

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Прибиль Медея Михайловна

**Высокоэффективные лактатные биосенсоры на
основе инженерии иммобилизованной
лактатоксидазы**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор Карякин А.А.

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
Глава 1. Лактат.....	12
1.1. <i>Актуальность определения лактата.....</i>	12
1.2. <i>Методы определения лактата.....</i>	14
1.3. <i>Неинвазивный мониторинг лактата.....</i>	22
Глава 2. Электрохимические биосенсоры.....	26
2.1. <i>Принцип действия и классификация биосенсоров.....</i>	26
2.2. <i>Амперометрические биосенсоры для определения лактата.....</i>	28
Глава 3. Электрокатализаторы окисления и восстановления пероксида водорода.....	32
3.1. <i>Физико-химические характеристики электрокатализаторов окисления и восстановления пероксида водорода.....</i>	32
3.2. <i>Берлинская лазурь.....</i>	34
3.3. <i>Использование берлинской лазури для создания биосенсоров первого поколения.....</i>	36
Глава 4. Иммобилизация ферментов при конструировании биосенсоров.....	38
4.1. <i>Методы иммобилизации ферментов.....</i>	38
4.2. <i>Иммобилизация лактатоксидазы.....</i>	39
4.3. <i>Мембраны на основе силоксанов.....</i>	42
4.4. <i>Мембраны на основе нафтона.....</i>	45
Глава 5. Сканирующая электрохимическая микроскопия.....	47
5.1. <i>Общие сведения.....</i>	47
5.2. <i>Принцип работы сканирующего электрохимического микроскопа.....</i>	48
5.3. <i>Гибкие планарные микроэлектроды в качестве зондов для сканирующей электрохимической микроскопии.....</i>	48
Глава 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	53
6.1. <i>Материалы.....</i>	53
6.2. <i>Оборудование.....</i>	54
6.3. <i>Методы.....</i>	60
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	73
Глава 7. Высокочувствительный биосенсор для определения лактата на основе лактатоксидазы и мембран с использованием силоксана.....	73
7.1. <i>Получение электродов, модифицированных берлинской лазурью.....</i>	73
7.2. <i>Использование силоксана для иммобилизации фермента на поверхность планарных электродов, модифицированных берлинской лазурью.....</i>	77
7.3. <i>Использование сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран различного состава.....</i>	79

7.3.1. Изготовление гибких планарных микроэлектродов и модификация их берлинской лазурью	80
7.3.2. Аналитические характеристики микросенсоров для определения пероксида водорода в качестве зондов для сканирующей электрохимической микроскопии	82
7.3.3. Получение изображения ферментсодержащей мембраны с использованием сканирующего электрохимического микроскопа	84
7.3.4. Получение трехмерного изображения ферментсодержащих мембран с использованием сканирующего электрохимического микроскопа	90
7.4. <i>Лактатные биосенсоры на основе ферментсодержащих силоксановых мембран различной плотности</i>	95
7.5. <i>Использование методов сканирующей электронной и лазерной микроскопии и профилометра для исследования ферментсодержащих мембран</i>	100
7.6. <i>Аналитические характеристики высокочувствительного биосенсора для определения лактата</i>	105
Глава 8. Биосенсор для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата	112
8.1. <i>Методы сдвига диапазона определяемых концентраций в область высоких значений</i>	112
8.2. <i>Использование перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы при создании биосенсоров для определения лактата</i>	113
8.3. <i>Скрининг различных составов ферментсодержащих мембран с использованием сканирующей электрохимической микроскопии</i>	115
8.4. <i>Линейные сканирования двух ферментсодержащих мембран в растворах лактата</i>	119
8.5. <i>Сканирование четырех проб лактатоксидазы в смешанных мембранах методом сканирующей электрохимической микроскопии</i>	120
8.6. <i>Использование смешанных мембран для иммобилизации лактатоксидазы при создании лактатных биосенсоров</i>	123
8.7. <i>Аналитические характеристики биосенсора для определения высоких содержаний лактата</i>	128
Глава 9. Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии	135
9.1. <i>Модельная проточная тонкослойная ячейка со встроенным биосенсором для определения лактата</i>	135
9.2. <i>Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии</i>	139
9.3. <i>Непрерывный мониторинг лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки</i>	143
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	149

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БЛ	берлинская лазурь
ЛОД	лактатоксидаза
ГОД	глюкозооксидаза
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
силоксан	γ -аминопропилтриэтоксисилан
ПФС	перфторсульфонируемый полимер (аналог нафтона)
НАД	никотинамидадениндинуклеотид
ПАНО	порог анаэробного обмена
КВВ	конденсат выдыхаемого воздуха
ПЭ	планарный электрод
ПЭТФ	полиэтилентерефталат
ПИА	проточно-инжекционный анализ
ЦВА	циклическая вольтамперометрия/вольтамперограмма
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
СЭХМ	сканирующая электрохимическая микроскопия
СЛМ	сканирующая лазерная микроскопия
фоновый электролит	0.1 М КСl, 0.1 М НСl
буферный раствор	0.05 М КН ₂ РО ₄ , 0.1 М КСl, рН 6.0
К _М	кажущаяся константа Михаэлиса

ВВЕДЕНИЕ

Контроль за содержанием лактата в крови важен для клинической диагностики и спортивной медицины. В клинической диагностике уровень лактата в организме человека изменяется при наличии ряда заболеваний, например, гипоксии тканей, кардиогенного или бактериально-токсического шока, дыхательной недостаточности, диабета. Выработка лактата в энергично работающих скелетных мышцах может увеличиваться в десятикратном размере, что обосновывает интерес спортивной медицины к уровню лактата в крови.

Разработка высокочувствительных, надёжных и экспрессных методов определения лактата представляет большой интерес. Среди них биосенсоры занимают одну из лидирующих позиций, так как специфичность иммобилизованного фермента к своему субстрату позволяет проводить измерения непосредственно в образце, несмотря на сложность его состава, без предварительной пробоподготовки, что также сокращает время анализа. В настоящее время для определения лактата широко используются биосенсоры, основанные на действии фермента лактатоксидазы, в таком случае осуществляется детектирование пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции. На сегодняшний день наиболее эффективными сенсорами на пероксид водорода являются электроды, модифицированные берлинской лазурью, которая позволяет избирательно определять пероксид водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода.

