными электродами. С помощью амперометрического детектора с тонкослойной микроячейкой и модифицированными печатными ГЭ в сочетании с циклической вольтамперометрией можно идентифицировать и количественно определить содержание указанных компонентов в одной пробе.

Содержание аскорбиновой и мочевой кислот в моче определяют на золотых ультрамикрорефлекторах, модифицированных палладием. Ансамбль таких электродов дает отклик в области потен-

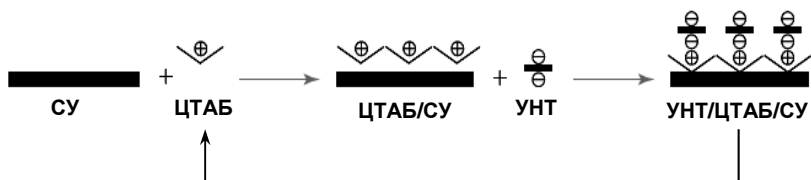
циалов  $+0,55 \div +0,75$  В. Определение проводят в три стадии: сначала в поток вводят пробу, содержащую известную концентрацию этих кислот, далее вводят пробу, содержащую аналит, и в заключение вводят пробу после обработки образца смесью ферментов (аскорбиноксидаза, уриказа и пероксидаза) при pH 7. Градуировочные графики зависимости тока от концентрации субстратов линейны в диапазоне 0,44–2,64 мг/л и 0,34–1,68 мг/л соответственно для аскорбиновой и мочевой кислоты. Результаты определений мочевой кислоты удовлетворительно согласуются с данными спектрофотометрических измерений с относительным стандартным отклонением 3,1–8,6 % (для 9 определений).

Модифицированные электроды на основе сополимера полистирола и дивинилбензола с включенным в него высокодисперсным оксидом  $\text{Cu}^{2+}$  дают амперометрический отклик на сахара. Близкий по механизму действия детектор с модифицирующим слоем  $\text{CuO}$  для ВЭЖХ упоминался выше.

Остаточные количества гидразида малеиновой кислоты (гербицид) в природных и питьевых водах определяют в потоке с помощью УПЭ, модифицированного мелкодисперсным палладием. Указанный гербицид окисляется также на электродах из углеродных материалов. Применение электрода на основе угольной пасты с включенным в нее палладием позволяет понизить потенциал окисления гербицида почти на 140 мВ. Сигнал электрода имеет линейную зависимость от концентрации определяемого вещества в диапазоне от  $1,94 \cdot 10^{-7}$  до  $1,04 \cdot 10^{-4}$  моль/л с пределом обнаружения  $1,4 \cdot 10^{-8}$  моль/л (петлевой дозатор объемом 100 мкл,  $E = +0,7$  В, скорость потока 2,0 мл/мин, фосфатный буфер с pH 7), устойчив и воспроизводим ( $S_r = 3,3$  %).

Для повышения устойчивости отклика углеродного планарного электрода, модифицированного берлинской лазурью, при определении пероксида водорода в условиях ПИА в поток вносят бромид цетилтриметиламмония на уровне критической концентрации мицеллообразования. Это улучшает редокс-свойства медиатора и позволяет снизить потенциал электрода, что уменьшает влияние посторонних примесей при регистрации тока в анодной области электродных потенциалов.

Для отдельного определения сравнительно легко окисляющихся в узкой области потенциалов органических соединений применяют электроды в виде набора тонких металлических проволок из благородных металлов, модифицированных электроосаждением других благородных металлов (Au, Pt и Pd, модифицированные Pd-Pt). Батарея из четырех таких электродов с четырехканальным потенциостатом позволяет определять аскорбиновую кислоту, допамин, эпинефрин и анальгин при совместном присутствии. Для обработки данных мультieleктродных систем при анализе многокомпонентных растворов довольно часто применяют методы хемо-



**Рис. 4.5.** Схема образования многослойного покрытия из углеродных нанотрубок на стеклоуглеродном электроде  
 СУ – стеклоуглеродный электрод; УНТ – углеродная нанотрубка;  
 ЦТАБ – бромид цетилтриметиламмония

метрики. В частности, при определении упомянутых выше веществ «обучение» системы проводят по 16 смесям стандартных растворов. Ошибка определения (в мкг/л) составила 0,3; 0,2; 0,4 и 0,4 соответственно для аскорбиновой кислоты, допамина, эpineфрина и анальгина.

Импульсный вариант детектора на основе электродов, модифицированных электропроводящими полимерными покрытиями, применяется для проточно-инжекционного определения олигонуклеотидов. Стабильный и устойчивый отклик дает стеклоуглеродный электрод, модифицированный многослойной пленкой катионного ПАВ – бромида цетилтриметиламмония – с включенными в нее углеродными нанотрубками (рис. 4.5). Гидрофобные поверхностно-активные вещества типа дигексадецилгидрофосфата (ДГФ) также применяются для модифицирования стеклоуглеродных электродов углеродными нанотрубками. Такие электроды, в частности, дают хорошо воспроизводимые сигналы при определении метронидазола.

Прокаин определяют в фармацевтических препаратах в условиях ПИА с помощью детекторов с планарными печатными электродами. В качестве модификатора используется фенотиазиновый краситель – метиленовый синий, удерживаемый электростатически на электроде. В присутствии аскорбиновой кислоты такой электрод дает электрокаталитический отклик, позволяющий определять прокаин в диапазоне концентраций  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л. На уровне концентраций  $6 \cdot 10^{-5}$  моль/л  $S_r \approx 0,02$  (для 5 инъекций), производительность – 60 измерений в час при скорости потока 1,5 мл/мин и объеме петли дозатора 50 мкл.

#### 4.4.3. Биосенсоры в проточном анализе

Совершенствование технологии нанесения и увеличение срока жизни биослоя, участвующего в генерировании сигнала, позволило создать биосенсоры с устойчивым и воспроизводимым в течение сравнительно длительного времени откликом на субстрат в потоке

жидкости. Использование биосенсоров для детектирования сигнала в ПИА заметно увеличило производительность аналитических операций, их стали применять в клинических лабораториях для решения задач диагностики, в контроле сточных вод, в пищевой промышленности и др. Сомнения в перспективах применения биосенсоров в ПИА (кроме биосенсоров на глюкозу) были развеяны за сравнительно короткое время.

Общая схема установки для проточно-инжекционного анализа с биосенсором с амперометрическим откликом не отличается от стандартных проточных анализаторов. Единственным исключением является требование пониженного расхода носителя и уменьшение объема ячейки, т. е. сокращение механического износа поверхностного слоя биосенсора в процессе измерений. Также несколько большее значение придается термостатированию, поскольку большинство биохимических реакций чувствительны к изменению температуры.

Рассмотрим несколько примеров применения проточных биосенсоров. В них используются практически все способы генерирования сигнала, описанные в гл. 3, за исключением медленных реакций или таких, которые требуют многократной смены раствора. Последнее вполне достижимо, особенно в вариантах непрерывного проточного анализа, однако неоправданно усложняет аппаратуру. Если в составе поверхностного слоя содержится фермент, например оксидоредуктаза, сигнал сенсора зависит от концентрации растворенного кислорода, поддержание которой может представлять проблему, особенно для высокопроизводительных установок. В этих случаях предпочтение отдают медиаторным системам, в которых вместо природного акцептора электронов – кислорода – используются синтетические системы.

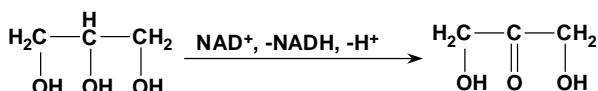
Как и для биосенсоров, предназначенных для работы в стационарных условиях, наибольшее число работ по применению биосенсоров в ПИА относится к определению глюкозы и лактозы. В этих работах основное внимание уделяется оптимизации условий амперометрического отклика и достижению продолжительного функционирования биосенсоров в потоке. Это потребовало решения ряда задач по математическому моделированию концентрационного профиля реагентов в условиях нестационарной кинетики, в том числе численными методами.

В настоящее время достигнута высокая производительность (до 800 инъекций) работы биосенсоров в условиях ПИА при определении глюкозы в сыворотке крови с пределом обнаружения ~200 нмоль в 100 мкл. Биосенсоры изготавливают на основе графитовой пасты с включенным в нее тетрацианохинодиметаном в качестве медиатора электронного переноса. При большем числе инъекций пробы наблюдается частичное вымывание медиатора из

пасты и сигнал биосенсора уменьшается. При скорости потока элюента 30 мл/мин возможно проведение до 20 определений в час.

Предложен сенсор на основе толстопленочных печатных электродов, модифицированных фосфатом циркония, на котором адсорбирован краситель мелдола синяя в виде соли с реактивом Рейнеке, для определения NADH в условиях ПИА. Реактив Рейнеке выполняет стабилизирующую функцию, препятствуя вымыванию медиатора из комплекса с фосфатом циркония. Качество модифицирования и устойчивость каталитического отклика контролируют по циклическим вольтамперограммам. В условиях потока (буферный раствор с pH 7)  $S_r$  при определении NADH в  $10^{-4}$  моль/л растворе составляет 4,2 % (90 инъекций).

Аналогичным образом устроен биосенсор на глицерин. Для этого на поверхностный слой путем кросс-сшивки глутаровым альдегидом иммобилизуют глицериндегидрогеназу, которая катализирует окисление глицерина до дигидроксиацетона:



Ток биосенсора регистрируют при анодном потенциале +0,05 В отн. Ag/AgCl. Стабильность отклика оценивается по относительному стандартному отклонению; для 0,25 ммоль/л раствора глицерина  $S_r = 5,6$  % (70 инъекций). Предел обнаружения составляет  $2,8 \cdot 10^{-6}$  моль/л, а нижняя граница определяемых содержаний –  $9,4 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Указанный биосенсор применяется для определения содержания глицерина в продуктах сбраживания виноградного сока.

Устойчивый сигнал в потоке дают биосенсоры на L-лактат, востребованные в медицине и пищевой промышленности. Для этого применяются биосенсоры на основе печатного графитового электрода с иммобилизованными лактатоксидазой и пероксидазой. Аналитическим сигналом служит ток окисления пероксида водорода, генерируемый при потенциалах 0–100 мВ отн. Ag/AgCl. Пероксидазу предварительно окисляют периодатом для облегчения прямого переноса электрона на электрод. Чувствительность отклика составляет 0,84 нА/мкмоль в диапазоне 10–180 мкмоль субстрата. Данный биосенсор апробирован при контроле содержания L-лактата в кисломолочной продукции. Для сравнения использовали метод спектрофотометрии.

Биосенсор на основе электрода из оксидов индия и олова (ITO), модифицированного хитозаном, содержащим включения наночастиц золота и пероксидазы хрена, применяют для проточно-инжекционного определения пероксида водорода. Медиатором электронного переноса служит *o*-фенилендиамин. Амперометриче-

**Таблица 4.10. Примеры применения амперометрических биосенсоров в потоке жидкости**

Определяемое соединение	Система отклика и условия определения	Аналитические и операционные характеристики	Лит-ра*
Бензол в воздухе рабочей зоны	Электрод Кларка, бактериальные клетки <i>Pseudomonas putida</i> , иммобилизованные между двумя мембранами из ацетата целлюлозы	Определение в растворе в диапазоне 0,025–0,15 ммоль/л после сорбции паров бензола	[1]
Глюкоза в сыроворотке крови	Глюкозооксидаза, иммобилизованная в геле диоксида титана совместно с ферроце-ном	Линейный сигнал в диапазоне концентраций 0,07–15 ммоль/л, чувствительность 7,2 мкА·см <sup>-2</sup> ·ммоль <sup>-1</sup> ·л (определению не мешают аскорбаты)	[2]
Глюкоза и лактоза в продуктах питания	Глюкозооксидаза, иммобилизованная в полимерной пленке с наноразмерными частицами берлинской лазури	Линейность отклика на глюкозу три порядка, 40 измерений в час, $S_r \approx 2\%$	[3]
Малеиновая кислота (овощи, фрукты, вина)	Иммобилизованные малат-дегидрогеназа и диафораза, NADH и феррицианид	Линейность отклика до 20 ммоль/л (pH 3,3) или 40 ммоль/л (pH 7,8)	[4]
Глицерин в винах	Ферментный реактор с иммобилизованной глицерин-дегидрогеназой в пленке полимера	Стабильный отклик в течение 3 месяцев (2500 инъекций, $S_r \approx 2,2\%$ , правильность 95–102 %)	[5]
Гликозинолаты (синигрин)	Мирокиназа в реакторе, глюкозооксидазный биосенсор (отклик на H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> на Pt-аноде)	Мешающее влияние энантиоселективности глюкозооксидазы (мирокиназа производит только 6-энантиомер)	[6]
Гликолевая кислота в косметических продуктах	Гликолатоксидаза и каталаза в полимерных мембранах ацетата целлюлозы, поликарбоната и сульфополиэфира (отклик на H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> на Pt-аноде)	Правильность $102 \pm 1\%$ (примеси оксалатов устраняют, используя первичные амины и каталазу)	[7]
Инсектициды на примере диметоата в поверхностных водах	Ацетилхолинэстеразы из различных источников, иммобилизованные на печатном электроде в полимерной пленке	Трехканальное устройство с пределом обнаружения $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л	[8]

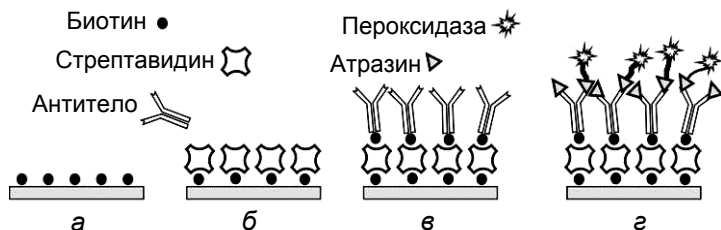
\*[1] Lanyon Y., Marrazza G., Tothil I., Mascini M. // Biosens. Bioelectron. 2005. Vol. 10. P. 2089. [2] Yu J., Liu S., Ju H. //Ibid. 2003. Vol. 19. P. 401. [3] Лукачева Л. В., Закемовская А. А., Карякина Е. Е. и др. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. С. 429. [4] Prodromidis M., Karayannis M. // J. Flow Injection Anal. 2004. Vol. 21 P. 5. [5] Prodromidis M., Karayannis M. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14.

P. 241. [6] Tsiafoulis C., Prodromidis M., Karayannis M. // Anal. Chem. 2003. Vol. 75. P. 927. [7] Tsiafoulis C., Prodromidis M., Karayannis M. // Ibid. 2002. Vol. 74. P. 132. [8] Bucur B., Dondoi M., Danet A., Marty J.-L. // Anal. Chim. Acta. 2005. Vol. 539. P. 195.

ский отклик биосенсора линеен в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,5 ммоль/л и стабилен в течение 34 инъекций. Недостаток конструкции – необходимость введения в раствор растворимого медиатора, однако стоимость биосенсора невысока, поскольку ИТО-электрод является продуктом серийного промышленного производства.

В табл. 4.10 приведены примеры определения субстратов в условиях ПИА с применением биосенсоров, а также аналитические и операционные характеристики. Эти примеры, естественно, не исчерпывают всего разнообразия биосенсоров, предложенных для измерений в проточном анализе. Они скорее отражают их возможности при измерениях в потоке жидкости. Особую группу составляют биосенсоры на основе ингибиторов ферментов. Казалось бы, поскольку каждое измерение снижает активность фермента, в потоке можно проводить измерения только с обратимыми ингибиторами. На самом деле, применение специальных реактиваторов позволяет расширить возможности метода и использовать один и тот же биосенсор в десяти и более измерениях. Конечно, в этом случае не приходится говорить о высокой производительности системы. Интерес здесь несколько другой: поскольку большинство проб объектов окружающей среды не содержат опасных концентраций ингибиторов-токсикантов, применение ПИА позволяет быстро установить «чистые» пробы, сократив общее время анализа.

Аналогично ингибиторным биосенсорам, проточные иммуносенсоры ориентированы не столько на работу в потоке, сколько на сокращение трудоемкости многостадийного определения и повышение точности измерения сигнала. Например, предложена система проточно-инжекционного и секвенционального проточного анализа для определения атразина с помощью специфических антител в формате конкурентного анализа, которая включает в себя два дозатора петлевого ввода и реакторы для последовательного введения иммунореагентов. Схема контролируемого модифицирования электрода в условиях ПИА представлена на рис. 4.6. Сигналом сенсора служит ток восстановления бензохинона, образующегося при пероксидажном окислении гидрохинона – субстрата индикаторного фермента. Поскольку поверхностная концентрация пероксидазы определяется соотношением концентраций атразина и его конъюгата, максимальному сигналу соответствует отсутствие атразина в пробе, а минимальному – полное заполнение центров связывания антител. Диапазон определяемых концентраций атразина – 0,045–2 мкг/л, предел обнаружения – 0,03 мкг/л.



**Рис. 4.6.** Схема проточного иммуноанализа при определении атразина с печатными графитовыми электродами

*а* – электрод, покрытый биотином в стационарных условиях; *б* – нанесение стрептавида; *в* – нанесение биотинированных антител к атразину; *г* – нанесение смеси атразина и конъюгата атразина с пероксидазой

Конкурентный иммуноанализ в целом достаточно хорошо согласуется с условиями проточно-инжекционного анализа, поскольку в этом случае результаты определений в меньшей степени зависят от полноты протекания иммунной реакции на поверхности электрода в отличие от прямых методов сэндвичевого анализа. Это позволяет сократить время прохождения пробы через ячейку. Кроме того, в конкурентных схемах возможно одностадийное протекание реакции между антителами, определяемыми веществами и конъюгатами, несущими индикаторные ферменты, в результате фермент закрепляется в виде иммунного комплекса на поверхности электрода. Это позволяет существенно сократить продолжительность определений и исключить ошибки, связанные с частичной инактивацией фермента или его неспецифической сорбцией, что характерно для весьма длительных экспериментов в условиях классического иммуноанализа.