Лактатоксидаза – очень лабильный фермент, поэтому повышение стабильности является одной из ключевых задач при создании биосенсоров на её основе. Основные затраты рабочего времени приходится именно на подбор оптимальных условий иммобилизации фермента. Сканирующая электрохимическая микроскопия является мощнейшим способом визуализации в ближней зоне и позволяет отображать локальную электрохимическую поверхностную активность в микроскопическом разрешении. Адаптация сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран позволяет существенно уменьшить трудоемкость поиска условий иммобилизации.

В клинической диагностике и спортивной медицине лактат определяют в крови, однако всё большее внимание уделяется неинвазивным методам исследования, которые не нарушают целостности кожных и слизистых покровов, и, тем самым, исключают заражение и травматизм. Химический анализ образцов с целью неинвазивной диагностики подразумевает наличие экскреторной жидкости, концентрации искомым метаболитов в которой коррелируют с содержанием их в крови. С этой точки зрения интерес вызывает пот, так как показано, что увеличение концентрации лактата в крови коррелирует с увеличением содержания аналита в поте. В процессе тяжелых спортивных тренировок содержание лактата в поте достигает 40 - 80 мМ, а вместе с тем, верхняя граница определяемых содержаний лактата с использованием наилучшего известного лактатного биосенсора составляет 5 мМ; то есть, определение аналита в поте можно проводить только путем разбавления образца в 100 и более раз, что не представляется возможным при on-line мониторинге.

Таким образом, было необходимо разработать лактатные биосенсоры, характеризующиеся длительной стабильностью, высокой чувствительностью и воспроизводимостью, с возможностью расширения диапазона определяемых концентраций в область высоких значений с целью создания неинвазивного монитора на лактат.

Цель работы состояла в создании высокоэффективных лактатных биосенсоров на основе инженерии лактатоксидазы при иммобилизации для возможности определения лактата в различных диапазонах содержания, в частности при разработке неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Достижение поставленной цели предусматривало решение **следующих задач**:

- ✓ адаптация метода сканирующей электрохимической микроскопии для определения пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции, с целью скрининга ферментсодержащих мембран;
- ✓ исследование ферментсодержащих мембран на основе γ -аминопропилсилоксана различной плотности с целью нахождения оптимального состава смеси для иммобилизации фермента и создания

высококочувствительного и высокостабильного биосенсора для определения лактата;

- ✓ использование перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы с целью понижения сродства фермента к субстрату и, тем самым, расширения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений, необходимых для анализа неразбавленного пота;
- ✓ нахождение оптимального содержания γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера в водно-органической смеси для иммобилизации фермента для создания биосенсора, позволяющего определять физиологические содержания лактата в поте (5 - 80 мМ);
- ✓ интеграция полученного биосенсора на высокие концентрации лактата в неинвазивный монитор для определения лактата в поте непосредственно с поверхности кожи в режиме реального времени;
- ✓ апробация неинвазивного лактатного монитора для анализа пота в режиме реального времени в состоянии покоя и при физической нагрузке, сравнение результатов анализа с данными, полученными альтернативным методом.

Научная новизна.

Адаптирован метод сканирующей электрохимической микроскопии с использованием высокостабильного микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью, для выявления профиля концентрации пероксида водорода. С помощью сканирующего электрохимического микроскопа проведен скрининг ферментсодержащих мембран различного состава и установлено оптимальное содержание γ -аминопропилсилоксана в водно-органической смеси для иммобилизации лактатоксидазы, при использовании которого достигаются наивысшие показатели чувствительности и стабильности лактатных биосенсоров. По чувствительности биосенсор ($0.33 \cdot \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) в четыре раза превосходит лучший известный датчик для определения лактата. Стабильность разработанного биосенсора в два раза выше в сравнении с наилучшим известным лактатным датчиком.

Предложено использовать отрицательно заряженный перфторсульфонируемый полимер при иммобилизации лактатоксидазы для

экранирования субстрат-связывающего участка, с целью понижения сродства фермента к субстрату. Использование смешанных мембран из перфторсульфонируемого полимера и γ -аминопропилсилоксана позволило расширить диапазон определяемых концентраций лактата в область более высоких значений вплоть до 80 мМ в периодическом режиме тестирования, что покрывает физиологическое содержание аналита в поте. После трех часов непрерывных измерений уровень сигнала биосенсора остается на первоначальном уровне. Кажущаяся константа Михаэлиса лактатоксидазы достигает 10.4 мМ, что в 30 раз выше, чем при использовании электронейтральных силоксановых мембран для иммобилизации фермента.

Разработана система для непрерывного неинвазивного мониторинга состояния гипоксии. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки, полученных при апробации неинвазивного монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода.

Практическая значимость.

Разработан высокостабильный микроэлектрод для определения пероксида водорода, используемый в качестве зонда для сканирующей электрохимической микроскопии. Коэффициент чувствительности микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью, составляет $1.6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, линейный диапазон определяемых концентраций пероксида водорода от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М. Показана высокая операционная стабильность даже в очень жестких условиях (1 мМ H_2O_2): после двух часов непрерывных измерений сенсор не теряет чувствительности, а спустя 17 ч работы остается более 67% от первоначальной величины сигнала.

Создан высокочувствительный и высокостабильный лактатный биосенсор на основе ферментсодержащих мембран из γ -аминопропилсилоксана с аналитическими характеристиками в периодическом режиме тестирования: коэффициент чувствительности $0.33 \cdot \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, диапазон определяемых концентраций лактата $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М, время отклика – 40 с. Продемонстрирована высокая операционная стабильность: величина отклика биосенсора после двух часов непрерывных измерений остается не менее 85% от первоначального

значения. Также отмечено, что при хранении в течение 18 мес в холодильной камере биосенсор сохраняет по крайней мере 80% от исходного значения чувствительности.