Наиболее часто в качестве индикаторного фермента используется пероксидаза. Частично это связано с тем, что для нее имеются стандартные методики спектрофотометрического определения, что позволяет использовать в электрохимическом варианте ПИА коммерческие конъюгаты антител и пероксидазы. Кроме того, для этого фермента предложены весьма чувствительные и удобные способы амперометрического детектирования. Например, для амперометрического детектирования пероксидазы можно использовать реакции электронного переноса с участием гетерогенных медиаторов, таких как полианилин, или дополнительно вводить в раствор другие субстраты фермента – производные ферроцена, уже упоминавшийся гидрохинон и т. п.

Интересный вариант пероксидазного окончания – сочетание двух ферментов. Для этого пероксидазу иммобилизуют совместно с антителами на поверхности золотого электрода, а второй фермент, генерирующий пероксид водорода (например, глюкозооксидазу), включают в состав конъюгата, взаимодействующего с поверхностью



ным биослоем. В этом случае удастся существенно уменьшить фоновый сигнал и повысить чувствительность иммунных определений по сравнению с традиционным моноферментным вариантом.

#### 4.4.4. Модифицированные электроды в капиллярном зонном электрофорезе

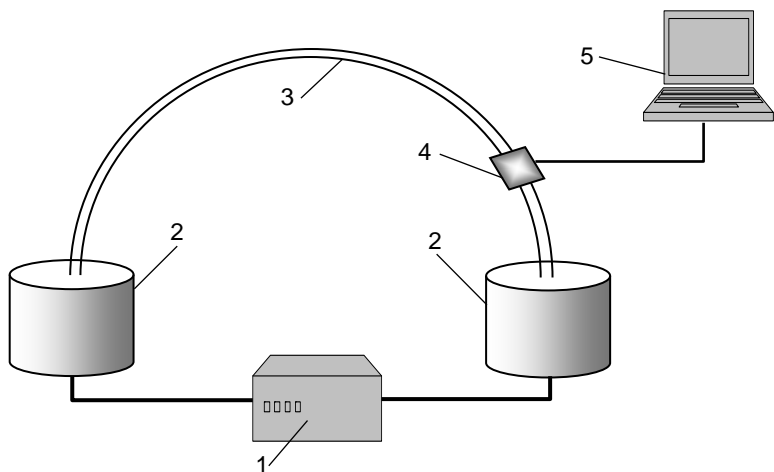
Явление электрофореза было открыто более полувека назад и относится к поведению заряженных частиц (ионов) в растворе, когда последний помещен в электрическое поле. При наложении достаточно большой разности потенциалов между двумя участками раствора частицы в нем приходят в движение: положительно заряженные перемещаются к катоду, а отрицательно заряженные – к аноду. Через некоторое время скорость частиц  $v$ , которая определяется их зарядом, формой и размером, а также природой растворителя и напряженностью электрического поля, становится постоянной:

$$v = \mu E,$$

где  $\mu$  – электрофоретическая подвижность частицы, зависящая от ее природы и условий эксперимента;  $E$  – напряженность электрического поля.

Если проводить электрофорез в трубчатой ячейке, то при наложении электрического поля образуются зоны, скорость перемещения которых определяется электрофоретической подвижностью частиц, составляющих зону. В классическом зонном электрофорезе при наложении электрического поля из-за выделения тепла и конвекционных потоков наблюдается искажение зон. Для предотвращения их размывания трубку заполняют гелем. Применение гелей не только уменьшает размывание зон, но способствует более эффективному разделению, которое улучшается благодаря молекулярно-ситовому эффекту (по аналогии с гель-проникающей хроматографией). Разделение в этом случае основано на различиях в скорости миграции частиц через гель при наложении электрического поля.

При замене трубчатой ячейки на капилляр из-за увеличения отношения поверхности к объему существенно уменьшается тепловая конвекция раствора, что способствует меньшему размыванию зон и повышению эффективности разделения. Другим преимуществом применения капилляров является возможность использования ВЭЖХ-детекторов для определения концентрации заряженных частиц. На рис. 4.7 представлена схема системы капиллярного электрофореза в простейшем случае. Тонкий кварцевый капилляр диаметром 25–100 мкм и длиной от 20 до 100 см, в котором перемещаются зоны компонентов образца, помещают между двумя сосудах с раствором, проводящим электрический ток (обычно применяют буферные растворы), и устанавливают раз-

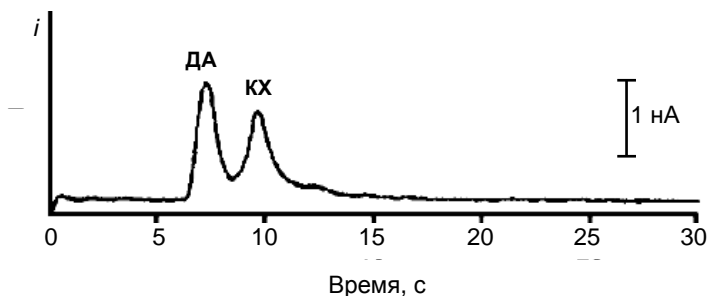


**Рис. 4.7.** Схема установки для капиллярного зонного электрофореза  
 1 – источник напряжения; 2 – буферные растворы; 3 – капилляр;  
 4 – детектор; 5 – регистрирующее устройство

ность потенциалов  $\sim 20\text{--}30$  кВ. Возникающее в капилляре электрическое поле вызывает миграцию частиц пробы. Прежде чем покинуть капилляр, частицы проходят через детектор, который дает отклик, зависящий от свойств частиц и времени наблюдения так же, как и в жидкостной хроматографии. В итоге регистрируется изменение сигнала во времени, называемое электрофореграммой и напоминающее по виду обычную хроматограмму (рис. 4.8).

На электрофоретическое перемещение заряженных частиц всегда накладывается электроосмотический поток, который способствует пассивному транспорту пробы, а не ее разделению, и в большинстве буферов направлен к катоду. Его величина зависит от рН буфера и свойств поверхности капилляра. Он может быть настолько большим, что к катоду будут перемещаться не только нейтральные молекулы, но даже отрицательно заряженные частицы, несмотря на их электрофоретическую миграцию к аноду. Возникновение электроосмотического потока обусловлено образованием отрицательных зарядов на поверхности кварцевых капилляров вследствие диссоциации силанольных групп. В образующемся двойном электрическом слое преобладают положительно заряженные ионы. При наложении электрического поля жидкость засасывается в капилляр и движется к отрицательному полюсу, поскольку содержит положительно заряженные частицы.

В кварцевых капиллярах электроосмотический поток уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением степени



**Рис. 4.8.** Электрофореграмма смеси 50 мкмоль/л дофамина (ДА) и 110 мкмоль/л катехола (КХ)

диссоциации силанольных групп при увеличении pH. Если к буферу добавить катионные поверхностно-активные вещества, то на поверхности капилляра образуется положительный заряд и электроосмотический поток сменит направление. Для лучшего разделения зон концентрация буферного раствора должна быть примерно в 1000 раз больше концентрации определяемых веществ. При этом к минимуму сводится искажение зон под действием электрического поля. Обычно применяют фосфатные буферные растворы с pH ~ 7 и концентрацией 0,01–0,05 моль/л.

Основные параметры, описывающие процессы в капилляре при электрофорезе, аналогичны хроматографическим: время миграции частицы  $t = L/\mu E$ , где  $L$  – эффективная длина капилляра, и эффективность разделения, измеряемая числом теоретических тарелок  $N = \mu E / 2D$ , где  $D$  – коэффициент диффузии частицы. Видно, что эффективность разделения зависит от  $E$  и  $D$ , тогда как  $L$  практически не влияет на нее и определяет лишь время миграции частицы в капилляре, т. е. время определения. С увеличением молекулярной массы перенос вещества за счет диффузии уменьшается, и эффективность разделения возрастает (в противоположность ВЭЖХ, где число теоретических тарелок с уменьшением коэффициента диффузии уменьшается). При напряжении от 100 до 35 000 В и эффективном заряде частиц от 1 до 10 число теоретических тарелок достигает  $10^7$  на метр. Эта величина существенно превышает аналогичные значения, достигнутые в ВЭЖХ.

Наилучшее разделение получается тогда, когда ионы движутся против электроосмотического потока. При этом коэффициент разделения  $R_s$  можно рассчитать по формуле

$$R_s = 0,177(\mu_2 - \mu_1)\sqrt{E/D(\bar{\mu} \pm \mu_{oc})},$$

где  $\mu_1$  и  $\mu_2$  – электрофоретические подвижности ионов;  $\bar{\mu}$  – их средняя подвижность;  $\mu_{oc}$  – подвижность частиц за счет электроосмотического потока.

Типичный объем вводимой в капилляр пробы находится в пределах между 2 и 20 нл и определяется формулой

$$Q = (\mu + \mu_{\text{ос}}) E A C t_{\text{в}} / L,$$

где  $Q$  – количество вводимого в капилляр вещества;  $A$  – площадь сечения капилляра;  $C$  – концентрация определяемого компонента;  $t_{\text{в}}$  – время, в течение которого вводится проба.

Для повышения эффективности работы электрофоретических систем обычно повышают  $E$  и уменьшают  $L$ . Однако с уменьшением  $L$  уменьшается сопротивление раствора, что способствует более интенсивному выделению тепла при прохождении электрического тока. К тому же уменьшается площадь поверхности капилляра, которая рассеивает это тепло. Поэтому оптимальная величина  $E$  зависит от диаметра капилляра, электропроводности буфера и эффективности охлаждения. Для устранения гравитационного эффекта капилляр располагают горизонтально.

Большинство аппаратных требований не в последнюю очередь относится к детектированию. Из-за малой величины внутреннего диаметра капилляра к детекторам предъявляются высокие требования, касающиеся чувствительности, шумов и т.д. Наиболее часто в капиллярном зонном электрофорезе применяется УФ-детектор. При этом компоненты пробы проходят через часть капилляра, в которой измеряется УФ-поглощение раствора, или детектируются на его конце. Однако концентрационная чувствительность УФ-детектора в этом случае в 30–100 раз ниже, чем в ВЭЖХ. Это зависит от шумов детектора и эффективной толщины поглощающего слоя. Заметно мешает также светорассеяние из-за отражения стенок капилляра и его неидеальной цилиндрической формы.

Ширина зоны в капилляре находится в пределах 5 мм ( $N = 50\,000$ ) и соответствует объему 10 нл (капилляр диаметром 50 мкм). Такой крайне малый объем является причиной исключительно высокой чувствительности по массе, о чем часто говорится в рекламе. Рекордный предел обнаружения – 300 молекул аминокислоты – достигнут с лазерным флуоресцентным детектором. Однако для рутинного применения более важна концентрационная чувствительность, которая из-за малой толщины поглощающего слоя меньше, чем в высокоэффективной жидкостной хроматографии. В табл. 4.11 приведены основные характеристики применяемых детекторов.

Видно, что электрохимические детекторы также применяются в капиллярном зонном электрофорезе. Среди них наибольшее распространение получили амперометрические детекторы. В качестве индикаторных электродов обычно используются углеродные волокна диаметром 1–10 мкм, которые помещают в капилляр и удерживают с помощью микроманипулятора. При оптимизации ус-

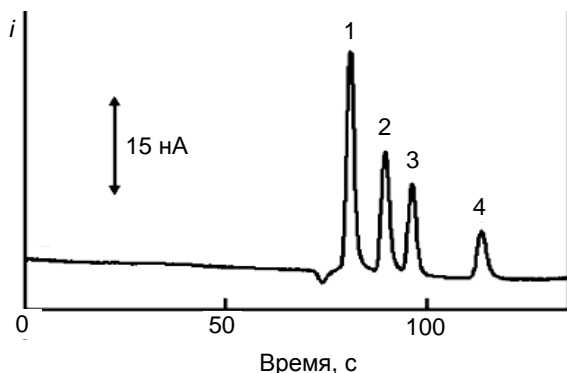
**Таблица 4.11. Сравнительная характеристика детекторов, применяемых в капиллярном зонном электрофорезе**

Принцип детектирования	Предел обнаружения		Применение
	Абсолютное количество, моль	Концентрация, моль/л	
УФ-поглощение	$10^{-15}$ – $10^{-13}$	$10^{-7}$ – $10^{-4}$	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты
Флуоресценция	$10^{-18}$ – $10^{-13}$	$10^{-9}$ – $10^{-4}$	ДНК, пептиды, белки, аминокислоты
Лазерная флуоресценция	$10^{-21}$ – $10^{-17}$	$10^{-13}$ – $10^{-7}$	ДНК, аминокислоты
Амперометрия	$10^{-17}$ – $10^{-14}$	$10^{-8}$ – $10^{-6}$	Легко окисляющиеся и восстанавливающиеся вещества
Кондуктометрия	$10^{-18}$ – $10^{-16}$	$10^{-7}$ – $10^{-5}$	Ионы металлов, амины, карбоновые кислоты
Потенциометрия	$10^{-19}$	$10^{-8}$	Ионы металлов
Масс-спектрометрия	$10^{-17}$	$10^{-10}$ – $10^{-8}$	Белки, пептиды, лекарства

ловий детектирования возможно применение капилляров с диаметром до 2 мкм. В этом случае предел обнаружения, например катехина, достигает  $10^{-17}$  моль, а эффективность разделения 140 000 теоретических тарелок.

Трудности в использовании амперометрических детекторов заключаются не столько в регистрации малых токов, сколько в том, что ток, протекающий через капилляр, на несколько порядков превышает ток собственно аналитического сигнала. Для устранения этого ограничения применяют вставку из пористого стекла, которая изолирует детектор от основной части капилляра. При этом электроосмотический поток выполняет роль «насоса», прокачивающего поток жидкости через изолированный участок капилляра с помещенным в него рабочим электродом.

Высокая эффективность разделения биологически активных веществ, в том числе белков, при исключительно малом объеме инжектируемого раствора явилась одной из причин того, что капиллярный зонный электрофорез в настоящее время широко применяется для анализа биологических жидкостей, цитоплазмы клеток растительных и животных тканей, определения концентраций нейропереносчиков. При этом заостренный конец капилляра вводят на некоторое время (~ 25 с) непосредственно в клетку. В этом случае объем инжектируемой жидкости составляет от 50 до 80 пл.



**Рис. 4.9.** Электрофореграмма смеси ароматических нитросоединений  
 1 – 1,3,5-тринитробензол; 2 – 2,4,6-тринитротолуол; 3 – 2,4-динитробензол;  
 4 – 2-амино-4,6-динитробензол

Аналогичные устройства применяются при проведении фармакокинетических исследований.

С помощью амперометрических детекторов в условиях капиллярного зонного электрофореза можно определять электроактивные вещества на уровне субатомных количеств. Однако не все соединения имеют электроактивные группы. Для их определения используются косвенные методы амперометрического детектирования. При этом к буферному раствору добавляют ионофоры, например 3,4-дигидроксибензиламин, который окисляется на электроде из углеродного волокна при +0,7 В. В отсутствие определяемого (неэлектроактивного) вещества ток, протекающий через электрод, пропорционален концентрации ионофора, тогда как при прохождении зоны определяемого вещества величина тока уменьшается. Таким образом можно определять аминокислоты при содержании до  $10^{-15}$  моль.

Наряду с электродами из углеродного волокна для определения аминокислот применяют медные ультрамикроэлектроды. На поверхности меди в слабокислых или щелочных буферных растворах образуется тонкий слой оксида меди, который растворяется при +0,15 В в присутствии аминокислот с образованием соответствующих медных комплексов. Ток окисления меди пропорционален концентрации аминокислоты в растворе. Чувствительность электрода зависит от скорости реакции комплексообразования и от объемной скорости потока жидкости в капилляре. С помощью медных электродов определяют также белки, пептиды, сахара, катехол-амины.

Для изготовления детекторов применяют и традиционные в вольтамперометрии материалы – золото, платину, серебро, палладий, а также модифицированные металлические и угольно-пасто-

вые электроды, в том числе печатные графитовые электроды. В частности, с помощью детекторов на основе УМЭ из золотой и платиновой проволоки определяют белки, углеводы, аминокислоты, антибиотики, глюкозу, аскорбиновую и мочевую кислоты. Медный электрод, модифицированный Pt, применяют для определения углеводов и аминокислот. Электроды из углеродных материалов, в том числе модифицированные мелкодисперсными частицами Au, используются для определения креатина и креатинина, этанола, глюкозы, мочевой кислоты, а также ароматических нитросоединений в составе взрывчатых веществ (рис. 4.9).

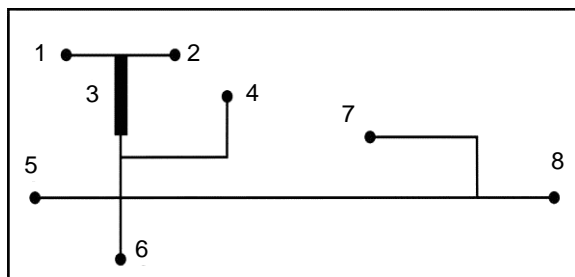
Для определения незаряженных электроактивных молекул используются циклодекстрины, образующие с органическими соединениями молекулярные комплексы типа «гость-хозяин». Они выступают в качестве «локомотива», который увлекает за собой нейтральную молекулу при движении внутри капилляра. Таким способом определяют энантиомеры аминокислот, алкалоиды, кортикостероиды, полициклические углеводороды, полихлорированные бифенилы, витамины.