Разработан лактатный биосенсор на основе смешанных мембран из γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы, позволяющий проводить определение лактата в неразбавленном поте. Аналитические характеристики в системе проточно-инжекционного анализа: диапазон определяемых концентраций лактата $1 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-1}$ М, коэффициент чувствительности $0.77 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, время отклика 2 мин; в периодическом режиме тестирования: диапазон определяемых концентраций лактата 0.1 – 80 мМ, коэффициент чувствительности $1.13 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, время отклика 1 мин. Показана высокая операционная стабильность: после трех часов непрерывных измерений биосенсор не теряет сигнала. При хранении в течение 3 мес при $+4^\circ\text{C}$ сохраняется исходное значение чувствительности.

Создан лабораторный образец неинвазивного монитора состояния гипоксии. Разработанный образец применим для непрерывного определения лактата в поте непосредственно с поверхности кожи в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки. Коэффициент корреляции результатов анализа с данными, полученными альтернативным методом составил 0.9930.

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование сканирующей электрохимической микроскопии в качестве нового метода скрининга ферментсодержащих мембран различного состава для улучшения аналитических характеристик биосенсора для определения лактата.
2. Создание высокочувствительного и высокостабильного лактатного биосенсора на основе γ -аминопропилсилоксана в качестве мембранообразующего соединения для лактатоксидазы.
3. Новый способ понижения аффинности лактатоксидазы к лактату, основанный на экранировании субстрат-связывающего участка отрицательно заряженным перфторсульфонируемым полимером при иммобилизации

фермента на поверхность электрода, для расширения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений.

4. Создание биосенсора для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата с использованием γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации фермента.
5. Разработка конструкции неинвазивного монитора путем интеграции биосенсора, тонкослойной ячейки и потосборника.
6. Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии; новый способ определения лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке в режиме реального времени.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 3 статьях в зарубежных рецензируемых научных журналах:

1. M. M. Pribil¹, G. U. Laptev, E. E. Karyakina, and A. A. Karyakin. Noninvasive hypoxia monitor based on gene-free engineering of lactate oxidase for analysis of undiluted sweat // *Anal. Chem.* 2014.V. 86 (11). P. 5215–5219.
2. M. M. Pribil, F. Cortés-Salazar, E. A. Andreyev, A. Lesch, E. E. Karyakina, O. G. Voronin, H. H. Girault, A. A. Karyakin. Rapid optimization of a lactate biosensor design using soft probes scanning electrochemical microscopy // *J. Electroanal. Chem.* 2014. V. 731. P. 112–118.
3. S. Rastgar, H. Deng, F. Cortes-Salazar, M. D. Scanlon, M. M. Pribil, V. Amstutz, A. A. Karyakin, S. Shahrokhian and H. H. Girault. Oxygen reduction at soft interfaces catalyzed by in situ-generated reduced graphene oxide // *ChemElectroChem.* 2014. V. 1(1). P. 59–63.

и доложены на 4 международных и российских научных конференциях:

1. Мчедлишвили М. М.². Биосенсор для определения лактата в неразбавленном поте / XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2012». Москва. 2012.
2. Мчедлишвили М. М. Изменение способов иммобилизации фермента для разработки высокочувствительного биосенсора для определения лактата /

¹⁻² Автор сменила фамилию с Мчедлишвили на Прибиль в 2013 г.

XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2013». Москва. 2013.

3. Мчедлишвили М. М., Карякин А. А. Высокочувствительный биосенсор для определения лактата. Использование метода сканирующей электрохимической микроскопии для исследования аналитических характеристик биосенсоров / Второй съезд аналитиков России. Москва. 2013. С. 465.
4. Прибиль М. М. Неинвазивный монитор оценки гипоксии на основе инженерии лактатоксидазы для анализа неразбавленного пота / Международная выставка «Аналитика Экспо 2015». Семинар «Биосенсорные системы для клинической диагностики и охраны окружающей среды». Москва. 2015.

Вклад автора в представленную работу.

В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором в период 2012 - 2015 гг. Личный вклад соискателя заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации, а также формулировке защищаемых научных положений и выводов. Основная часть работы была выполнена автором в лаборатории электрохимических методов кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Работа с использованием сканирующего электрохимического, электронного и лазерного микроскопов, изготовление гибких планарных микроэлектродов проводились автором под руководством Dr. Fernando Cortes-Salazar, Dr. Andreas Lesch и Prof. Hubert Girault в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария) во время стажировки.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Лактат

1.1. Актуальность определения лактата

Молочная кислота, а другими словами лактат, входит в число наиболее важных аналитов, поскольку является универсальным продуктом обмена веществ практически у всех живых организмов, конечным продуктом тканевого обмена глюкозы при нехватке кислорода, основным межклеточным энергетическим веществом в тканях мозга [1], а также натуральным компонентом вин и других пищевых продуктов, что используется для оценки их качества [2, 3].

Молочная кислота в организме человека образуется при распаде глюкозы. Глюкозу иногда называют «кровяным сахаром» и именно она является основным топливом для нервной системы, мозга, а также для мышц во процессе физической нагрузки. Расщепление глюкозы способствует производству аденозинтрифосфата (АТФ), который в свою очередь обеспечивает энергией большинство химических реакций в организме [4, 5]. Лактат образуется из пирувата под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на последней стадии гликолиза в соответствии с реакцией:



где НАД – никотинамидадениндинуклеотид.

Практически все клетки организма вырабатывают лактат, при этом наибольшее содержание метаболита обеспечивают ткани кишечника, мозга, а также скелетные мышцы. Нормальная концентрация лактата в крови варьируется в пределах 0.5 - 2.2 ммоль/л [6-9], однако при интенсивных физических нагрузках уровень лактата в крови может повышаться в 10 раз по сравнению с базовым, демонстрируя, таким образом, напряженность метаболических процессов аэробного и анаэробного гликолиза. Данный факт определяет интерес к уровню лактата в крови в спортивной медицине. Динамика роста концентрации лактата

позволяет определять наиболее перспективных спортсменов в видах спорта на выносливость, таких как: бег, велоспорт, лыжные гонки и другие. Также важнейшим физиологическим показателем является анаэробный (лактатный) порог, о котором впервые было опубликовано Овлесом в 1930 году, именно порог отражает уровень тренированности организма и взаимоотношение между аэробными и анаэробными путями энергообеспечения физической нагрузки [10]. Чем выше анаэробный порог, тем более тренирован спортсмен, и его организм имеет более развитую аэробную систему энергообеспечения, мощность которой может составлять от 80 до 90% от максимального потребления кислорода. С биохимической точки зрения анаэробный порог наблюдается при повышении уровня лактата в крови до 4 – 10 ммоль/л [7, 11]. Данные по концентрации лактата в крови в процессе физических упражнений позволяют классифицировать режимы интенсивности беговых или иных нагрузок у спортсменов и, как следствие, повысить возможности реализации функциональных и тренировочных потенциалов. В настоящее время измерение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и уровня лактата в крови является неотъемлемым элементом тренировки у профессиональных спортсменов.

Рост содержания лактата в крови при физических нагрузках различается с увеличением концентрации метаболита у критических больных, описанным Дж. Мекинсом и С. Лонгом в 1927 году [12]. Уже тогда было показано, что повышение концентрации лактата в крови свидетельствует о гипоксии тканей у пациентов с сердечно-сосудистым шоком. А также у пациентов с клиническим шоком, связанным с тахикардией, артериальной гипотензией, холодной и липкой кожей и снижением диуреза, уровень лактата был принят как лучший объективный показатель тяжести заболевания [13]. Резкое увеличение (в 2 - 3 раза) уровня лактата в сыворотке крови наблюдается при тяжёлых расстройствах кровообращения, таких как геморрагический шок, острая левожелудочковая недостаточность и другие, когда одновременно страдает и поступление кислорода в ткани и печеночный кровоток.

Важное значение лактат приобрел и в пищевой промышленности, где молочная кислота присутствует в качестве натурального компонента во многих продуктах. Лактат образуется при молочнокислом брожении сахаров, в частности,

в прокисшем молоке, йогурте, сыре, при брожении вина, пива, кваса. Также выступает в качестве консерванта, пищевая добавка E270. Определение лактата в продуктах используется для оценки и контроля качества производственного сырья и пищевых продуктов.

Таким образом, содержание лактата в крови в клинической диагностике имеет жизненно важное значение, в спортивной медицине оно является показателем эффективности физических нагрузок, а в пищевой промышленности определение лактата необходимо для контроля качества пищевых продуктов. Все данные отрасли широко распространены и, несомненно, определение лактата очень актуально. Методы определения, характеризующиеся высокой чувствительностью, селективностью, широким диапазоном определяемых концентраций лактата и длительной операционной стабильностью представляют большой интерес.

1.2. Методы определения лактата

Впервые возможность определения лактата в крови млекопитающих продемонстрировал Гаглио 1866 году [14], однако результаты были получены с использованием крови собак и кроликов после вскрытия вен. Позднее Берлинерблау в 1877 году подтвердил эти наблюдения у млекопитающих и впервые определил концентрацию лактата в венозной крови человека [15]. Тогда для анализа требовалось почти 200 мл крови. Сейчас же для определения концентрации лактата существует множество методов и для проведения анализа достаточно 100-150 мкл крови.

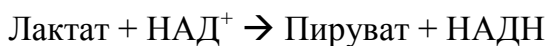
Беркером и Самерсоном было предложено колориметрическое определение лактата в биологических пробах [16]. В присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди из лактата образуется уксусный альдегид, который реагирует с параоксидифенилом с образованием окрашенного в фиолетовый цвет соединения. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации лактата в пробе, что регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Данный метод широко применяется в лабораторной практике, однако требует длительную пробоподготовку и сложное аппаратное обеспечение, при этом диапазон определяемых содержаний лактата составляет чуть более одного порядка от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1.3 \cdot 10^{-4}$ М.

Встречаются методы определения лактата с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [17, 18]. При этом авторы сначала проводят разделение на колонке с обращенной фазой, затем экстракцию в несколько ступеней, после чего лактат определяют в ультрафиолетовом диапазоне (242 и 320 нм) путем дериватизации с α -бромацетофеноном. Диапазон определяемых концентраций лактата в таком случае составляет 0.18 - 6.0 мМ.

Лактат и другие метаболиты измеряли методом спектроскопии протонного магнитного резонанса в клетках мозга у пациентов, переживших инфаркт [19]. В других источниках исследовали среду культивированных клеток на глюкозу, лактат и аммиак в ближней инфракрасной спектроскопии в спектральном диапазоне 2.0 – 2.5 мкм [20]. Также известны методы определения лактата кальция методом комплексонометрического титрования [21, 22].

Однако, при наличии достаточного разнообразия методов определения лактата, предпочтение отдается ферментативным методам относительно всех вышеприведенных. Ферментативные методы определения лактата основаны на каталитическом действии ферментов лактатоксидазы и лактатдегидрогеназы, они просты в применении, но обеспечивают наивысшую специфичность, точность и воспроизводимость. Первое определение лактата с использованием фермента лактатдегидрогеназы было основано на переносе водорода от лактата к гексацианоферрату калия, однако метод был сложен в исполнении и не получил широкого распространения. Последующие способы были основаны на ультрафиолетовом измерении образующегося в ходе ферментативной реакции НАДН в соответствии с:

лактатдегидрогеназа



В 1974 году Гутманом и Вахлефидом было описано определение лактата по НАДН, выделяющегося в ходе ферментативной реакции, с использованием гидразина в качестве улавливающего агента для пирувата [23]. Нолл также детектировал лактат с использованием лактатдегидрогеназы, но в реакционной смеси присутствовала еще аланинаминотрансфераза, используемая для более быстрого удаления пирувата [24].