#### **4.5. МИКРОФЛЮИДНЫЕ СИСТЕМЫ С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ ДЕТЕКТОРАМИ**

Рассмотрим одно из современных направлений миниатюризации проточного анализа – «лабораторию на чипе». Это интегрированная микроаналитическая система, в которой совмещены стадии пробоотбора, концентрирования и разделения, введения реагентов и их смешения с определяемыми веществами, измерения сигнала. Сочетание принципов проточно-инжекционного анализа и капиллярного зонного электрофореза обеспечивает непрерывность работы микроаналитической системы. Скорость ее функционирования ограничивается главным образом диффузионными факторами, которые сведены к минимуму благодаря малой длине пути миграции определяемых компонентов и реагентов до места реакции. Обобщенная схема микрофлюидной системы приведена на рис. 4.10.

Каналы и микроэлементы системы (реакторы, смесители) вытравливают на кремниевой или стеклянной подложке либо вырезают в полимерной пленке, которую закрепляют между двумя полированными пластинами из стекла или высокопрочного полимерного материала с точками ввода, отмеченными на схеме черными кружками. В результате получают проточную систему с минимальным расходом реагентов (от нано- до микролитров в минуту) и высокой воспроизводимостью условий дериватизации и разделения определяемых веществ.

Подбор материалов и техника изготовления микрофлюидных устройств в значительной степени базируется на достижениях микроэлектроники – это сухое и мокрое травление, лазерная и плаз-



**Рис. 4.10.** Микрофлюидная система с электрохимической регистрацией сигнала

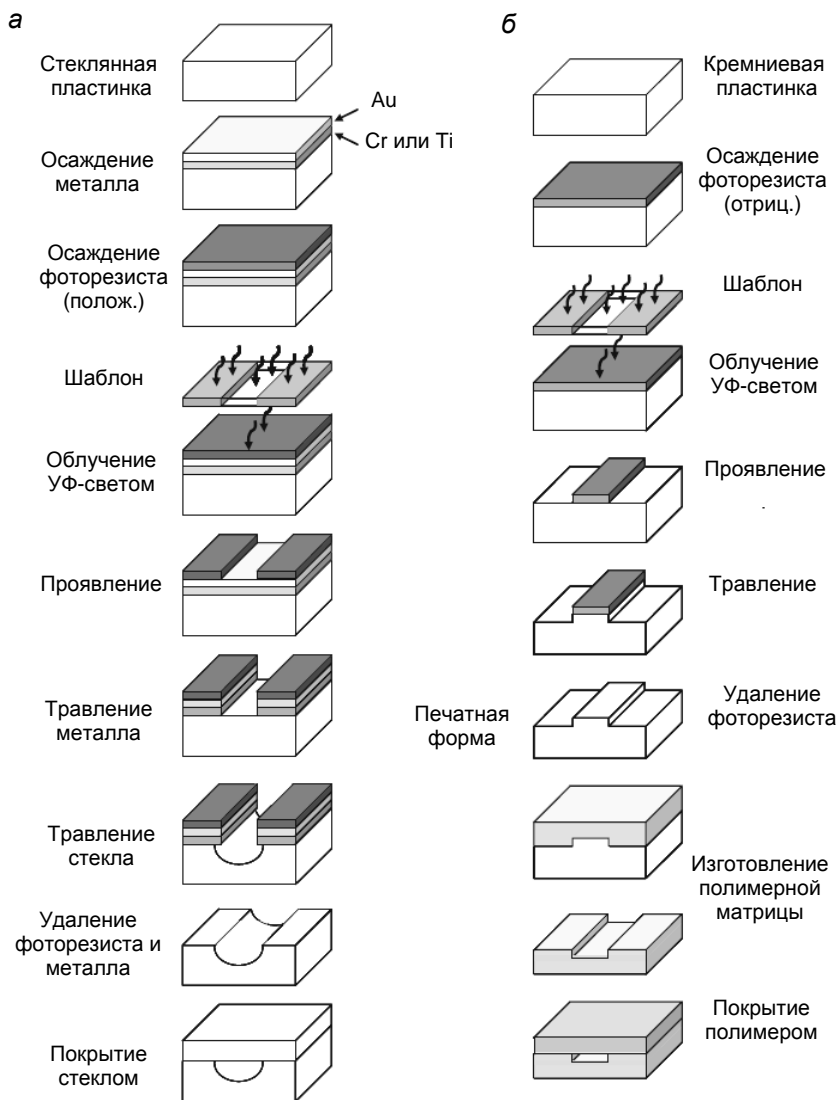
1 – ввод реагента; 2 – ввод образца; 3 – микрореактор предварительной дериватизации; 4 – ввод буфера разбавления; 5 – ввод основного носителя; 6 – вывод отработанных растворов; 7 – ввод реагентов для дериватизации после разделения образца, 8 – вывод на электрохимический детектор

менная обработка, фотолитография и высокоточная трафаретная печать. Для изготовления пленочных систем чаще всего применяют полиметилметакрилат, полидиметилсилоксан, полиэтилентерефталат и полиэтилен. Диаметр каналов составляет десятки микрометров, зон смешения и реакторов – до ста микрометров. На рис. 4.11 представлены основные стадии процессов изготовления стеклянных и полимерных микрочипов.

При их изготовлении на поверхность стеклянной или кремниевой пластинки наносится пленка полимера, чувствительного к УФ-излучению, – фоторезиста. На полимер помещается «маска», обычно шаблон из хрома, нанесенный на стеклянную пластинку. УФ-излучение попадает через маску на фоторезист, после чего облученная часть последнего (положительный фоторезист) удаляется. В случае облучения отрицательного фоторезиста удаляется та его часть, которая не подвергалась УФ-облучению. При этом на резистном слое остается рисунок исходного шаблона. Для удаления кремния или стекла в зонах, не защищенных резистом, используются методы химического травления или иные способы. В конце процесса резист удаляется и остается готовая структура для изготовления микрочипа.

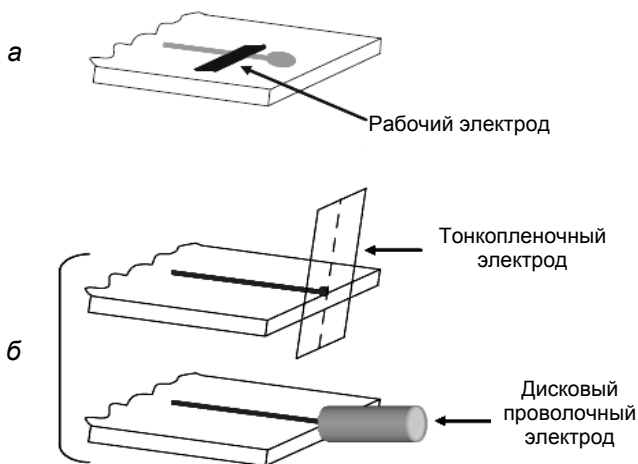
Для ввода микрообъемов жидкости и создания потока применяют электрофорез и микронасосы – пьезоэлектрические, магнитные, реже – плунжерные. Аналогичным образом организуется и ввод раствора образца. Часто адресный транспорт определяемых компонентов и реагентов осуществляется за счет капиллярного электрокинетического эффекта. Его выбор определяется особенностями электрокинетического течения жидкости в капилляре, вызываемого образованием двойного электрического слоя. Электрофоретический способ является удобным методом адресной доставки





**Рис. 4.11.** Основные стадии изготовления стеклянных (а) и полимерных (б) микрочипов

компонентов анализа к месту протекания реакции. Имеются интересные разработки в области микромеханических насосов и клапанов, которые в микроаналитических системах пока применяются сравнительно редко, но имеют хорошие перспективы при создании интегрированных устройств.



**Рис. 4.12.** Конструкции микрофлюидных систем с детекторами в канале (а) и на выходе (б)

Амперометрические детекторы в микрофлюидных системах могут размещаться либо прямо в канале (рис. 4.12, а), либо на выходе компонентов (рис. 4.12, б). Расположение детектора непосредственно в канале снижает диффузионное размывание пика, но ухудшает разделение компонентов пробы, достигаемое в процессе ее движения по каналу. В случае электрофоретических систем основная проблема электрохимического детектирования – создание эффективного устройства, отделяющего электрофоретическое напряжение от потенциала измерительной ячейки. Обычно потенциал электрофоретического разделения в микрочипах равен  $\sim 1$  кВ, а потенциал рабочего электрода – порядка 1 В. Для этого осуществляют заземление индикаторного электрода (иногда в сочетании с полимерными изолирующими мембранами), который помещают в специальное углубление в канале с рабочими электродами, поддерживающими напряжение электрофоретического разделения. При этом фоновые токи имеют величину порядка 10–30 пА для сигнала-отклика на уровне десятков нА. Можно использовать потенциостат, который позволяет отдельно поддерживать параметры электрофоретического разделения компонентов образца и их амперометрического определения.

Разработаны микрофлюидные системы, в которых регистрируется ток между электродами, применяемыми для электрофоретического разделения. На одном из них – псевдоэлектроде сравнения – происходит катодное восстановление кислорода (углеродное волокно) или ионов водорода (палладий). Такая система позволяет не только регистрировать сигнал окисления допамина и других

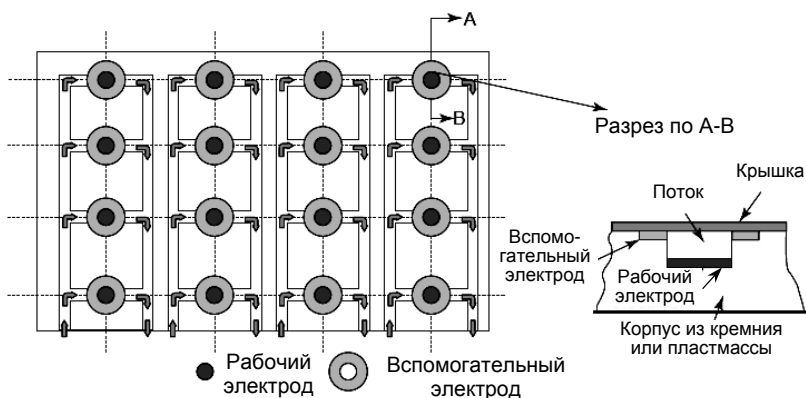
электроактивных компонентов, но косвенно определять катионы калия и другие electroneактивные ионы металлов по величинам их миграционных токов.

Применение детекторов на выходе упрощает конструкцию микрофлюидных систем и дает более выгодное соотношение сигнал/шум, хотя и при меньшей чувствительности определений. В этом случае важно подобрать оптимальную конструкцию индикаторного электрода, позволяющую добиться наилучших условий гидродинамического переноса определяемого соединения в потоке носителя. Обычно используют конструкции, аналогичные применяемым в ВЭЖХ и ПИА, – «стенка–сопло», тонкослойные ячейки, а также кольцевые электроды, устанавливаемые на выходе канала, и др. Наиболее простая конструкция – детектор типа «стенка–сопло». Он совместим с планарными тонкопленочными электродами, изготавливаемыми методами фотолитографии или трафаретной печати. Электрод закрепляют перпендикулярно на выходе канала таким образом, что набегающий поток поворачивается на 90°, обеспечивая тем самым наилучшее обновление приэлектродного слоя. Толщина зазора составляет 10–100 мкм.

Аналогичным образом могут применяться дисковые и объемные электроды, регулировка положения которых относительно выхода канала регулируется с помощью резьбового соединения. Такая конструкция допускает быструю замену электродов, не затрагивающую микрофлюидную платформу, в случае их пассивации, коррозионного разрушения или частичного растворения. В качестве материала рабочего электрода предпочтение отдают углеродным материалам – графиту, стеклоуглероду, композитным углеродсодержащим электродам, включая углеродные нанотрубки как модифицирующие покрытия, обеспечивающие более развитую поверхность и лучшую обратимость реакций.

Наибольшие значения сигнал/шум получены для ансамбля ультрамикроэлектродов на основе эпoxисграфитовой композиции (рис. 4.13), а также допированного бором алмаза. Несмотря на более низкие токи, допированный бором алмаз отвечает самым высоким требованиям по параметрам шума, чувствительности и селективности отклика. Пики вольтамперограмм, зарегистрированные на таком электроде, имеют более острую и симметричную форму, электроды менее подвержены пассивации и отличаются высокой механической прочностью.

Металлические электроды изготавливают стандартными способами путем вакуумного напыления или фотолитографии. В некоторых случаях, например при использовании палладия для анодного окисления гидразинов, рабочие потенциалы металлических электродов существенно ниже, чем углеродных. Помимо палладия, в качестве электродов в микрофлюидных системах широко используются золото, амальгамированные электроды, платина, висмут,



**Рис. 4.13.** Схема микрофлюидной системы с ансамблем ультрамикродатчиков

никель и медь. При этом условия определения органических соединений в целом не отличаются от таковых на обычных ультрамикродатчиках. Так, медные электроды проявляют электрокаталитические свойства при анодном окислении сахаров (как отмечалось ранее, реально в процессе окисления участвуют оксиды меди), никелевые электроды после предварительного анодирования дают устойчивый отклик на алифатические спирты и углеводы.

По устойчивости работы в потоке и по отношению сигнал/шум среди металлических электродов вне конкуренции золотые электроды. Их размещают как в канале, так и на выходе потока. Наряду с обычными золотыми электродами широко применяются печатные электроды, содержащие мелкодисперсные частицы золота. Амальгмированные электроды, как правило, имеют малое время жизни и недостаточную стабильность сигнала в потоке независимо от материала подложки.

Особенности формирования сигнала и аналитические характеристики микрофлюидных систем незначительно отличаются от аналогичных макросистем. Это касается как химизма процессов, так и пределов обнаружения и диапазона определяемых концентраций. В частности, для упомянутого выше дофамина предел обнаружения составляет 0,1–10 мкмоль/л.

Микрофлюидные системы, в которых детекторы модифицированы биологическими компонентами, применяются для определения биологически активных соединений (например, для определения глюкозы, в том числе в прототипах искусственной поджелудочной железы), белков, ДНК и др. (табл. 4.12). Главное их достоинство, как и в случае ПИА, — сокращение времени и трудоемкости определений за счет регулирования скорости подачи реагентов-мо-

Таблица 4.12. Примеры применения микрофлюидных систем

Определяемое вещество	Природа отклика	Материал электрода	Лит-ра*
Глюкоза	Амперометрия	Cu	[1]
Углеводы, аминокислоты	Амперометрия	Cu/УНТ	[2]
Аскорбиновая кислота	Амперометрия	Pt, Au, C	[3, 4]
Мочевая кислота	Амперометрия	Pt	[5]
Аминокислоты	Амперометрия	Cu, УНТ, C	[6–8]
Глюкоза, креатинин, мочевая и аскорбиновая кислоты	Энзимный сенсор	Pt	[9]
Глюкоза, мочевая и аскорбиновая кислоты	Энзимный сенсор	Печатный ГЭ, модифицированный наночастицами Au	[10]
Глюкоза, этанол	Энзимный сенсор	То же	[11]
Глюкоза	Энзимный сенсор	Au	[12]
Аминокислоты	Энзимный сенсор	Печатный ГЭ, модифицированный наночастицами Au	[13]
Инсулин, глюкоза	Иммуносенсор	Au	[14]
Антитела мышей	Иммуносенсор	Печатный ГЭ	[15]
ДНК	ДНК-сенсор	Au	[16]
Сальмонелла	ДНК-сенсор	Pt	[17]

\*[1] Dou Y.-H., Bao N., Xu J.-J., Chen H.-J. // *Electrophoresis*. 2002. Vol. 23. P. 3558. [2] Wang J., Chen G., Wang M., Chatrathi M. P. // *Analyst*. 2004. Vol. 29. P. 512. [3] Backofen U., Matysik F. M., Lunte C. E. // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. P. 4054. [4] Coltro W. K. T., Da Silva J. A. F., Da Silva H. D. T. et al. // *Electrophoresis*. 2004. Vol. 25. P. 3832. [5] Fanguy J. C., Henry C. S. // *Ibid.* 2002. Vol. 23. P. 767. [6] Bao N., Xu J.-J., Dou J.-H. et al. // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1041. P. 245. [7] Wang J., Chen G., Chatrathi M. P., Musameh M. // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. P. 298. [8] Xu J., Peng Y., Bao N. et al. // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1095. P. 193. [9] Li H.-L., Chen S.-C. // *Talanta*. 2004. Vol. 64. P. 750. [10] Wang J., Chatrathi M. P. // *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72. P. 2514. [11] Wang J., Chatrathi M. P., Tian B. // *Ibid.* 2001. Vol. 73. P. 1296. [12] Wilke R., Buttgenbach S. // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 19. P. 149. [13] Wang J., Chatrathi M. P., Ibanez A., Escarpa A. // *Electroanalysis*. 2002. Vol. 14. P. 400. [14] Wang J., Ibanez A., Chatrathi M. P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. P. 8444. [15] Wang J., Ibanez A., Chatrathi M. P., Escarpa A. // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 5323. [16] Ertl P., Emrich C. A., Sihghal P., Mathies R. A. // *Ibid.* 2004. Vol. 76. P. 3749. [17] Woolley A. T., Lao K., Glazer A. N., Mathies R. A. // *Ibid.* 1998. Vol. 70. P. 684.

дификаторов, а также существенное уменьшение объемов пробы и необходимых реагентов (до нескольких микролитров).

#### 4.6. ДЕТЕКТОРЫ ГАЗОВ

Амперометрические детекторы (датчики) газов представляют собой устройства из двух электродов – индикаторного и электрода сравнения – и раствора электролита, помещенных в пластмассовую трубку (рис. 4.14). К концу трубки прикрепляется газопроницаемая мембрана. Поры мембраны вследствие ее водоотталкивающих свойств заполнены воздухом или другими газами и не содержат воды. Как правило, газопроницаемые мембраны имеют толщину 25–100 мкм. Их изготавливают из гидрофобных полимеров (силоксановый каучук, полипропилен, фторполимеры и др.). Применяют два типа мембран – гомогенные и микропористые. В гомогенных мембранах газ растворяется в материале мембраны и диффундирует через нее, а в микропористых – диффундирует через поры мембраны. Коэффициенты диффузии газов в порах мембраны на несколько порядков выше, чем в фазе мембраны. Поэтому детекторы с пористыми мембранами менее инерционны по сравнению с детекторами с гомогенными мембранами.

Конструктивно детекторы газов устроены так, что между мембраной и чувствительным элементом индикаторного электрода находится тонкая пленка электролита или же она удерживается на его поверхности. В последнем случае между мембраной и электродом имеется воздушный зазор. Иногда между мембраной и электродом помещают прокладку из тонкой ткани. В процессе измерений газ диффундирует через мембрану до тех пор, пока не исчезнет градиент парциальных давлений газа вне детектора и в тонком слое

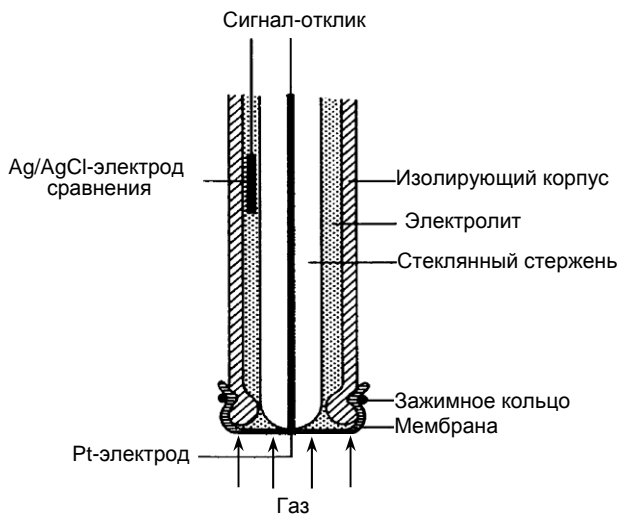
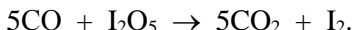


Рис. 4.14. Устройство газового детектора

электролита. При этом газообразное вещество взаимодействует с электролитом и вступает в электрохимическую реакцию, что вызывает появление тока, величина которого пропорциональна парциальному давлению газа.

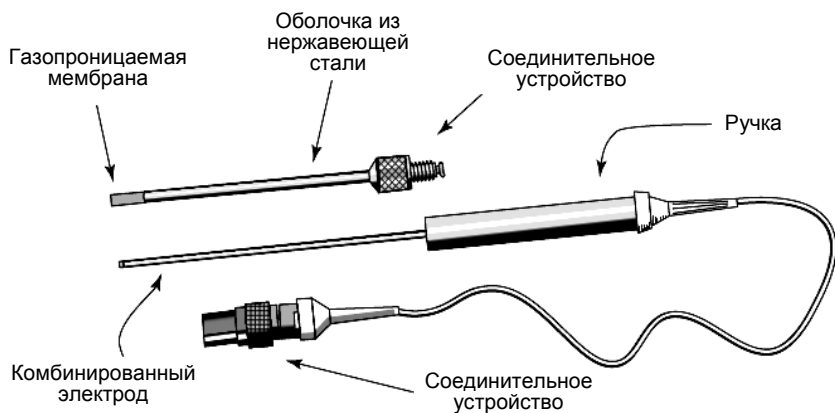
Индикаторные электроды обычно изготавливают из каталитически активных металлов, таких как платина, золото, рутений, палладий, иридий и др. Площадь электродов делают по возможности максимально большой, чтобы как можно большее количество газа вступило в электрохимическую реакцию, поскольку от этого зависит величина сигнала-отклика. Для повышения срока службы и увеличения каталитической активности электродную поверхность модифицируют.

Селективность детекторов газов определяется природой материала индикаторного электрода, точнее, его поверхности и, следовательно, величиной потенциала, при котором протекает электрохимическая реакция. Для повышения селективности отклика поверхность электрода модифицируют соединениями, которые катализируют процесс переноса электронов. Примером детектора на основе химически модифицированных электродов может служить детектор для определения  $\text{NO}_2$  в присутствии  $\text{O}_2$  в выхлопных газах автомобилей. На обычных электродах электровосстановление этих газов происходит при близких потенциалах. На модифицированном фталоцианином кобальта электроде молекулы  $\text{NO}_2$  восстанавливаются при менее отрицательных потенциалах по сравнению с кислородом. На этом же принципе работают детекторы для определения  $\text{SO}_2$  и сероводорода. Определение диоксида серы основано на анодном окислении  $\text{SO}_2$  до  $\text{SO}_3$  на электродах, покрытых  $\text{PbO}_2$ . Для определения сероводорода используют легкость его окисления на каталитически активных электродах. Мембранные амперометрические сенсоры с тонким слоем катализатора, осажденного на поверхности электрода, дают быстрый отклик на  $\text{CO}$ . При косвенном определении  $\text{CO}$  реагирует с  $\text{I}_2\text{O}_5$  в нагретой до  $150^\circ\text{C}$  трубке:



Пары иода поступают в детектор, при этом иод восстанавливается на некаталитических электродах (гладкая платина, углерод) до иодид-иона.

Разработаны детекторы для определения хлора по току его катодного восстановления в положительной области потенциалов ( $+1,1\text{ В}$ ) на электродах из углерода и гладкой платины. В этих условиях  $\text{H}_2\text{S}$  и  $\text{CO}$  не окисляются и не восстанавливаются и, следовательно, не мешают определению. Для определения хлора так же, как и для определения озона, можно использовать его реакцию с иодид-ионами. В дополнение к перечисленным амперометрические детекторы применяются для определения  $\text{HCl}$  по реакции с  $\text{IO}_3^-$  с



**Рис. 4.15.** Детекторы для определения оксида азота *in vivo*

последующим определением иода, а также для определения фосгена и  $\text{ClO}_2$ .

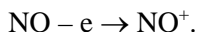
Многие типы детекторов на  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{Cl}_2$  и другие газы используются в качестве персональных детекторов при работе в опасных условиях в промышленности и на транспорте. При превышении заданного уровня концентрации газа они выдают звуковой сигнал. Некоторые из них определяют общую дозу воздействия вредного для здоровья фактора. Они применяются также в системах автоматического контроля за содержанием  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}_x$  в окружающей среде. Серийные приборы часто позволяют определять несколько веществ с помощью одного детектора. Селективность определений в этом случае достигается благодаря использованию сменных мембранных фильтров, выбору катализатора, потенциала электрода, состава раствора электролита, а также другими средствами.

Особый интерес представляют электрохимические детекторы для определения оксида азота – нейротрансмиттера, участвующего в различных биологических процессах. Трудности определения  $\text{NO}$  *in vivo* обусловлены тем, что он имеет короткое время жизни ( $\sim 5$  с) и легко вступает в химические реакции с биологически активными соединениями, такими как супероксиды, кислород, тиолы и др. Наиболее распространенные коммерческие сенсоры для определения оксида азота содержат рабочий электрод из платиновой проволоки и  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ -электрод сравнения. Оба электрода помещают в защитную оболочку из нержавеющей стали (рис. 4.15).

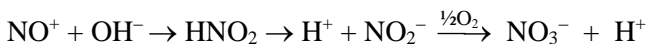
При определении оксида азота устройство погружают в раствор, содержащий оксид азота, который диффундирует через газопроницаемую  $\text{NO}$ -селективную мембрану и окисляется на рабо-



чем электроде при +0,86 В (отн. Ag/AgCl) с образованием катиона нитрозония:



Последний в присутствии ионов  $\text{OH}^-$  образует нитрит-ионы, которые окисляются далее до нитратов:



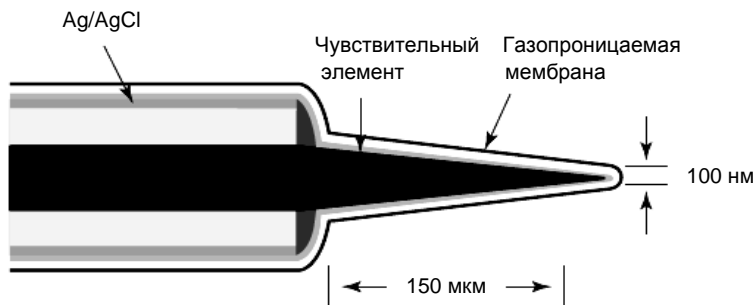
Поскольку концентрация NO в биологических системах имеет исключительно низкие значения, то наблюдаемый ток имеет размерность порядка 1–10 пА. Для его регистрации требуются высокочувствительные приборы, а измерительное устройство помещают в клетку Фарадея.

Кроме электродов из платиновой проволоки для определения NO предложен электрод из углеродного волокна диаметром 500 нм, модифицированный тетракис(3-метокси-4-гидроксифенил)-порфирином и нафионом. Такой электрод позволяет определять до 10 нмоль/л NO и имеет высокую селективность. Для детектирования NO применяются также углеродные дисковые УМЭ, поверхность которых модифицирована пиррольными производными порфирина, содержащими Ni, Pd и Mn. Каталитические свойства по отношению к оксиду азота проявляют и другие порфирины металлов, например железа и кобальта.

Чувствительность и селективность порфиринсодержащих электродов для определения NO зависит не только от потенциала, при котором окисляется NO, но и от природы лиганда и центрального атома, технологии модифицирования поверхности электрода и других факторов. Более того, поскольку поверхность электрода находится в непосредственном контакте со средой, в которой проводится измерение, операционные характеристики последнего зависят от природы биообъекта. Модифицирование поверхности электрода нафионом наряду с металлопорфиринами позволяет минимизировать это влияние. Другая проблема – деградация порфириновой пленки в процессе измерений.

Фталоцианаты Fe, Ni и Co также используются для модифицирования электродной поверхности при определении NO. Они имеют близкие с порфиринами характеристики чувствительности и селективности электродов, но более устойчивы к деградации.

Для определения оксида азота непосредственно в тканях и клетках живых организмов создан УМЭ на основе углеродного волокна диаметром от 7 до 200 мкм, покрытого селективной для NO мембраной. По конструкции он во многом напоминает электрод Кларка для определения кислорода. Применение мембраны устраняет мешающее влияние аскорбиновой кислоты, нитрит-ионов и допамина. Такой электрод позволяет измерять содержание NO даже в артериях и капиллярах кровеносных сосудов. Для этих же це-



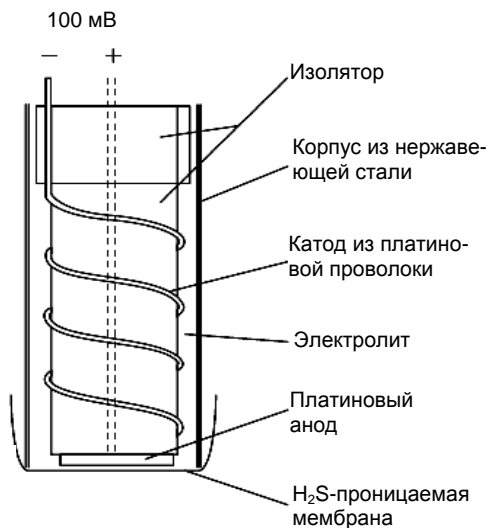
**Рис. 4.16.** Конструкция электрода для определения NO

лей разработаны электроды на основе углеродных волокон диаметром 7 мкм, обработанных аргоновой плазмой, в результате чего кончик такого электрода имеет размер ~100 нм (рис. 4.16).

В качестве модификаторов при создании электродов для определения NO применяются также электропроводящие и неэлектропроводящие полимеры, многослойные мембраны, Ru, Ir и Pd, цитохром *c*, 1,10-фенантролиновые комплексы Co, силоксановые полимеры, нафийон и целлюлоза, ионные полимеры и циклодекстрины, ДНК, гемоглобин и др. Описаны электроды из Pt-проволоки диаметром 10 мкм, модифицированные пленкой Ленгмюра–Блоджа на основе силоксанового полимера, с повышенной чувствительностью к NO. Близкие характеристики имеет Pt-электрод, модифицированный золь-гель пленкой. В зависимости от природы модифицирующего слоя чувствительность детекторов для определения NO может достигать от 100 до 0,03 пА на 1 нмоль/л. Однако высокая чувствительность детектора не всегда означает низкий предел определения NO, поскольку он зависит от концентрации мешающих веществ. Большинство коммерческих приборов позволяют определять NO на уровне 1 нмоль/л.

Модифицированные электроды применяются также в детекторах для определения H<sub>2</sub>S – токсичного вещества, оказывающего ингибирующее действие на гемоглобин и цитохром *c*. Конструктивно такие устройства во многом похожи на детекторы для определения NO (рис. 4.17). В качестве H<sub>2</sub>S-проницаемых мембран используются мембраны толщиной ~25 мкм из поливинилиденхлорида, полиэтилентерефталата, сополимера перфторалкилтетрафторэтилена и фторированного этилена (пропилена), а также мембраны из силиконовых полимеров. Чувствительность детектора – 1 нА на мкмоль/л при pH 7, предел определения – 10 нмоль/л.

Наряду с определением NO и H<sub>2</sub>S модифицированные электроды широко применяются в детекторах для определения O<sub>2</sub>, CO, NO<sub>2</sub> и Cl<sub>2</sub>. В частности, в этих целях разработаны и выпускаются



**Рис. 4.17.** Конструкция детектора для определения  $\text{H}_2\text{S}$

коммерчески доступные датчики на основе конструкции Кларка. В таких датчиках используются рабочие электроды из пирографита с краевыми плоскостями, которые по своим характеристикам не уступают электродам, модифицированным углеродными нанотрубками, и обычные растворители, неспособные выдерживать значительные перепады температур, а также излишне сухие или влажные условия. Срок службы датчиков во многом определяется скоростью высыхания электролита.

В этом плане хорошие перспективы имеют детекторы с электролитами на основе ионных жидкостей (ИЖ), которые способны выдерживать высокую температуру и давление. Применение ионных жидкостей позволяет эксплуатировать детекторы в условиях, когда традиционные растворители изменяют свои физические или химические свойства. При этом ИЖ могут использоваться либо в качестве электролитов, либо модификаторов электродной поверхности. Следует заметить, что благодаря высокой электропроводности ИЖ зачастую отпадает необходимость в использовании фоновых солей. Кроме того, применение ИЖ позволяет детектировать газы, электровосстановление (окисление) которых протекает только в апротонных средах, например аммиак, а также фиксировать одновременно несколько газов, например  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ . Предложена конструкция детектора, в котором отсутствует газопроницаемая мембрана. Ее роль выполняет тонкий слой ионной жидкости толщиной  $\sim 5$  мкм, иммобилизованной на поверхности УМЭ. Различ-

ная скорость диффузии газов в ИЖ позволяет детектировать их последовательно.

## 4.7. ОБ ИНФОРМАЦИОННЫХ РЕСУРСАХ ИНТЕРНЕТА

Развитие сети Интернет предоставило научному сообществу принципиально новые возможности научных контактов и обмена информацией по модифицированным электродам. Лавинообразное увеличение числа пользователей сети, появление новых высокоскоростных каналов, развитие интрасетей – все это сделало Интернет доступным и даже рутинным ресурсом. Благодаря поддержке интернет-центров со стороны российского правительства и различных фондов университеты и академические учреждения имеют практически неограниченный доступ к мировым информационным ресурсам. При желании имеется реальная возможность разместить собственные научные материалы на интернет-сайтах.

Само создание информационных ресурсов стало в настоящее время весьма доступным. Практически все офисные пакеты ведущих разработчиков программного обеспечения имеют интегрированные средства создания web-страниц. Их применение не требует знания специализированных языков программирования – HTML, XML – и сохраняет преемственность с базовыми программами. Например, редакторы FrontPage (Microsoft) или GoLive (Adobe), которые пользователи, работающие с Microsoft Office или PageMaker, могут освоить за считанные дни. Средства создания web-продуктов весьма нетребовательны к компьютерному оснащению, создаваемые страницы легко интегрируются в существующие сайты научных и учебных учреждений и организаций. Безусловно, они могут не иметь того внешнего оформления, которым отличаются проекты профессиональных web-студий, но выполняют основную функцию – предоставление информации. И у нас, и за рубежом большинство сайтов создается самими исследователями, а не специалистами web-дизайна. Иными словами, стартовые позиции в виртуальном информационном пространстве у российских и зарубежных ученых практически одинаковы.