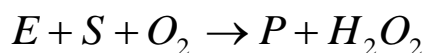
Однако, определение лактата по НАДН довольно затруднительно при анализе реальных объектов, что нельзя сказать о реакции, катализируемой лактатоксидазой, когда лактат можно определять по расходуемому кислороду, либо по окислению или восстановлению пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции:

лактатоксидаза

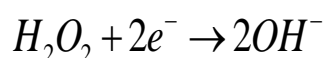


Первым датчиком, работающим на данном принципе, был биосенсор для определения глюкозы с использованием фермента глюкозооксидаза (ГОД). Сообщение о его создании было сделано в 1962 году на заседании Нью-Йоркской Академии Наук учеными Кларком и Лайонсом [25]. Они поместили ГОД в ячейку с кислородным электродом, ток восстановления кислорода на платиновом электроде при -0.60 В (здесь и везде далее потенциал указан относительно хлоридсеребряного электрода сравнения) пропорционален концентрации глюкозы в образце, что позволило проводить определение последней в широком диапазоне концентраций. Однако определение глюкозы через количество поглощенного в ходе реакции кислорода обладает рядом недостатков. Во-первых, в равновесии с воздухом концентрация кислорода в водных растворах высока (0.2 мМ), что затрудняет определение низких концентраций анализируемых веществ. Во-вторых, в реальных объектах равновесная концентрация кислорода может изменяться. В-третьих, образующийся в ходе ферментативной реакции пероксид водорода способен восстанавливаться в ходе электрохимических реакций в тех же условиях, что приводит к значительным погрешностям определения [26].

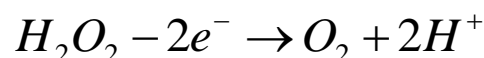
Наряду с определением кислорода используется метод детекции образующегося в ходе ферментативной реакции пероксида водорода, основанный на его окислении или восстановлении [26]:



Восстановление



Окисление



Окисление пероксида водорода связано с использованием высоких значений рабочего потенциала биосенсора ($0.60 - 0.70$ В), что влечет усиление мешающего

влияния других восстановителей на отклик ферментного электрода при анализе реальных объектов. Гораздо большей популярностью при создании ферментных электродов пользуется метод определения пероксида водорода, основанный на его восстановлении, что обеспечивает наивысшую чувствительность и низкий предел обнаружения [27]. Значения рабочих потенциалов биосенсоров в этом случае находятся в районе 0.00 В, что позволяет снизить мешающее влияние восстановителей на отклик.

В коммерчески доступных наборах встречается метод, с использованием фермента пероксидазы для определения пероксида водорода. В таком случае H_2O_2 в присутствии фермента реагирует с N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином с образованием окрашенного соединения, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации лактата в пробе [28, 29].

Помимо этого в литературе описано большое количество методов для определения лактата с использованием фермента ЛОД [30-40], в том числе совсем недавние [41-43]. Амперометрические устройства наиболее широко распространены, в том числе в коммерчески доступных приборах, в табл. 1 приведены аналитические характеристики основных амперометрических биосенсоров для определения лактата.

Среди потенциометрических биосенсоров для определения лактата встречаются твердотельные, на основе иммобилизованной ЛДГ и НАД^+ с использованием (3-глицидоксипропил)триметоксисилана на стеклянных электродах, покрытых SnO_2 /оксидом индия [44]. Диапазон определяемых концентраций лактата составляет от 6 до 40 мМ, наблюдается высокая чувствительность 61.5 мВ/декада, однако сенсор недостаточно стабилен, после 25 измерений сохраняется 84% от исходного значения отклика. Ибупото и соавторы представили потенциометрический биосенсор на основе стеклянного электрода с наностержнями ZnO на золотом покрытии, датчик демонстрирует широкий диапазон определяемых содержаний лактата ($1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ М), коэффициент чувствительности 41.33 ± 1.58 мВ/декада, время отклика менее 10 с, спустя 21 день хранения при +4°C биосенсор сохраняет более 90% от исходного значения [45].

Таблица 1. Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата

Основа метода	Потенциал	ДОК ¹	C min ²	Время отклика	Стабильность	Коэффициент чувствительности, мА см ⁻² ·М ⁻¹	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8
ЛОД (электроды на основе наночастиц Pt)	0.30 В отн. Ag/AgCl	0.01 – 2 мМ	6.9 мкМ	60 с	При хранении при +25°C 3 мес - 90% ³ , при хранении при -30°C 18 мес – 95% ³ .	0.41	[43]
ЛОД	0.35 В отн. Ag/AgCl	0 – 10 мМ	-	-	При хранении в силикагеле при +25°C – 8 мес ⁴ .	-	[34]
ЛОД (электроды, содержащие фталоцианин кобальта)	0.45 В отн. Ag/AgCl	0.02 – 1.5 мМ	18 мкМ	90 с	При хранении при +4°C - 9 мес ⁴ .	4.54	[46]
ЛОД (электроды на основе углеродных нанотрубок)	-0.23 В отн. Hg/Hg ₂ SO ₄	1.4·10 ⁻⁵ – 3.3·10 ⁻⁴ М	4.1 мкМ	-	При хранении при +4°C – 3 мес ⁴ .	40	[47]

<i>Продолжение таблицы 1</i>							
1	2	3	4	5	6	7	8
ЛОД с пероксидазой хрена	0.00 В отн. Ag/AgCl	10 – 180 мкМ	10 мкМ	-	После 50 инъекций – 90% ³ . При хранении при +25°C 4 мес -10% ³ .	27.7	[35]
ЛОД с ферроцианидом (совместное определение лактата и глюкозы)	0.40 В отн. Ag/AgCl	1 - 50 мМ	1 мкМ	5 мин	При хранении при +25°C - 7 дней ⁴ , при -30°C – 10 мес ⁴ .	-	[48]
ЛОД (на платиновых электродах)	0.60 В отн. Ag/AgCl	0.1 – 6 мМ	0.5 мкМ	60 с	После 16 ч непрерывных измерений - 84% ³ . При хранении 6 недель при +4°C– 92% ³ .	15.3	[49]
ЛОД	0.40 В отн. Ag/AgCl	0.1 – 5.5 мМ	0.1 мМ	50 с	При хранении 26 дней при +4°C не наблюдается потери отклика.	0.38	[32]
ЛОД (на электродах, модифицированных БЛ)	0.00 В отн. Ag/AgCl	$1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М	1 мкМ	60 с	После 500 инъекций – 85% ³ . При хранении 6 мес при +4°C – 90% ³ .	180	[50]

<i>Продолжение таблицы 1</i>							
1	2	3	4	5	6	7	8
ЛОД (с наночастицами MnO ₂)	0.50 В отн. Ag/AgCl	0.02 – 4 мМ	8 мкМ	35 с	При хранении 1 мес при +4°C - 72% ³ .	3.98	[33]
ЛОД (на основе углеродных волокон, модифицированных БЛ)	0.00 В отн. Ag/AgCl	0.01 – 2 мМ	5.6 мкМ	60 с	-	42.3	[51]
ЛДГ (на основе гибридных углеродных нанотрубок)	0.30 В отн. Ag/AgCl	1·10 ⁻⁶ - 5·10 ⁻⁴ М	0.56 мкМ	90 с	При хранении 15 дней при +4°C не наблюдается потери отклика.	0.9	[52]
ЛДГ	0.00 В отн. Ag/AgCl	0.1 - 20 мМ	0.1 мМ	60 с	-	0.2	[53]

Примечания:

«-» информация отсутствует.

¹ Диапазон определяемых концентраций лактата.

² Предел обнаружения.

³ Сохраняется % от исходного значения отклика.

⁴ Сохраняется активность.

Одним из способов повышения чувствительности ферментативных биосенсоров является увеличение количества фермента в распознающем слое, что обычно делают путем расширения площади рабочего электрода. Площадь поверхности может быть увеличена благодаря использованию наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки [47, 52], наночастицы золота [30, 54], наночастицы платины [55, 56]. Также используются и другие оксиды металлов, такие как оксид ниобия [57], молибдена [58] и наночастицы полупроводниковых металлов, например, оксид цинка [59]. Максимально высокая чувствительность методов в таком случае достигает $40 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (табл.1).

Другой способ повышения чувствительности состоит в использовании биферментной системы, например совместная иммобилизация пероксидазы хрена и лактатоксидазы [35, 60, 61]. В таком случае максимальная чувствительность биосенсора достигает $27.7 \text{ mA cm}^{-2} \cdot \text{M}^{-1}$ и измерения проводятся при 0.00 В (табл. 1).

Наиболее широко для количественного определения лактата в реальных образцах используется амперометрическая детекция пероксида водорода. В связи с чем большое количество исследований посвящено уменьшению мешающего влияния восстановителей, присутствующих в биологических жидкостях, т.к. ураты, аскорбаты и другие соединения способны восстанавливаться при потенциалах, близких к потенциалу восстановления H_2O_2 [62]. Для сведения к минимуму данных помех в литературе предложено использование электрокатализаторов, таких как берлинская лазурь (БЛ) [50, 51, 63] или фталоцианин кобальта [46, 64], а также замена естественного акцептора электронов - O_2 на искусственный медиатор, например, метиленовый зеленый [65], мелдоловый голубой [57, 66], гидроксиметил ферроцен [67, 68], комплексы окислительно-восстановительных полимеров осмия [69] и другие (табл. 1). Основным преимуществом использования медиаторов является возможность проведения экспериментов при нулевом потенциале, однако большинство медиаторов растворимы в водном растворе и токсичны, что ограничивает их применение в клинической диагностике.

Электрокатализаторы широко используются при создании биосенсоров для определения лактата, при этом датчики на основе БЛ характеризуются наилучшими аналитическими характеристиками. Коэффициент чувствительности

биосенсоров на основе углеродных волокон, модифицированных БЛ, достигает $42.3 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, диапазон определяемых концентраций лактата более двух порядков, однако в литературе не приведена стабильность датчиков [51]. Биосенсоры для определения лактата на основе планарных электродов, модифицированных БЛ, с использованием геля силоксанов для иммобилизации ЛОД по всем аналитическим характеристикам превосходят известные аналоги (табл.1). А именно, коэффициент чувствительности датчиков в несколько раз превышает значение любых подобных устройств и достигает $180 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, диапазон определяемых содержаний лактата шире, чем у известных аналогов, и составляет более трех порядков от $1 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ М. Время отклика 60 с, что сопоставимо с аналогами, а операционная стабильность и стабильность при хранении наравне или выше, чем у подобных устройств. При этом измерения проводятся при нулевом потенциале, что позволяет избежать мешающее влияние восстановителей при анализе реальных объектов [50].

Таким образом, существует множество методов определения лактата, среди которых предпочтение отдается ферментативным методам, как обладающим наивысшей специфичностью, точностью и воспроизводимостью результатов. Анализ литературных данных показал, что биосенсор для определения лактата на основе планарных электродов, модифицированных БЛ, с использованием геля силоксанов для иммобилизации ЛОД по всем аналитическим характеристикам превосходит известные аналоги. Тем не менее, остается вопрос повышения стабильности ферментных биосенсоров в связи с лабильностью фермента с целью длительного использования и хранения аналитических устройств, что является неотъемлемым составляющим коммерческого применения биосенсоров.

1.3. Неинвазивный мониторинг лактата

В процессе физических нагрузок в организме человека происходят изменения физиологического и биохимического характера, что привлекает внимание исследователей уже более ста лет. В 1927 году Дугласом и соавторами было описано увеличение содержания лактата в крови при некоторой физической нагрузке, а вместе с тем понижение концентрации бикарбонатных ионов и усиление дыхания [70]. Позднее Холман [71], а затем Вассерман [72] разработали

концепцию «порога анаэробной нагрузки организма», связав повышение концентрации лактата с возникающим кислородным долгом.

В настоящее время лактат определяют в крови, для этого кровь берут из пальца или из мочки уха. Для получения полной информации необходим непрерывный мониторинг лактата в организме, что сложно осуществимо, потому что требуется регулярный отбор крови, а это зачастую вызывает дополнительное напряжение и может влиять на результаты тренировок. Непрерывный мониторинг лактата необходим как для спортсменов во время интенсивных физических нагрузок, так и для пациентов в процессе интенсивной клинической терапии.