Проблемы интеграции российского пользователя в международное виртуальное научное сообщество связаны с недостатком сведений о том, как это сообщество устроено, каковы «правила игры» в размещении информации и доступе к ресурсам Интернета. К сожалению, в литературе практически отсутствуют материалы, которые могли бы дать консультацию начинающему пользователю в научном Интернете. Особенно это относится к междисциплинарным исследованиям. Электронные ресурсы «распылены» между отдельными традиционными отраслями науки (химия, биология, медицина и т. д.) и могут оставаться неизвестными даже профессионалам.

Все вышесказанное с полным основанием можно отнести к химической сенсорике вообще и к биосенсорике в частности, куда органично вошли разделы аналитической химии, электрохимии, биохимии, биотехнологии, материаловедения и т. д. Основная цель исследований в химической сенсорике – практическая реализация принципов и методов распознавания, в том числе основанных на биомиметике, выражающаяся в создании специализированных аналитических устройств – сенсоров и биосенсоров, интегрирующих компоненты распознавания и средства измерения.

В качестве биологических компонентов, т. е. элементов распознавания, биосенсоры могут включать ферменты, искусственные и природные липидные мембраны, клетки и микроорганизмы, ткани, рецепторы, антитела и антигены, нуклеиновые кислоты. Обычно их определенным образом модифицируют с целью стабилизации и включения в измерительную систему. Это может быть иммобилизация на инертных носителях, ковалентная сшивка с медиаторами электронного переноса, включение в электродноактивный материал, модификация структуры биополимеров и т. д. Помимо собственно создания биосенсоров решения требуют вопросы их практического применения – стабилизация биологических компонентов, влияние сложных по составу матриц (биологические жидкости, объекты окружающей среды, пищевые объекты), в том числе в проточном и проточно-инжекционном вариантах, имплантация в живые организмы и др. За последние 15 лет опубликовано более 4000 статей, посвященных различным аспектам биосенсорике, не считая патентов и монографий. Наблюдается устойчивая тенденция ежегодного увеличения числа публикаций и исследовательских групп, работающих в данной области.

Создание биосенсоров и совершенствование их конструкции – яркий пример междисциплинарного подхода. Как правило, отправной точкой служит биологическая реакция, а предметом исследования – способ трансформации биологического отклика в аналитический, измеряемый и интерпретируемый с помощью электрохимического или какого-либо другого преобразователя. Таким образом, на первом месте стоят чисто аналитические задачи (оценка чувствительности и селективности определений, выбор условий измерения сигнала и т. п.), однако их решение достигается методами, специфичными для биологического материала, при этом требуются специальные знания в соответствующих областях науки – энзимологии, микробиологии, иммунологии и т. д. Возможно, именно поэтому в основном в данной области работают биологи. Например, в нашей стране в области биохимических методов анализа активно работают около 15 научных групп и лишь менее трети этих коллективов возглавляют химики-аналитики. Остальные руководители – специалисты в области кинетики и катализа, биологии и медицины. В то же время основная часть публикаций в обла-

сти биосенсоров приходится именно на аналитические журналы – Analyst, Analytica Chimica Acta, Analytical Letters, Talanta, Electroanalysis, Analytical Chemistry, Журнал аналитической химии. К ним следует добавить специализированные журналы – Biosensors and Bioelectronics, Chemical Sensors and Actuators. В журналах «биологического профиля» – Analytical Biochemistry, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Biotechnology and Bioengineering – публикуются работы, посвященные поверхностному плазмонному резонансу и некоторым аффинным сенсорам, основанным на физических принципах детектирования. С использованием таких сенсоров выпускаются серийные приборы – BIACore™ ([www.bia-core.com/index-anim.html](http://www.bia-core.com/index-anim.html)) – и разработана технология IAsys™, которая появилась в результате сотрудничества ученых Кембриджского университета с компанией GEC-Marconi ([www.affinity-sensors.com](http://www.affinity-sensors.com)) и в настоящее время является собственностью Labsystems. Несмотря на название, согласно рекомендациям IUPAC указанные измерительные системы относятся, по-видимому, не к биосенсорам, поскольку представляют собой достаточно громоздкие приборы, которые включают системы биологического распознавания.

Аналогичная ситуация наблюдается и с виртуальными источниками информации. Если воспользоваться наиболее популярными поисковыми машинами Интернета – AltaVista или HotBot, задав в качестве ключа для поиска слово «биосенсор», то преобладают ссылки на названия статей на сайтах издательств или библиографические списки ученых, а также программы конференций. Поиск будет намного эффективнее, если указать биологический материал – фермент или ДНК, добавив в качестве второго ключа слова «определение» или «сенсор». В этом случае шансы найти интересующую информацию намного выше. Абсолютное большинство ресурсов Интернета в области биосенсоров поддерживается не химиками-аналитиками, а биологами – исследователями, учебно-научными центрами, фирмами, специализирующимися на выпуске медицинского и биотехнологического оборудования.

Все это создает определенные затруднения в получении информации, посвященной вопросам теории и применения сенсоров, особенно для химиков-исследователей. В то же время проблемы развития электронных средств информации в области сенсорики достаточно типичны для междисциплинарных исследований и могут представлять интерес для всех пользователей. Ниже при анализе web-сайтов и представленных на них ресурсов рассмотрены общие тенденции, определяющие развитие Интернета.

#### 4.7.1. Сайты научного Интернета

Главной мотивацией размещения информации в Интернете остается реклама. Информация может размещаться на официальных

страницах научно-исследовательских и образовательных учреждений, реже – на коммерческих сайтах коллективного доступа (например, geocity.com). Если в заголовке страницы отсутствует слово сенсор (биосенсор) или точное указание на область исследований, поиск требует знания фамилий исследователей или точного места их работы. Для примера, рассмотрим использование веб-ресурсов применительно к биосенсорам, хотя аналогичный подход можно применить к химическим сенсорам вообще. Более полный список ссылок приведен в табл. 4.13.

*Официальные страницы* построены весьма традиционно. Они включают краткую биографию руководителя или его послужной список за последние годы, список публикаций и выполняемых грантов, краткое описание области научных интересов, место расположения учреждения, другую контактную информацию. Как правило, такие страницы оформляются web-специалистами, имеют единый дизайн и достаточно продолжительный период обновления (иногда годы). Официальные страницы предполагают наличие административного статуса исследовательской группы – лаборатория, кафедра, научный институт. Примером могут служить сайты Биотехнологического центра (Cranfield, Англия), Института технической биотехнологии университета в Штутгарте (Германия) или Института химических сенсоров и биосенсоров в Мюнстере (Германия). Указанные сайты содержат краткое описание предоставляемых услуг и производимых продуктов – как в области образования, так и в сенсорики. В частности, на сайте Института технической биотехнологии (Штутгарт) приведены фотографии выпускаемых печатных электродов.

Зарубежные сайты обычно строго придерживаются законодательства в области защиты авторских прав и интеллектуальной собственности. Поэтому, если разработка передается для последующего производства, то информация о ней с сайта, как правило, снимается. Так было с глюкозным сенсором Exactec<sup>TM</sup> на основе планарных электродов, модифицированных производными ферроцена, производимым в настоящее время компанией MediSense совместно с Abbott Diagnostics ([www.abbottdiagnostics.com/systems\\_tests](http://www.abbottdiagnostics.com/systems_tests)). В настоящее время на сайте Биотехнологического центра (Cranfield, Англия) имеется только упоминание об авторах этого сенсора и семейства биохимических диагностикумов на основе «сухой» химии DrySpot<sup>TM</sup>, переданных для коммерческого использования фирме Oxoid Ltd.

*Авторские страницы*, в отличие от официальных, разнообразны по оформлению и содержанию. Они поддерживаются самими учеными, что гарантирует профессиональный уровень и быстрое обновление информации, а также, увы, некоторое количество ошибок – как программных (ссылки «в никуда», некачественные графические материалы, неправильное функционирование элементов

**Таблица 4.13. Ресурсы Интернета в области биосенсоров**

Адрес	Организация (руководитель группы)
<a href="http://www.cranfield.ac.uk/biotech/home.htm">www.cranfield.ac.uk/biotech/home.htm</a>	Крэнфилдский биотехнологический центр (проф. А. П. Ф. Тернер)
<a href="http://www.inn7201.casaccia.enea.it/index.htm">www.inn7201.casaccia.enea.it/index.htm</a>	Электрохимические биосенсоры, научный центр ENEA (проф. Р. Пиллотон)
<a href="http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2255/index.htm">www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2255/index.htm</a>	Лаборатория биосенсоров университета Флоренции (проф. М. Маццини)
<a href="http://www.uniroma1.it/bioprobe/">www.uniroma1.it/bioprobe/</a>	Группа биосенсоров университета La Sapienza (проф. Ф. Маззеи)
<a href="http://www.epa.gov/crdlvweb/chemistry/biochem/home4.htm">www.epa.gov/crdlvweb/chemistry/biochem/home4.htm</a>	Группа биосенсоров Американского агентства охраны природы (К. Роджерс)
<a href="http://www.itb.uni-stuttgart.de:8080/">www.itb.uni-stuttgart.de:8080/</a>	Группа по изучению биосенсоров Института технической биохимии университета г. Штутгарт (проф. Р. Шмид)
<a href="http://www.bioeng.ucsd.edu/researchgroups/biosens/public_html/index.html">www.bioeng.ucsd.edu/researchgroups/biosens/public_html/index.html</a>	Группа биосенсоров университета Калифорнии
<a href="http://www.t-rex.bio.rcast.u-tokyo.ac.jp/">www.t-rex.bio.rcast.u-tokyo.ac.jp/</a>	Лаборатория биосенсоров университета Токио (проф. И. Карубе)
<a href="http://www.bapc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html">www.bapc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html</a>	Лаборатория биомолекулярной аналитической и физической химии (проф. Т. Икеда)
<a href="http://www.umich.edu/~michchem/faculty/meyerhoff/">www.umich.edu/~michchem/faculty/meyerhoff/</a>	проф. М. Мейерхофф (Университет штата Мичиган, США)
<a href="http://www.biodesign.asu.edu/centers/bb/">www.biodesign.asu.edu/centers/bb/</a>	проф. Дж. Ванг (Университет штата Аризона, США)
<a href="http://www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/durst/index.html">www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/durst/index.html</a>	проф. А. Дарст (Университет Корнуэлл, США)
<a href="http://www.cnas.ucr.edu/~biochem/faculty/mulchandani.html">www.cnas.ucr.edu/~biochem/faculty/mulchandani.html</a>	проф. А. Мульчандани (Университет штата Калифорния, США)
<a href="http://www.sci.muni.cz/~skladal/">www.sci.muni.cz/~skladal/</a>	проф. П. Шкладал (Технический университет, Брно, Чехия)
<a href="http://www.ucc.ie/ucc/depts/chem/reslab/ana/gguilb.html">www.ucc.ie/ucc/depts/chem/reslab/ana/gguilb.html</a>	проф. Г. Гильбо (университет г. Корк, Ирландия)
<a href="http://www.tau.ac.il/~biotwww/rishpon.html">www.tau.ac.il/~biotwww/rishpon.html</a>	проф. Ю. Ришпон (Университет г. Тель-Авив, Израиль)
<a href="http://www.clarkson.edu/chemistry/faculty/katz">www.clarkson.edu/chemistry/faculty/katz</a>	проф. Е. Кац (Университет Кларксона, Потсдам, штат Нью-Йорк, США)

страницы), так и текстовых. Основное отличие авторских страниц – их содержательность. На них можно найти обзорные материалы по различным аспектам сенсорики, справочную информацию, тексты рефератов диссертаций, слайд-шоу по материалам или тезисам докладов, представленных на конференциях и симпозиумах. Частое



обновление сайтов приводит, к сожалению, к тому, что часть полезной информации по тем или иным соображениям снимается, поэтому исследователям можно рекомендовать регулярно посещать такие сайты, отслеживая изменения.

Интересным является сайт проф. Е. Каца, специализирующегося в области электрохимии кофакторов ферментов и оксидоредуктаз и в разработке биосенсоров на их основе. Сайт содержит справочную информацию о размерах молекул белков и кофакторов, строении их активных центров, таблицы редокс-потенциалов часто используемых медиаторов электронного переноса, ссылки на международные базы данных по ферментам. Список публикаций автора снабжен краткими аннотациями, анонсируется выход новых статей. Статьи (в виде pdf-файлов) предоставляются автором сайта по запросу. Большое количество рисунков и схем и жесткая структурированность материала облегчают восприятие довольно объемного сайта, несмотря на перегруженность анимацией. На сегодняшний день это наиболее интересный сайт, который можно рекомендовать работающим в области оксидоредуктазных биосенсоров. Сайт содержит два on-line учебника. Один, посвященный электрохимии как таковой, может служить пособием для тех, кто делает первые шаги в области электроаналитической химии и биоэлектрохимии. Второй представляет собой аннотированный обзор современного состояния основных проблем в области биоэлектрохимии, естественно, с упором на исследования автора. Учебники содержат также ссылки на соответствующие страницы сайта проф. М. Кардози (Университет Paisley, Шотландия), снятые в настоящее время с открытого доступа. Ранее на них были размещены материалы, посвященные глюкозооксидазе и теории функционирования амперометрических субстратных биосенсоров. Там же был размещен анализ основных публикаций в области биосенсоров и подходов к их созданию.

Помимо упомянутых сайтов Е. Каца и М. Кардози, к авторским можно отнести и сайт проф. Р. Пиллотона, возглавляющего научную группу по электрохимическим биосенсорам, работающую в рамках межуниверситетского проекта ENEA в Италии. На нем представлены перечень ссылок на ресурсы Интернета, библиография по основным направлениям применения электрохимических биосенсоров (медицина, эколого-аналитический контроль, методы изготовления печатных электродов, сенсоры на основе тилакоидных мембран для определения гербицидов и т. д.), статьи автора, краткие обзоры, имеющие отношение ко II Итальянскому симпозиуму по биосенсорам, а также подборка фотографий и др. Сайт имеет удобную навигацию и предоставляет весьма редкую возможность «скачать» его целиком в виде архива после бесплатной электронной регистрации. К числу авторских сайтов можно отнести и

некоторые другие, посвященные, например, иммунохимическим сенсорам.

*Корпоративные сайты.* К этой группе относятся сайты «коллективного пользования», обслуживающие не отдельные научные группы, а определенные направления. Вероятно, только один сайт полностью соответствовал указанному подходу – это BIX (Biosensor Information Exchange), поддерживаемый Т. Бахманом и А. Узедомом, которые работают под руководством проф. Р. Шмидта в Институте технической биохимии (Штутгарт). Сайт имел институт коллективного и индивидуального членства и к моменту закрытия насчитывал более 100 зарегистрированных пользователей – фирм, научных групп и исследователей. Пользователи имели возможность бесплатного размещения контактной информации и небольшого обзора собственных исследований. На сайте регулярно размещались информация о конференциях, вакансиях и предложениях по трудоустройству, подборки библиографии в некоторых областях конструирования и применения биосенсоров. Зарегистрированные пользователи имели возможность рассылки запросов и объявлений участникам проекта по электронной почте. Главным достоинством сайта была его популярность, «раскрученность», причем не только среди известных, но и начинающих ученых. К сожалению, сейчас под старым URL-адресом размещена реклама основного web-дизайнера BIX – А. Узедома, не связанная с тематикой сайта. Впрочем, в частной беседе соавтор сайта Т. Бахман не отрицал возможности возобновления его работы при достаточном финансировании.

Уже упоминавшийся проф. Р. Пиллотон в течение ряда лет пытается организовать виртуальное сообщество, объединяющее ученых, работающих в области биосенсоров. С этой целью на его сайте установлен шаблон BioSensing Net, позволяющий унифицировать дизайн первой страницы и проводить прямой обмен информацией между членами проекта. Насколько известно, пока эта идея не получила широкого распространения и сеть ограничена фактически двумя-тремя группами итальянских ученых, разместивших баннер BioSensing Net на своих официальных страницах.

Достаточно широко в Интернете представлены материалы симпозиумов Biosensor Stability. Они проводились при финансовой поддержке программы ЕС «Технологии в промышленности и материаловедении» (BRITE-EURAM) в конце 1990-х годов, однако тематические страницы до сих пор остаются на сайтах участников, например Института химических сенсоров и биосенсоров (Мюнстер, Германия, [www.unimuenster.de/ChemoBioSensorik/CA-Biosensors/welcome.html](http://www.unimuenster.de/ChemoBioSensorik/CA-Biosensors/welcome.html)). Представлены также некоторые проекты ИНТАС в области биохимических тестов, в том числе с участием российских ученых. Интересен опыт организаторов школы молодых ученых «ELBA» ([www.inapg.inra.fr/ensrech/siab/asteq/elba/elba](http://www.inapg.inra.fr/ensrech/siab/asteq/elba/elba)

[index.htm](#)), представивших на сайте иллюстрированные лекции ведущих ученых по различным аспектам иммуноанализа и конструирования биосенсоров.

*Сайты производителей оборудования.* К середине 1990-х годов глюкозные анализаторы выпускали более 20 фирм, в том числе такие крупные компании как Bayer ([www.glucometer.com](http://www.glucometer.com)), Roche Diagnostics ([www.roche.com/diagnostics](http://www.roche.com/diagnostics)) и MediSense. Можно упомянуть также сайты [www.lifescan.com](http://www.lifescan.com) (компания Johnson and Johnson) и [www.therasense.com](http://www.therasense.com) (TheraSense). Фирмы Yellow Spring Instruments (YSI Inc.), Accusport и ряд других производят анализаторы молочной кислоты ([www.lactate.com](http://www.lactate.com)) и некоторых других метаболитов. Разработаны биосенсорные системы на основе микроорганизмов, используемые для контроля токсичности сточных вод, направляемых на биологическую очистку. Сайты интересны прежде всего тем пользователям, которые рассчитывают на внедрение собственных разработок. Они позволяют получить необходимую информацию о конкуренции на рынке средств измерения, требованиях, предъявляемых к конечному продукту со стороны потребителей – медицинских учреждений или пациентов, показателей, которые непосредственно влияют на потребительские свойства и в конечном итоге на цену изделия. В настоящее время многие глюкометры при сохранении коммерческих марок производятся фирмами Abbott и Rosche Diagnostics. Ссылки на сайты производителей электрохимических приборов, электродов, сенсоров и вспомогательного оборудования приведены в табл. 4.14.