Необходимость непрерывного определения лактата в организме человека и нынешняя тенденция развития неинвазивных методов анализа побудили исследователей изучить изменение концентрации лактата в других жидкостях тела. Неинвазивные методы исследования и лечения не нарушают целостности кожных и слизистых покровов, и, тем самым, исключают заражение и травматизм. Химический анализ образцов с целью неинвазивной диагностики требует наличие экскреторной жидкости, выделяемой различными органами человека для выведения ненужных или даже вредных веществ.

В литературе приведено, что концентрация лактата в крови коррелирует с содержанием аналита в тканевой жидкости, но данный анализ относится к малоинвазивным [73]. Существует множество жидкостей, выделяемых человеком, такие как: слюна, моча, пот, конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ), слеза и другие, однако решающим фактором при химическом анализе экскреторных жидкостей с целью неинвазивного определения лактата в организме человека является корреляция его содержанию с кровью.

В литературе описаны случаи определения лактата в образцах слюны [74, 75], но встречаются данные как о высокой [75, 76], так и о низкой [77] корреляции содержания лактата в слюне и в крови, а также наличие бактерий [78]. Проведены исследования по определению содержания лактата в конденсате выдыхаемого воздуха, направленные на замену объекта исследования с крови мочки уха на КВВ. Марек и соавторы утверждают о корреляции содержания лактата в крови со скоростью накопления метаболита в КВВ ($R^2 = 0.7423$), однако данный вопрос еще требует уточнений [79, 80]. Также стоит иметь ввиду, что на содержание лактата в

КВВ и слюне сильно влияет пища, которой питался человек и отбор пробы обязательно проводить натощак. Концентрация лактата в моче зависит от многих факторов, поэтому не может коррелировать с содержанием его в крови. Содержание лактата в слезной жидкости изучалось и выдвигались гипотезы о существующей корреляции [81, 82].

В литературе имеются разногласия по поводу корреляции содержания лактата в поте и крови, однако последние исследования в этом направлении показали, что существует корреляция по увеличению лактата в крови и поте [11, 77, 83]. Измерения лактата в поте проводились с использованием биосенсоров на основе планарных структур, модифицированных БЛ с иммобилизованной ЛОД в мембрану γ -аминопропилсилоксана (с разбавлением образца), определение лактата в крови с помощью автоматического анализатора C_Line (Biosen). Статистические данные не показали корреляции между абсолютными значениями концентрации лактата в поте и в венозной и капиллярной крови. Однако анализ экспериментальных данных показал, что увеличение концентрации лактата в поте коррелирует с ростом аналита в капиллярной ($R^2 = 0.7200$, $p < 0.05$) и венозной ($R^2 = 0.8400$, $p < 0.05$) крови [11].

Содержание лактата в поте в состоянии покоя по нескольким источникам составляет от 4 до 25 мМ [11, 84-87], однако при тяжелых физических нагрузках эта концентрация достигает 40 – 80 мМ [11, 84, 86]. Более недавние статьи о создании лактатных биосенсоров докладывали о 5 - 10 мМ как о самой высокой определяемой концентрации лактата [32, 88-91]. Даже так называемый «неинвазивный датчик для определения лактата в человеческом поте в процессе реального времени» лимитируется только 20 мМ как самой высокой определяемой концентрацией [92], чего недостаточно для мониторинга лактата в процессе физических нагрузок. То есть, определение лактата в поте при физических нагрузках можно проводить только путем разбавления образца в 100 и более раз, что не представляется возможным при разработке системы непрерывного мониторинга состояния гипоксии.

Для сбора потовых проб без физической нагрузки известен способ активации потовой железы путем электрофореза с пилокарпином, препарат вызывает резкое усиление секреции слюнных и потовых желез. В литературе представлен и другой

способ активации потовых желез, с помощью которого метаболиты с поверхности кожи собираются в гидрогель и впоследствии извлекаются с помощью аналитической установки с использованием электрораспылительной ионизации и масс-спектрометрии [93]. Как заявлено в статье, данный метод занимает 12 мин, что сравнительно быстро, относительно электрофореза с пилокарпином (порядка 30 мин). Но следует заметить, что для изъятия проб требуется сложное аппаратное оснащение и сбор пота можно проводить только у аналитической установки, тогда как для проведения электрофореза требуется миниатюрный прибор, легко переносимый транспортировку.

Следует отметить, что концентрация биоаналитов в физиологических жидкостях, выделяемых наружу, зависит от типа жидкости (основная, стимулированная, эмоциональная) и скорости ее выделения. Очевидно, что при стимуляции выработки пота концентрация лактата, а также скорость потоотделения может варьироваться, однако данный вопрос до конца не изучен.

Таким образом, неинвазивный мониторинг лактата представляет большой интерес, ранее была выявлена корреляция увеличения концентрации лактата в крови и в поте, что представляет возможным сменить объект исследования с крови на пот. Однако нет существующих аналогов, работающих в диапазоне концентраций, покрывающем физиологическое содержание лактата в поте, именно поэтому важной задачей является создание такого неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Глава 2. Электрохимические биосенсоры

2.1. Принцип действия и классификация биосенсоров

Наиболее яркими представителями аналитических систем, сочетающих в себе высокую чувствительность и селективность определения, являются биосенсоры [94]. При этом электрохимические устройства традиционно имеют наибольшее распространение среди существующих биосенсоров [95, 96]. Такие устройства производят простую, недорогую и в то же время точную платформу для диагностики пациентов. Электрохимический биосенсор включает в себя элемент биохимического распознавания и трансдьюсер. Цель трансдьюсера заключается в преобразовании биохимической информации в полезный электрический сигнал.

Первое предположение о возможности иммобилизации ферментов на электрохимических датчиках было выдвинуто еще в 1962 году Лиландом Кларком-младшим и соавторами [25]. Была вынесена гипотеза, что данные «ферментные электроды» в последствии расширят диапазон аналитических возможностей базового датчика.