В нашей стране, по-видимому, пока можно говорить лишь о распространении зарубежных продуктов биосенсорных технологий. Ссылки на представительства фирм в России можно найти на сайтах химического факультета МГУ и Научного совета РАН по аналитической химии ([www.geokhi.ru/~rusanalytchem](http://www.geokhi.ru/~rusanalytchem)). Большой перечень отечественных и зарубежных производителей аналитического оборудования, а также их представителей в России приведен на сайте Ю. Жданова ([www.instruments.ru](http://www.instruments.ru)).

*Вспомогательные ресурсы.* Химику-исследователю необходимы профессиональные знания из разделов биологии и областей практического использования биосенсоров (медицины, эколого-аналитического контроля, биотехнологии) об особенностях биохимических превращений определяемых соединений *in vivo* и *in vitro*, экологическом нормировании загрязнителей, устойчивости токсикантов в окружающей среде, технологическом контроле в микробиологической и фармацевтической промышленности, величинах ПДК и нормативном регулировании производства и применения биологически активных препаратов. Ссылки на эти ресурсы широко представлены в Интернете, их можно найти с помощью поисковых систем, а также на специализированных корпоративных сайтах типа ChemWeb или PubMedNet. Часть информации, посвященной

**Таблица 4.14. Ресурсы Интернета в сфере производителей электрохимических приборов и оборудования**

Адрес	Фирма
<a href="http://www.bioanalytical.com/">www.bioanalytical.com/</a>	BAS
<a href="http://www.princetonappliedresearch.com/">www.princetonappliedresearch.com/</a>	PAR
<a href="http://www.achema.sg/electrochemical.htm">www.achema.sg/electrochemical.htm</a>	ECHEMA
<a href="http://www.palmsens.com">www.palmsens.com</a>	PalmSense
<a href="http://www.ecochemie.nl/">www.ecochemie.nl/</a>	ECOCHÉMIE (AUTOLAB Instruments)
<a href="http://www.sycopel.com/">www.sycopel.com/</a>	Sycopel Scientific Ltd.
<a href="http://www.g-e-m.com/products.html">www.g-e-m.com/products.html</a>	Gwent Electronic Materials
<a href="http://www.ebsr.it/default_eng.html">www.ebsr.it/default_eng.html</a>	EcoBioServices
<a href="http://www.windsorscientific.co.uk">www.windsorscientific.co.uk</a>	Windsor Scientific
<a href="http://www.bst-biosensor.de">www.bst-biosensor.de</a>	BST
<a href="http://www.kanichi-research.com/">www.kanichi-research.com/</a>	Kanichi Research
<a href="http://www.pineinst.com/echem">www.pineinst.com/echem</a>	Pine Research Instrumentation
<a href="http://www.sypresssystems.com/">www.sypresssystems.com/</a>	Sypress Systems

биологическим сенсорам, которая, на наш взгляд, полезна химикам, работающим в этой области, приведена в табл. 4.15. Можно рекомендовать также сайт Агентства по охране окружающей среды США (EPA USA), содержащий не только страницы, посвященные исследованиям в области биосенсоров (группа К. Роджерса), но и обширную информацию по регламентированию содержания загрязняющих веществ в окружающей среде. Разнообразная информация представлена на сайте ECDIN, созданном Объединенным научным центром ЕС и программой в области природоохранных исследований ISPRA ([www.ulisse.etoit.eudra.org/Ecdin/Ecdin.html](http://www.ulisse.etoit.eudra.org/Ecdin/Ecdin.html)), а также на специализированных сайтах ASDL – библиотеки по аналитической химии ([www.asdlib.org/list.php](http://www.asdlib.org/list.php)).

*Российский Интернет.* Можно говорить лишь об отдельных страницах, содержащих минимум информации – составе научного коллектива, перечне опубликованных работ и выигранных грантов, законченных и продолжающихся исследованиях. Это страницы Лаборатории биосенсоров и биоэлектроники (А. А. Карякин, [www.enzyme.chem.msu.ru/biosens](http://www.enzyme.chem.msu.ru/biosens)), Лаборатории иммунохимических методов анализа (С. А. Еремин, [www.enzyme.chem.msu.ru/eremin](http://www.enzyme.chem.msu.ru/eremin)) Московского государственного университета, ВНТК «Биосенсоры» Пущинского биологического центра (А. Н. Решетилов, [www.biosens.ibpm.serpukhov.ru](http://www.biosens.ibpm.serpukhov.ru)), Института физико-химической медицины (А. И. Арчаков, [www.ibmh.msk.su/research.htm](http://www.ibmh.msk.su/research.htm)).

**Таблица 4.15. Вспомогательные ресурсы Интернета в области биосенсоров**

Название	Адрес	Краткое описание
ChemFinder	<a href="http://www.chemfinder.camsoft.com">www.chemfinder.camsoft.com</a>	Специализированная поисковая система
ENTREZ	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez">www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez</a>	Доступ к системе поиска научной литературы PubMed, базе данных строения белков Genbank, базе данных on-line по трехмерному строению молекул
WEBMOLECULES	<a href="http://www.webmolecules.com/index.shtml">www.webmolecules.com/index.shtml</a>	Компьютерное моделирование строения молекул on-line
PROMISE	<a href="http://www.bioinf.leeds.ac.uk/promise/MAIN.html">www.bioinf.leeds.ac.uk/promise/MAIN.html</a>	Номенклатура и строение ферментов
BRENDA	<a href="http://www.industry.ebi.ac.uk/contrib/pfmp/brenda/cc_index.html">www.industry.ebi.ac.uk/contrib/pfmp/brenda/cc_index.html</a>	Номенклатура и строение ферментов
GLOSSARY	<a href="http://www.filebox.vt.edu/cals/cses/chagedor/glossary.html">www.filebox.vt.edu/cals/cses/chagedor/glossary.html</a>	Словарь терминов в сельскохозяйственной и природоохранной биотехнологии
NAL-USDA	<a href="http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/Biotech">www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/Biotech</a>	Информационный биотехнологический центр Национальной сельскохозяйственной библиотеки США
ESTHER	<a href="http://www.ensam.inra.fr/cholinesterase">www.ensam.inra.fr/cholinesterase</a>	Сайт посвящен строению и функционированию холинэстераз

Русскоязычные информационные ресурсы частично дополняет сайт [chem.kcn.ru](http://chem.kcn.ru), поддерживаемый в Казанском государственном университете в рамках проекта «Научная Казань». Исследования в области биосенсорики в Казанском университете ведутся с начала 1980-х годов. Фактически в то же время был создан первый в Советском Союзе учебно-научный центр, который приступил к разработке ферментных сенсоров. За прошедший период сотрудниками центра опубликованы свыше 80 научных статей, получены 10 патентов, защищены 10 кандидатских и 2 докторских диссертации. В настоящее время исследования ведутся на трех факультетах и четырех кафедрах университета по различным направлениям иммуноанализа, создания ферментных, иммуно- и ДНК-сенсоров с электрохимическим и оптическим детектированием. Сайт подробно представляет исследовательский коллектив, библиографию опубликованных работ. Помимо обязательных элементов сайт содержит также содержательную информацию, включающую тексты авторе-

фератов диссертаций в области биосенсоров, мини-обзоры, а также библиографическую базу данных открытого доступа, которая содержит более 4000 статей по различным аспектам создания и применения биосенсоров. Основной упор сделан на электрохимические биосенсоры, однако представлены также статьи, посвященные физическим и оптическим сенсорам, использованию нативных ферментов для определения биологически активных веществ. Имеется возможность поиска по автору, контексту и ключевым словам (по принципу детектирования, биологическому объекту, области применения биосенсоров).

#### **4.7.2. Проблемы развития web-ресурсов**

Несмотря на очевидную востребованность научным сообществом, особенно у молодых ученых, развитие научного Интернета, в том числе в области сенсорики, протекает далеко не просто. Можно выделить узловые проблемы, определяющие развитие Интернета.

*Авторские права.* Доступность web-ресурсов создает проблемы с точки зрения охраны интеллектуальной собственности и авторских прав. Дело даже не в том, что отсутствует законодательная база. На сегодняшний день принят необходимый минимум законов и законодательных актов, достаточных для решения указанной задачи. Проблема заключается в другом. В своем большинстве содержательная информация, имеющаяся у автора, публикуется или готовится к публикации традиционным образом – в журналах, монографиях, сборниках статей и т. д. Следовательно, права на информацию и способ ее представления переданы издательствам. Естественно, издатели негативно относятся к дублированию статей в Интернете, даже при условии их существенного изменения. В большинстве соглашений на передачу прав, заключаемых с издательствами, оговаривается недопустимость размещения материалов или их части в Интернете без согласования с издателями аналогично разрешению на иное копирование. Поэтому авторы стоят перед выбором – разместить результаты исследований в «бумажном» журнале, имеющем известную репутацию, импакт-фактор, влияющий на цитирование, или в Интернете, с неочевидными последствиями относительно сохранения авторских прав и др. Следует учитывать, что традиционные бумажные публикации являются важным инструментом оценки научного «веса» исследователя и его группы, например при конкурсном отборе заявок на гранты, присуждении ученых степеней и званий и т. д. Электронные публикации пока такого веса не имеют.

Нельзя не сказать, что ситуация меняется. С одной стороны, международные издательства, осознав неотвратимость и определенные преимущества перемен, активно и быстро осваивают Ин-

тернет – это и параллельные электронные версии журналов, доступные для подписчиков, и мощные поисковые системы, позволяющие отбирать статьи определенной тематики по электронным каталогам. Тем не менее размещение в Интернете в открытом доступе полнотекстовых аутентичных версий статей скорее исключение, чем правило. Например, в области биосенсоров примером являются web-страницы Лаборатории биосенсоров, возглавляемой К. Роджером в Агентстве по охране окружающей среды США и сайт Р. Пиллотона, содержащий некоторые статьи on-line. Возможным направлением развития web-ресурсов можно считать более активное размещение материалов, права на которые остаются у авторов (при их доброй воле, конечно). Речь идет об авторефератах диссертаций, самих диссертациях, а также материалах различных конференций. Помимо популяризации исследований подобные материалы – важный элемент информационного сопровождения соответствующих научных мероприятий. Периодически такая информация размещается на всех основных сайтах в области сенсорной тематики. Так, за последние два года можно обнаружить по меньшей мере три диссертации, размещенные в полном объеме (в HTML или pdf-файлах) на зарубежных web-сайтах. Однако они доступны, как правило, лишь короткое время.

Второй важный источник информации в Интернете – *учебный процесс*. Преподаватель высшей школы в процессе разработки учебных курсов накапливает материалы для самостоятельной работы студентов – конспекты лекций, темы лабораторных и курсовых работ, описания лабораторных практикумов, учебные материалы к семинарам и т. д. Эти материалы представляют огромный интерес именно для той части научной аудитории, которая активно пользуется Интернетом, – для молодых начинающих исследователей. Именно так появились учебники on-line на сайте проф. Е. Каца – они расположены на закладке «Страницы для студентов». Наиболее распространены такие материалы на сайтах американских университетов, имеющих наиболее развитую интрасеть. На 90 % это внутренняя информация университетов, призванная обеспечивать поддержку конкретных учебных курсов. Интернет обеспечивает всю полноту мультимедийной поддержки учебных курсов. Но мультимедийные средства обучения – область профессионального программирования, в которой одним опытом работы только с офисными приложениями уже не обойтись.

Авторы книги предлагали создать архив авторефератов диссертаций, защищенных в области сенсорики, однако пока это предложение не нашло понимания не только у соискателей, но и их научных руководителей.

Хочется надеяться, что по мере развития интернет-технологий, расширения доступа в сети ученые России преодолеют «детские

болезни роста», сумеют воплотить в жизнь те реальные преимущества, которые имеются на сегодняшний день, – богатые традиции в естественнонаучных исследованиях, мобильность и гибкость в усвоении нового. Надежда на оптимистичный исход такого прогноза – быстрое увеличение числа молодых пользователей Интернета, причем не только пассивных. Многие из них стремятся к созданию авторских сайтов и страниц, в том числе научных.



# Литература

## Введение

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. 614 с.
2. *Брайнина Х. З., Нейман Е. Я., Слепушкин В. В.* Инверсионные электроаналитические методы. – М.: Химия, 1988. 240 с.
3. *Бонд А. М.* Поляррографические методы в аналитической химии. – М.: Химия, 1983. 328 с.
4. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р.* Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
5. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрoэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
6. *Галюс З.* Теоретические основы электрохимического анализа. – М.: Мир, 1974. 552 с.
7. *Дамаскин Б. Б., Петрий О. А., Батраков В. В.* Адсорбция органических соединений на электродах. – М.: Наука, 1968. 334 с.
8. *Каплан Б. Я.* Импульсная поляррография. – М.: Химия, 1978. 240 с.
9. *Каплан Б. Я., Пац Р. Г., Салихджанова Р. М.-Ф.* Вольтамперометрия переменного тока. – М.: Химия, 1985. 264 с.
10. *Каттралл Р. В.* Химические сенсоры. – М.: Научный мир, 2000. 144 с.
11. *Лисичкин Г. В., Фадеев А. Ю., Сердан А. А. и др.* Химия привитых поверхностных соединений. – М.: Физматлит, 2003. 592 с.
12. *Майрановский С. Г.* Каталитические и кинетические волны в поляррографии. – М.: Наука, 1966. 289 с.
13. *Марьянов Б. М.* Избранные главы хеометрики. – Томск: Изд-во ТГУ, 2004. 166 с.
14. *Сергеев Г. Б.* Нанохимия. – М.: Изд-во МГУ, 2003. 288 с.
15. *Турьян Я. И.* Химические реакции в поляррографии. – М.: Химия, 1980. 332 с.
16. *Турьян Я. И., Рувинский О. Е., Зайцев П. М.* Поляррографическая каталиметрия. – М.: Химия, 1998. 272 с.
17. *Фрайден Дж.* Современные датчики. Справочник. – М.: Техносфера, 2006. 592 с.
18. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005. 336 с.
19. Электроаналитические методы. Теория и практика / Под ред. Ф. Шольца; Пер. с англ. под ред. В. Н. Майстренко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. 326 с.

20. *Bard A. J., Faulkner L. R.* Electrochemical methods. Fundamentals and application. – New York, Chichester: John Wiley, 2001. 856 p.
21. Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. 974 p.
22. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. 593 p.
23. *Murray R. W.* Molecular design of electrode surfaces. – New York: John Wiley, 1992. 371 p.
24. *Roberts G. G.* Langmuir-Blodgett films. – New York: Plenum Press. 1990. 232 p.
25. *Stefan R.-I., Van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y.* Electrochemical sensors in bioanalysis. – New York – Basel: Marcel Dekker, 2001. 288 p.
26. *Wang J.* Analytical Electrochemistry. – West Sussex, UK: John Wiley, 2000. 232 p.

## Глава 1

### Раздел 1.1

1. *Брайнина А. З.* // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. С. 344.
2. *Будников Г. К.* // Там же. 1996. Т. 51. С. 374.
3. *Будников Г. К., Майстренко В. Н.* // Концентрирование следов органических соединений. – М.: Наука, 1990. С. 64.
4. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорезисторами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
5. *Каменев А. И., Орлов С. Е., Ляхов А. Б.* // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. С. 962.
6. *Лабуда Я.* // Там же. 1990. Т. 45. С. 629.
7. *Улахович Н. А., Медянцева Э. П., Будников Г. К.* // Там же. 1993. Т. 48. С. 980.
8. *Фрайден Дж.* Современные датчики. Справочник. – М.: Техносфера, 2006. 592 с.
9. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005. 336 с.
10. *Albareda-Sirvent M., Merkoçi A., Alegret S.* // Sensors Actuators B. 2000. Vol. 69. P. 153.
11. *Brainina Kh. Z.* // Anal. Chim. Acta. 1995. Vol. 305. P. 146.
12. *Brainina Kh. Z., Bond A. M.* // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 2586.
13. *Brainina Kh., Henze G., Stojko N., Malakhova N.* // Fresenius J. Anal. Chem. 1999. Vol. 364. P. 285.
14. *Carregalo S., Merkoçi A., Alegret S.* // Mikrochim. Acta. 2004. Vol. 147. P. 245.
15. Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. Amsterdam: Elsevier, 2006. 974 p.
16. *De Oliveira M. F. F., Saczk A. A., Okumura A. P. et al.* // Anal. Bioanal. Chem. 2004. Vol. 380. P. 135.
17. *Di J., Zhang F., Zhang M., Bi S.* // Electroanalysis. 2004. Vol. 16. P. 644.

18. *Einaga Y., Sato R., Olivia H. et al.* // *Electrochim. Acta.* 2004. Vol. 49. P. 3989.
19. *Gong K., Yan Y., Zhang M. et al.* // *Anal. Sci.* 2005. Vol. 21. P. 1383.
20. *Gooding J. J.* // *Electrochim. Acta.* 2005. Vol. 50. P. 3049.
21. *Hart J. P., Wring S. A.* // *Trends Anal. Chem.* 1997. Vol. 16. P. 89.
22. *Hart J. P., Crew A., Crouch E. et al.* // *Anal. Lett.* 2004. Vol. 37. P. 789.
23. *Honeychurch K. C., Hart J. P.* // *Trends Anal. Chem.* 2003. Vol. 22. P. 456.
24. *Kalcher K., Kauffmann J.-M., Wang J. et al.* // *Electroanalysis.* 1995. Vol. 7. P. 5.
25. *Krolicka A., Bobrowski A., Kalcher K. et al.* // *Ibid.* 2003. Vol. 15. P. 1859.
26. *Merkoçi A., Pumera M., Lopis X. et al.* // *Trends Anal. Chem.* 2005. Vol. 24. P. 826.
27. *Moreno L., Merkoçi A., Alegret S.* // *Electrochim. Acta.* 2003. Vol. 48. P. 2599.
28. *O'Connell P. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G.* // *Anal. Chim. Acta.* 1998. Vol. 373. P. 261.
29. *Palchetti I., Cagnini A., Mascini M., Turner A. P. F.* // *Mikrochim. Acta.* 1999. Vol. 131. P. 65.
30. *Panizza M., Cerisola G.* // *Electrochim. Acta.* 2005. Vol. 51. P. 191.
31. *Renedo O. D., Alonso-Lomillo M. A., Martínez M. J. A.* // *Talanta.* 2007. Vol. 73. P. 202.
32. *Sun D., Zhu L., Zhu G.* // *Anal. Chim. Acta.* 2006. Vol. 564. P. 243.
33. *Valentini F., Amine A., Orlanducci S. et al.* // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. P. 5413.
34. *Wang J.* *Analytical Electrochemistry.* – West Sussex, UK: John Wiley, 2000. 232 p.
35. *Welford P. J., Freeman J., Wilkins S. J. et al.* // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 6088.
36. *Yantasee W., Deibler L. A., Fryxell G. E. et al.* // *Electrochem. Commun.* 2005. Vol. 7. P. 1170.

## Раздел 1.2

1. *Будников Г. К., Майстренко В. Н.* // Концентрирование следов органических соединений. – М.: Наука, 1990. С. 64.
2. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. 614 с.
4. *Гендриксон О. Д., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.* // *Успехи биолог. химии.* 2006. Т. 46. С. 149.
5. *Золотов Ю. А., Цизин Г. И., Дмитриенко С. Г., Моросанова Е. И.* Сорбционное концентрирование микрокомпонентов из растворов: применение в неорганическом анализе. – М.: Наука, 2007. 320 с.
6. *Майстренко В. Н., Гусаков В. Н., Будников Г. К.* // *Журн. аналит. химии.* 1996. Т. 51. С. 1010.
7. *Майстренко В. Н., Гусаков В. Н., Сангалов Е. Ю.* // Там же. 1995. Т. 50. С. 582.

8. Майстренко В. Н., Сапельникова С. В., Кудашева Ф. Х. // Там же. 1999. Т. 54. С. 267.
9. Майстренко В. Н., Сапельникова С. В., Ильясова Р. Р., Кудашева Ф. Х. // Аналитика и контроль. 2000. Т. 4. С. 187.
10. Тарасевич М. Р. Электрохимия углеродных материалов. — М.: Наука, 1984. 253 с.
11. Шайдарова Л. Г., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. С. 1014.
12. Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. приклад. химии. 2003. Т. 76. С. 783.
13. Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. С. 651.
14. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. — М.: Техносфера, 2005. 336 с.
15. Adhikari B., Majumdar S. // Prog. Polym. Sci. 2004. Vol. 29. P. 699.
16. Andersson L. I. // J. Chromat. A. 2000. Vol. 739. P. 163.
17. Brinker C. J., Sherer G. W. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. — Boston: Acad. Press, 1990. 352 p.
18. Campanella L., De Luca S., Sammartino M. P., Tomassetti M. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 385. P. 59.
19. Chen S. M., Peng K. T., Lin K. C. // Electroanalysis. 2005. Vol. 17. P. 319.
20. Collinson M. M. // Trends Anal. Chem. 2002. Vol. 21. P. 31.
21. Collinson M. M., Howells A. R. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 702A.
22. Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. 974 p.
23. Cosnier S. // Anal. Bioanal. Chem. 2003. Vol. 377. P. 507.
24. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. 593 p.
25. Dickert F. L., Hayden O. // Trends Anal. Chem. 1999. Vol. 18. P. 192.
26. Gerard M., Chaubey A., Malhotra B. D. // Biosens. Bioelectron. 2002. Vol. 17. P. 345.
27. Goyal R. N., Gupta V. K., Bachheti N. // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 597. P. 82.
28. Gupta R., Chaudhury N. K. // Biosens. Bioelectron. 2007. Vol. 22. P. 2387.
29. Guo Y., Guadalupe A. R. // Sensors Actuators B. 1998. Vol. 46. P. 213.
30. Hanrahan G., Patila D. G., Wang J. // J. Environ. Monit. 2004. Vol. 6. P. 657.
31. Haupt K. // Analyst. 2001. Vol. 126. P. 747.
32. Kan J., Pan X., Chen C. // Biosens. Bioelectron. 2004. Vol. 19. P. 1635.
33. Kandimalla V. B., Tripathi V. S., Ju H. X. // Crit. Rev. Anal. Chem. 2006. Vol. 36. P. 73.
34. Krajewska B. // Enzyme Microb. Technol. 2004. Vol. 35. P. 126.
35. Kulesza P. J., Malik M. A., Schmidt R. et al. // J. Electroanal. Chem. 2000. Vol. 487. P. 57.
36. Lev O., Tsionsky M., Rabinovich L. et al. // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 22A.
37. Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry / Ed. B. Sellergren. — Amsterdam: Elsevier, 2001. 582 p.

38. Merkoçi A., Alegret S. // Trends Anal. Chem. 2002. Vol. 21. P. 717.
39. Oliveira-Brett A. M., Chiorcea A.-M. // Langmuir. 2003. Vol. 19. P. 3830.
40. Piletsky S. A., Aloccock S., Turner A. P. F. // Trends Biotechnol. 2001. Vol. 19. P. 9.
41. Rabinovich L., Lev O. // Electroanalysis. 2001. Vol. 13. P. 265.
42. Ricci F., Paleschi G. // Biosens. Bioelectron. 2005. Vol. 21. P. 389.
43. Roberts G. G. Langmuir-Blodgett films. — New York: Plenum Press. 1990. 232 p.
44. Schuhmann W. // Rev. Mol. Biotech. 2002. Vol. 82. P. 425.
45. Stradiotto N. R., Yamanaka H., Zandoni M. V. B. // J. Braz. Chem. Soc. 2003. Vol. 14. P. 159.
46. Tuñón-Blanco P. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. Vol. 378. P. 1922.
47. Ulbricht M. // Polymer. 2006. Vol. 47. P. 2217.
48. Vidal J. C., Garsia-Ruiz E., Castillo J. R. // Mikrochim. Acta. 2003. Vol. 143. P. 93.
49. Walkarius A. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 384. P. 1.
50. Wang J. Analytical Electrochemistry. — West Sussex, UK: John Wiley, 2000. 232 p.
51. Wang B., Li B., Deng Q., Dong S. // Anal. Chem. 1998. Vol. 70. P. 3170.
52. Weetall H. H., Rogers K. R. // Talanta. 2004. Vol. 62. P. 329.
53. Xu J., Granger M. C., Chen Q. et al. Anal. Chem. 1997. Vol. 69. P. 591A.
54. Yang R., Qian Z. B., Deng J. Q. // J. Electrochem. Soc. 1998. Vol. 145. P. 2231.
55. Zhang L., Dong S. // J. Electroanal. Chem. 2004. Vol. 568. P. 189.
56. Zhao Q., Gan Z., Zhuang Q. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14. P. 1609.
57. Zheng H., Yan Zh., Dong H., Ye B. // Sensors Actuators B. 2007. Vol. 120. P. 603.

## Глава 2

### Раздел 2.1

1. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р. Основы современного электрохимического анализа. — М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорезисторами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Евтугин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е. Основы биосенсорики. — Казань: Изд-во КГУ, 2007. 86 с.
4. Каттралл Р. В. Химические сенсоры. — М.: Научный мир, 2000. 144 с.
5. Фрайден Дж. Современные датчики. Справочник. — М.: Техносфера, 2006. 592 с.
6. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. — М.: Техносфера, 2005. 336 с.
7. Электроаналитические методы. Теория и практика / Под ред. Ф. Шольца; Пер. с англ. под ред. В. Н. Майстренко. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. 326 с.

## Раздел 2.2

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. 614 с.
2. Будников Г. К., Каргина О. Ю., Абдуллин И. Ф. // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. С. 1733.
3. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р. Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
4. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
5. Будникова Ю. Г., Будников Г. К. // Журн. общей химии. 1995. Т. 65. С. 1517.
6. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005. 336 с.
7. Bakker E., Qin Y., // Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 3965.
8. Chaubey A., Malhotra B. D. // Biosens. Bioelectron. 2002. Vol. 17. P. 441.
9. Efimov O. N., Strelets V. V. // Coord. Chem. Rev. 1990. Vol. 99. P. 15.
10. Karyakin A. A. // Electroanalysis. 2001. Vol. 13. P. 813.
11. Karyakin A. A. // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 411.
12. Karyakin A. A., Bobrova O. A., Karyakina E. E. // J. Electroanal. Chem. 1995. Vol. 399. P. 179.
13. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. P. 2419.
14. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Schmidt H.-L. // Electroanalysis. 1999. Vol. 11. P. 149.
15. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Schuhmann W., Schmidt H.-L. // Ibid. P. 553.
16. Katz E., Riklin A., Heleg-Shabtai V. et al. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 385. P. 45.
17. Katz E., Willner I., Kotlyar A. B. // J. Electroanal. Chem. 1999. Vol. 479. P. 64.
18. Kaufman F. B., Schroeder A. H., Engler E. M. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1980. Vol. 102. P. 1483.
19. Shono T. // Tetrahedron. 1984. Vol. 40. P. 811.

## Раздел 2.3

1. Брайнина Х. З., Нейман Е. Я., Слепушкин В. В. Инверсионные электроаналитические методы. – М.: Химия, 1988. 240 с.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р. Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
3. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.

4. Дамаскин Б. Б., Петрий О. А., Батраков В. В. Адсорбция органических соединений на электродах. – М.: Наука, 1968. 334 с.
5. Лабуда Я. // Журн. аналит. химии. 1990. Т. 45. С. 629.
6. Майстренко В. Н., Гусаков В. Н., Сангалов Е. Ю. // Там же. 1995. Т. 50. С. 582.
7. Майстренко В. Н., Гусаков В. Н., Будников Г. К. // Там же. 1996. Т. 51. С. 1010.
8. Электроаналитические методы. Теория и практика / Под ред. Ф. Шольца; Пер. с англ. под ред. В. Н. Майстренко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. 326 с.
9. Brainina Kh. Z., Kositzina A. N., Ivanova A. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 643.
10. Economou A., Fielden P. R. // Analyst. 2003. Vol. 128. P. 205.
11. Ferancová A., Labuda J. // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. Vol. 370. P. 1.
12. Fogg A. G., Zanon M. V. B., Barros A. A. et al. // Electroanalysis. 2000. Vol. 12. P. 1227.
13. Kalvoda R. // Electroanalysis. 2000. Vol. 12. P. 1207.
14. Merkoçi A., Alegret S. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 143.
15. Navratilova Z., Kula P. // J. Solid State Electrochem. 2000. Vol. 4. P. 342.
16. Ruckenstein E., Li Z. F. // Adv. Colloid Interface Sci. 2005. Vol. 113. P. 43.
17. Walcarius A., Devoy J., Bessiere J. // Ibid. P. 330.
18. Walcarius A., Rozanska S., Bessière J., Wang J. // Analyst. 1999. Vol. 124. P. 1185.
19. Wang J. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 131.

## Раздел 2.4

1. Будников Г. К., Евтюгин Г. А., Будникова Ю. Г., Альфонсов В. А. // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. С. 6.
2. Avramescu A., Noguer T., Magearu V., Marty J.-L. // Anal. Chim. Acta. 2001. Vol. 433. P. 81.
3. Halliwell C.M., Simon E., Toh C.-S. et al. // Anal. Chim. Acta. 2002. Vol. 453. P. 191.
4. Hofstetter H., Hofstetter O. // Trends Anal. Chem. 2005. Vol. 24. P. 869.
5. Kwan R. C. H., Hon P. Y. T., Renneberg R. // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 523. P. 81.
6. Motonaka J., Katumoto Y., Ikeda S. // Anal. Chim. Acta. 1998. Vol. 368. P. 91.
7. Narasaiah D., Spohn U., Gorton L. // Anal. Lett. 1996. Vol. 29. P. 181.
8. Sheridan E. M., Breslin C. B. // Electroanalysis. 2005. Vol. 17. P. 532.
9. Stefan- van Staden R.-I. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 53.

10. *Stefan R.-I., Nejem R. M., van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y.* // *Sensors Actuators B.* 2003. Vol. 94. P. 271.
11. *Stefan R.-I., van Staden J. F., Bala C., Aboul-Enein H. Y.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. Vol. 36. P. 889.
12. *Stefan R.-I., van Staden J. F., Mulaudzi L. V., Aboul-Enein H. Y.* // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 467. P. 189.
13. *Tap H., Gros P., Gué A. M.* // *Sensors Actuators B.* 2000. Vol. 68. P. 123.

## Раздел 2.5

1. *Вертелов Г. К., Оленин А. Ю., Лисичкин Г. В.* // *Журн. аналит. химии.* 2007. Т. 62. С. 903.
2. *Гусев А. И.* *Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии.* – М.: Физматлит, 2005. 416 с.
3. *Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований.* / Под ред. М. К. Роко, Р. С. Уильямса, П. А. Аливисатоса. – М.: Мир, 2002. 292 с.
4. *Шведене Н. В., Чернышев Д. В., Плетнев И. В.* // *Российский хим. журн.* 2008. Т.52. С. 80.
5. *Штыков С. Н., Русанова Т. Ю.* // Там же. С. 92.
6. *Castaneda M. T., Alegret S., Merkoçi A.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. *Electrochemical sensor analysis* / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 941.
7. *Feng M., Han H., Zhang J., Tachikawa H.* // *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications* / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 459.
8. *Fritzsche W., Taton T. A.* // *Nanotechnology.* 2003. Vol. 14. P. R63.
9. *Gooding J. J.* // *Electrochim. Acta.* 2005. Vol. 50. P. 3049.
10. *Guo S., Wang E.* // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 598. P. 181.
11. *Lin X.-Q., He J.-B., Zha Zh.-G.* // *Sensors Actuators B.* 2006. Vol. 119. P. 608.
12. *Liu G., Wang J., Lin Y., Wang J.* // *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications* / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 441.
13. *Liu G., Lin Y.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005. Vol. 5. P. 1060.
14. *Luque G. L., Ferreyra N. F., Rivas G. A.* // *Talanta.* 2007. Vol. 71. P. 1282.
15. *Shwedene N. V., Chernyshov D. V., Khrenova M.G. et al.* // *Electroanalysis.* 2006. Vol. 18. P. 1416.
16. *Tansil N. C., Gao Z.* // *Nanotoday.* 2006. Vol. 1. P. 28.
17. *Tkac J., Whittaker J. W., Ruzgas T.* // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 22. P. 1820.
18. *Wang J.* // *Anal. Chim. Acta.* 2003. Vol. 500. P. 247.
19. *Wei D., Ivaska A.* // *Ibid.* 2008. Vol. 607. P. 126.
20. *Welch C. M., Compton R. G.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 384. P. 601.
21. *Willner I., Baron R., Willner B.* // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 22. P. 1841.



22. Yan X. B., Chen X. J., Tay B. K., Khor K. A. // *Electrochem. Commun.* 2007. Vol. 9. P. 1269.
23. Zare H. R., Nasirizadeh N. // *Electrochim. Acta.* 2007. Vol. 52. P. 4153.

## Раздел 2.6

1. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р. Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Майстренко В.Н., Русаков И. А., Будников Г. К. // *Журн. аналит. химии.* 1992. Т. 47. С. 1003.
4. Электроаналитические методы. Теория и практика / Под ред. Ф. Шольца; Пер. с англ. под ред. В. Н. Майстренко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. 326 с.
5. Bond A. M. // *Analyst.* 1994. Vol. 119. P. R1.
6. Ferreira N. R., Ledo A., Frade J. G. et al. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. Vol. 535. P. 1.
7. Fletcher S., Horne M. D. // *Electrochem. Commun.* 1999. Vol. 1. P. 502.
8. Koryta J. // *Chem. listy.* 1990. Sv. 84. S. 347.
9. Lamas P. J., Gonzalez M. B., Costa A. // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 771.
10. Mitchell K. M. // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. P. 1098.
11. Stojek Z. // *Mikrochim. Acta.* 1991. Vol. 2. P. 353.

## Раздел 2.7

1. Андерсон Т. Введение в многомерный статистический анализ. – М.: Физматгиз, 1963. 500 с.
2. Власов Ю. Г., Легин А. В., Рудницкая А. М. // *Российский хим. журн.* 2008. Т.52. С. 101.
3. Дубров А. М., Мхитарян В. С., Трошин Л. И. Многомерные статистические методы. – М.: Финансы и статистика, 1998. 352 с.
4. Калач А. В. // *Нейрокомпьютеры: разработка и применение.* 2007. № 7. С. 115.
5. Ларичев О. И. Теория и методы принятия решений. – М.: Логос, 2000. 296 с.
6. Мильман Б. Л. Введение в химическую идентификацию. – СПб.: ВВМ, 2008. 180 с.
7. Родионова О. Е., Померанцев А. Л. // *Успехи химии.* 2006. Т. 75. С. 302.
8. Сидельников А. В., Зильберг Р. А., Кудашева Ф. Х., Майстренко В.Н. и др. // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. С. 1072.
9. Шараф М. А., Иллэн Д. Л., Ковальски Б. Р. Хемометрика. – Л.: Химия, 1989. 272 с.

10. *Apetrei C., Gutierrez F., Rodriguez-Mendez M. L.* // *Sensors Actuators B*. 2007. Vol. 121. P. 567.
11. *Arrieta A., Rodriguez-Mendez M. L., de Saja J. A.* // *Ibid.* 2003. Vol. 95. P. 357.
12. *Buratti S.* // *Anal. Chim. Acta*. 2004. Vol. 525. P. 133.
13. *Ivarsson P., Holmin S., Hojer N-E. et al.* // *Sensors Actuators B*. 2001. Vol. 76. P. 454.
14. *Ivarsson P., Kikkawa Y., Winquist F. et al.* // *Anal. Chim. Acta*. 2001. Vol. 449. P. 59.
15. *Krantz-Rulcker C., Stenberg M., Winquist F., Lundstrom I.* // *Ibid.* Vol. 426. P. 217.
16. *Mannino S., Benedetti S., Buratti S. et al.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 755.
17. *Parra V., Hernando T., Rodriguez-Mendez M. L.* // *Electrochim. Acta*. 2004. Vol. 49. P. 5177.
18. *Söderström A., Rudnitskaya A., Legin A., Krantz-Rulcker C.* // *J. Biotech.* 2005. Vol. 119. P. 300.
18. *del Valle M.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 721.
19. *Vlasov Yu., Legin A., Rudnitskaya A.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. Vol. 373. P. 136.
20. *Vlasov Yu., Legin A., Rudnitskaya A. et al.* // *Pure App. Chem.* 2005. Vol. 77. P. 1966.
21. *Winquist F., Wide P., Lundstrom I.* // *Anal. Chim. Acta*. 1997. Vol. 357. P. 21.
22. *Winquist F., Krantz-Rulcker C., Wide P., Lundstrom I.* // *Meas. Sci. Technol.* 1998. Vol. 9. P. 1937.
23. *Winquist F., Lundstrom I., Wide P.* // *Sensors Actuators B* // 1999. Vol. 58. P. 512.
24. *Winquist F., Holmin S., Krantz-Rulcker C. et al.* // *Anal. Chim. Acta*. 2000. Vol. 406. P. 147.

## Глава 3

### Раздел 3.1

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. 614 с.
2. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
3. *Будников Г. К., Медянцева Э. П., Бабкина С. С.* // *Успехи химии*. 1991. Т. 60. С. 881.
4. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Никольская Е. Б.* // Там же. 1999. Т. 68. С. 1142.
5. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е.* Основы биосенсорики. — Казань: Изд-во КГУ, 2007. 86 с.

6. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005. 336 с.
7. Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. 974 p.
8. Electroanalytical methods for biological materials / Eds. A. Brajter-Toth, J. Q. Chambers. – New York: Marcel Dekker Inc., 2002.
9. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. 593 p.
10. Karyakin A. A. // Ibid. P. 411.
11. Stefan R.-I., Van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y. Electrochemical sensors in bioanalysis. – New York – Basel: Marcel Dekker, 2001. 288 p.

## Раздел 3.2

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. 614 с.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрореэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е. Основы биосенсорики. – Казань: Изд-во КГУ, 2007. 86 с.
4. Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Никольская Е. Б. // Успехи химии. 1999. Т. 68. С. 1142.
5. Преснова Г. В., Рубцова М. Ю., Егоров А. М. // Российский хим. журн. 2008. Т. 52. С. 60.
6. Amine A., Mohammadi H. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 299.
7. Baumner A. J. // Anal. Bioanal. Chem. 2003. Vol. 377. P. 434.
8. Castillo J., Gáspár S., Leth S. et al. // Sensors Actuators B. 2004. Vol. 102. P. 179.
9. Dong S., Chen X. // Rev. Mol. Biotechnol. 2002. Vol. 82. P. 303.
10. Ju H., Kandimalla V. B. // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 31.
11. Kissinger P. T. // Biosens. Bioelectron. 2005. Vol. 20. P. 2512.
12. Patel P. D. // Trends Anal. Chem. 2002. Vol. 21. P. 96.
13. Pearson J. E., Gill A., Vadgama P. // Ann. Clin. Biochem. 2000. Vol. 37. P. 119.
14. Prodromidis M. I., Karayannis M. I. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14. P. 241.
15. Ricci F., Moscone D., Palleschi G. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 559.
16. Rogers K. R. // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 568. P. 222.
17. Rubianes M. D., Rivas G. A. // Electroanalysis. 2005. Vol. 17. P. 73.

18. *Serra B., Reviejo A. J., Pingarron J. M.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 255.
19. *Wang J.* // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 57.

### Раздел 3.3

1. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е.* Основы биосенсорики. Казань: Изд-во КГУ, 2007. 86 с.
2. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Порфирьева А. В.* // Российский хим. журн. 2008. Т.52. С. 66.
3. *Bakina S. S., Ulakhovich N. A., Zyavkina Yu. I.* // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 502. P. 23.
4. *Boon E. M., Barton J. K.* // Current Opinion Structur. Biolog. 2002. Vol. 12. P. 320.
5. *Brett A. M. O., Diculescu V. C., Chiorcea-Paquim A. M., Serrano S. Y. P.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 413.
6. *Castañeda M. T., Alegret S., Merkoçi A.* // Electroanalysis. 2007. Vol. 19. P. 743.
7. *Diculescu V. C., Paquim A.-M. C., Oliveira-Brett A. M.* // Sensors. 2005. Vol. 5. P. 377.
8. *Drummond T. G., Hill M. G., Burton J. K.* // Nature Biotechnol. 2003. Vol. 21. P. 1192.
9. *Gonzalez-Garcia M. B., Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 603.
10. *Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E.* // Meas. Sci. Technol. 2004. Vol. 15. P. R1.
11. *Liu J., Su B., Lagger G. et al.* // Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 6879.
12. *Pividori M. I., Alegret S.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 439.
13. *Rauf S., Gooding J. J., Akhtar K. et al.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. Vol. 37. P. 205.

### Раздел 3.4

1. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорефлекторами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
2. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е.* Основы биосенсорики. — Казань: Изд-во КГУ, 2007. 86 с.
3. *Centi S., Marrazza G., Mascini M. Pividori M. I., Alegret S.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 585.

4. *Cosnier S., Holzinger M.* // Ibid. P. 381.
5. *Fowler J. M., Wong D. K. Y., Halsall H. B., Heineman W. R.* // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 115.
6. *Ghindilis A. L., Atanasov P., Wilkins M., Wilkins E.* // Biosens. Bioelectron. 1998. Vol. 13. P. 113.
7. *Luppa P. B., Sokoll L. J., Chan D. W.* // Clin. Chim. Acta. 2001. Vol. 314. P. 1.
8. *Pividori M. I., Alegret S.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 467.
9. *Wang H., Shen G., Yu R.* // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 237.
10. *Warsinke A., Benkert A., Scheller F. W.* // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. Vol. 366. P. 622.

### Раздел 3.5

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. 614 с.
2. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Иммуобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Д. М. Вудворда. — М.: Мир, 1988. 215 с.
4. *Wollenberger V., Scheller F., Atrat P.* // Anal. Lett. 1980. Vol. 13. P. 1201.

### Раздел 3.6

1. Биосенсоры: Основы и приложения / Под. ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. 614 с.
2. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
3. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. — М.: Техносфера, 2005. 336 с.
4. *Fatibello-Filho O., Lupetti K. O. et al.* // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 357.
5. *Kuriyama S., Rechnitz G. A.* // Anal. Chim. Acta. 1981. Vol. 131. P. 91.
6. *Macholan L.* // Bioinstrumentation and biosensors / Ed. D. L. Wise. — New York: Marcel Dekker, 1991. P. 329.
6. *Mascini M., Jannelle M., Palleschi G.* // Anal. Chim. Acta. 1982. Vol. 137. P. 65.
7. *Odaci D., Timur S., Telefoncu A.* // Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2004. Vol. 32. P. 315.

## Глава 4

### Раздел 4.1

1. Брайнина Х. З. // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. С. 344.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
3. Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. С. 374.
4. Стожко Н. Ю. Модифицированные графитсодержащие электроды в инверсионной вольтамперометрии. / Дисс. соиск. учен. степени докт. хим. наук. – Екатеринбург: 2006. УГЭУ, 303 с.
5. Eftekhari A. // J. Electroanal. Chem. 2002. V. 537. P. 59.
6. Hocevar S. B., Ogorevc B. I., Wang J., Pihlar B. // Electroanalysis. 2002. Vol. 14. P. 1707.
7. Honeychurch K. C., Hart J. P., Cowell D. C. et al. // Ibid. P. 177.
8. Hutton E. A., Van Elteren J. T., Ogorevc B. I., Smyth M. R. // Talanta. 2004. Vol. 63. P. 849.
9. Merkoçi A., Alegret S. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 143.
10. Shankaran D.R., Narayanan S.S. // Fresenius J. Anal. Chem. 1999. V. 365. P. 663.
11. Uhlig A., Schnakemberg U., Hintsche R. // Electroanalysis. 1997. Vol. 9. P. 125.
12. Wang J. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 131.
13. Wang J., Lu J., Hocesvar S. B. et al. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 3218.
14. Wu K., Hu S., Fei J. et al. // Analyt. Chim. Acta. 2003. V. 489. P. 215.
15. Yi H. // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 377. P. 770.

### Раздел 4.2

1. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. – М.: Наука, 1994. 240 с.
2. Майстренко В. Н., Сапельникова С. В., Кудашева Ф. Х. // Журн. аналит. химии. 1999. Т. 54. С. 267.
3. Майстренко В. Н., Сапельникова С. В., Ильясова Р. Р., Кудашева Ф. Х. // Там же. 2000. Т. 55. С. 650.
4. Майстренко В. Н., Сапельникова С. В., Кузьмина Н. В., Кудашева Ф. Х. // Там же. 2002. Т. 57. С. 532.
5. Шайдарова Л. Г., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. С. 1014.
6. Brainina Kh. Z., Kositzina A. N., Ivanova A. // Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 643.
7. Brainina Kh. Z., Kositzina A. N., Saraeva S. Yu. // Ibid. P. e271.

8. Karyakin A. A. // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 411.
9. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L. // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 1720.
10. Malinauskas A., Garjonyte R., Mazeikiene R., Jureviciute I. // Talanta. 2004. V. 64. P. 121.

### Раздел 4.3

1. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
2. Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. прикладной химии. 2003. Т. 76. С. 783.
3. Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Там же. 2007. Т. 80. С. 1307.
4. Шайдарова Л. Г., Гедмина А. В., Челнокова И. А., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. С. 651.
5. Comprehensive analytical chemistry, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. — Amsterdam: Elsevier, 2006. 974 p.
6. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. — Amsterdam: Elsevier, 2008. 593 p.
7. Erdogan G., Karagozler A. E. // Talanta. 1997. V. 44. P. 2011.
8. Jin B., Zhang H. // Anal. letters. 2002. V. 35. P. 1907.
9. Park S., Boo H., Chung T. D. // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 556. P. 46.
10. Park S., Chung T. D., Kim H. C. // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 3046.
11. Raj C. R. T., Okajima T., Ohsaka T. // J. Electroanal. Chem. 2003. V. 543. P. 127.

### Раздел 4.4

1. Будников Г.К., Евгеньев М. И. // Зав. лаб. Диагн. матер. 2001. № 9. С. 5.
2. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р. Основы современного электрохимического анализа. — М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
3. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Муринов Ю. И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. — М.: Наука, 1994. 240 с.
4. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию /Под ред. Д. Исии. — М.: Мир, 1991. 240 с.
5. Евгеньев М. И., Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 2000. Т. 55. С. 1206.
6. Руководство по капиллярному электрофорезу /Под ред. А. М. Волощука. — М.: Наука, 1996.
7. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. — М.: Химия, 1986.

8. *Шнигун Л. К., Золотов Ю. А.* Проточно-инжекционный анализ. – М.: Знание, 1990.
9. *Шнигун О. А., Золотов Ю. А.* Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. – М.: Изд-во МГУ, 1990.
10. *Buchberger W.* // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996. Vol. 354. P. 797.
11. *Castano-Alvarez M., Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 827.
12. *Chiem N., Harrison D. J.* // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 373.
13. *Kissinger P. T.* // *Electroanalysis*. 1992. Vol. 4. P. 359.
14. *Pumera M., Merkoçi A., Alegret S.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 873.
15. *Pumera M.* // *Electrophoresis*. 2006. Vol. 27. P. 244.
16. *Rossier J. S., Reymond F.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 885.
17. *Verpoorte E.* *Electrophoresis*. 2002. Vol. 23. P. 677.
18. *Wang J., Ibanez A., Chatrathi M. P.* // *Ibid.* P. 3744.

## Раздел 4.5

1. *Фрайден Дж.* Современные датчики. Справочник. – М.: Техносфера, 2006. 592 с.
2. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005. 336 с.
3. *Castano-Alvarez M., Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 827.
4. *Li C. M., Dong H., Zhou Q., Goh K. H.* // *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications* / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 307.
5. *Pumera M., Merkoçi A., Alegret S.* // *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 49. Electrochemical sensor analysis / Eds. S. Alegret, A. Merkoçi. – Amsterdam: Elsevier, 2006. P. 873.
6. *Rossier J. S., Reymond F.* // *Ibid.* P. 885.

## Раздел 4.6

1. *Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М. Р.* Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
2. *Фрайден Дж.* Современные датчики. Справочник. – М.: Техносфера, 2006. 592 с.
3. *Diab N., Oni J., Schulte A. et al.* // *Talanta*. 2003. Vol. 61. P. 43.
4. *Doeller J. E., Isbell T. S., Benavides G. et al.* // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 341. P. 40.
5. *Kraus D. W., Doeller J. E., Zhang X.* // *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications* / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 213.



6. *Malinski T., Taha Z.* // Nature. 1992. Vol. 358. P. 676.
7. *Zhang X.* // Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications / Eds. X. Zhang, H. Ju, J. Wang. – Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 1.
8. *Zhang X., Broderick M.* // Mod. Asp. Immunobiol. 2000. Vol. 1. P. 160.

## Раздел 4.7

1. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К.* // Журн. аналит. химии. 2002. Т.57. С. 887.
2. *Кулис Ю. Ю., Лауринавичюс В. А.* // Там же. 1990. Т.45. С. 1294.
3. *Решетиллов А. Н., Корнилова Н. М., Колоколов А. Б.* // Там же. 1994. Т. 49. С. 538.
4. *Танатар Н. В.* // Биополимеры и клетка. 1990. Т. 6. С.5.
5. *Davis J., Vaughan D. H., Cardosi M. F.* // Enzyme Microbiol. Technol. 1995. Vol. 17. P. 1030.
6. *Harrison D. J., Turner A. P. F., Baltes H. P.* // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. P. 2002.
7. *Scheller F. W., Pfeiffer D.* // Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food and the environment / Ed. R. Schmid. CRC Press, 1997. P. 245.
8. *Solyom P.* // Prog. Water Techn. 1977. Vol. 9. P. 193.
9. *Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.* // Biosens. Bioelectron. 2001. Vol. 16. P. 121.
10. *Turner A. P. F.* // Trends Biotechnol. 1990. Vol.8. P. 169.

*Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"*

*Научное электронное издание*

Серия: «Методы в химии»

**Будников** Герман Константинович

**Евтюгин** Геннадий Артурович

**Майстренко** Валерий Николаевич

## **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ ДЛЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В ХИМИИ, БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*. Редактор *И. С. Беленькая*  
Художники *С. Инфантэ, Н. А. Новак*. Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Подписано к использованию 26.08.19.

Формат 130×200 мм

Издательство «Лаборатория

знаний» 125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3 Телефон: (499) 157-5272

e-mail: [info@pilotLZ.ru](mailto:info@pilotLZ.ru), <http://www.pilotLZ.ru>



**Будников Герман Константинович**, доктор химических наук, профессор Казанского государственного университета, член-корр. РАН, академик Международной академии наук высшей школы.

Научные интересы: электроаналитическая химия, химически модифицированные электроды, биосенсоры, история аналитической химии и методология ее преподавания.

Автор более 900 научных публикаций и 20 книг.



**Евтюгин Геннадий Артурович**, доктор химических наук, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета.

Научные интересы: электроаналитическая химия, химически модифицированные электроды, биохимические методы анализа.

Автор более 200 научных публикаций, 5 патентов на изобретения.



**Майстренко Валерий Николаевич**, доктор химических наук, профессор, член-корр. АН Республики Башкортостан, директор Научно-исследовательского института безопасности жизнедеятельности, заведующий кафедрой неорганической химии Башкирского государственного университета.

Научные интересы: электроаналитическая химия, химически модифицированные электроды, аналитическая химия стойких органических загрязнителей.

Автор более 300 научных публикаций и 7 книг.