Основным преимуществом биосенсоров относительно множества существующих методов является высокая специфичность биоузнающего элемента, благодаря чему можно количественно определять индивидуальное анализируемое вещество или группу веществ в смеси огромного числа подобных соединений. Это значительно упрощает работу с кровью, потом и другими биологическими жидкостями.

Биосенсоры классифицируются по типам биорецепторов и трансдьюсеров. Различные типы биологических структур используются в биосенсорах в качестве узнающего элемента: [97]:

- Целые организмы
- Ткани
- Клетки
- Органеллы
- Мембраны
- Антитела

- Рецепторы
- Фермент
- Окислительно-восстановительные белки
- Нуклеиновые кислоты
- Органические молекулы

Методы биораспознавания с основными типами рецепторов приведены на рис. 1.

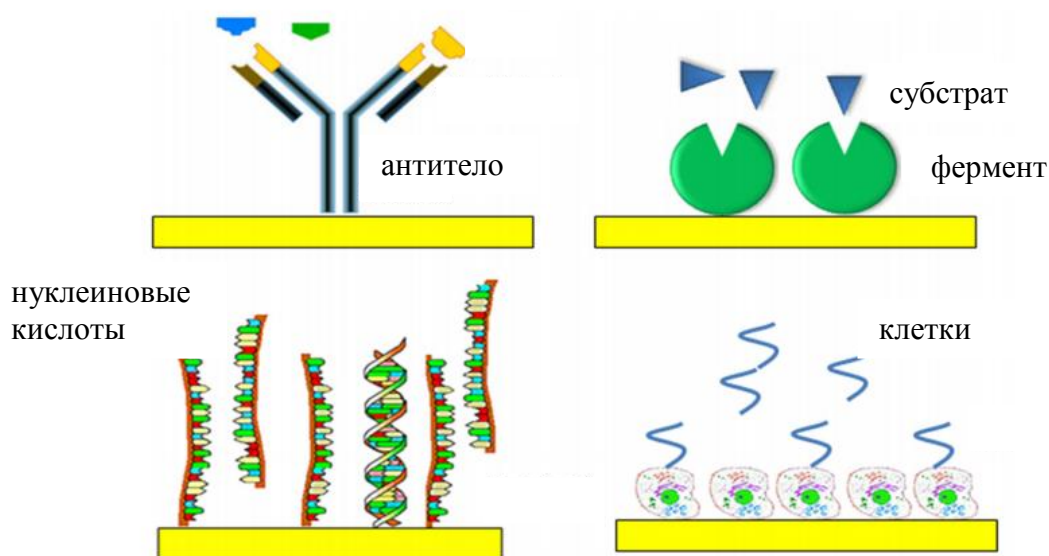


Рис. 1. Методы биораспознавания с различными типами биорецепторов.

Используемые в биосенсорах преобразователи сигнала (транздьюсеры) разделяются на [97]:

- Амперометрические
- Кондуктометрические
- Импедиметрические
- Калориметрические
- Оптические
- Акустические
- Механические
- Химические

Все виды биоселективных элементов можно комбинировать с различными транздьюсерами. В качестве биоузнающего элемента наибольшую популярность приобрели ферментные и клеточные биосенсоры. Типы транздьюсеров

определяются физико-химическими основами их действия и позволяют разделить биологические сенсоры на следующие основные категории: электрохимические, оптические и гравиметрические. Среди оптических биосенсоров следует особо выделить сенсоры, основанные на физическом принципе поверхностного плазмонного резонанса [98]. Метод применим для детекции аффинных взаимодействий, что использовано фирмой Biosore. Основным недостатком трансдюсера является чувствительность к различным параметрам среды, в том числе к локальному изменению температуры. Гравиметрические трансдюсеры основаны на принципе резонанса акустической волны, распространяющейся вдоль поверхности кварцевого кристалла. По уравнению Соусбери существует линейная зависимость резонансной частоты от изменения массы на поверхности кристалла. Однако резонансная частота также линейно зависима от «вискоэластического» коэффициента который может варьироваться в широких пределах в присутствии полимеров, что может значительно исказить результаты экспериментов.

Бесспорное преимущество принадлежит электрохимическим биосенсорам, они менее зависимы от эффектов окружающей среды, чем оптические, при этом устройства позволяют осуществлять перенос информации, преобразованной в электрический сигнал, непосредственно на персональный компьютер [94]. Амперометрические и потенциометрические трансдюсеры наиболее широко используются при создании электрохимических биосенсоров. В потенциометрических устройствах аналитическая информация получается путем преобразования процесса биораспознавания в сигнал потенциала с использованием ионселективных электродов (ИСЭ). В амперометрических устройствах происходит измерение тока при наложении постоянного потенциала. Амперометрические биосенсоры имеют большее распространение в связи с высокой чувствительностью и широким линейным диапазоном определяемых концентраций, а также они проще подвергаются миниатюризации, а обычное для них массовое производство обеспечивает низкую себестоимость.

2.2. Амперометрические биосенсоры для определения лактата

Суть метода амперометрии заключается в измерении тока окисления или восстановления электроактивных частиц. На рабочем электроде задаётся

постоянный потенциал относительно электрода сравнения, при котором происходит поляризация рабочего электрода. Наблюдаемый ток пропорционален объёмной концентрации электроактивных частиц, или скорости её изменения в биокаталитическом слое. Амперометрические устройства широко распространены, в качестве примера можно привести лактатный [50] и глюкозный [27] биосенсоры, обладающие на сегодняшний день наилучшими аналитическими характеристиками для определения данных аналитов. Эти аналитические устройства основаны на действии ферментов, которые, в свою очередь, составляют 90% всех коммерчески значимых биосенсоров. В табл. 1 (§ 1.2) приведены сведения об аналитических характеристиках различных амперометрических биосенсоров для определения лактата. Оксидазы катализируют окисление своего специфического субстрата кислородом воздуха, при этом кислород восстанавливается до пероксида водорода. Принцип действия оксидазосодержащих биосенсоров основан на детекции либо субстрата ферментативной реакции – кислорода, либо продукта – пероксида водорода. По данному принципу работают биосенсоры первого поколения, схема действия данных устройств приведена на рис. 2.

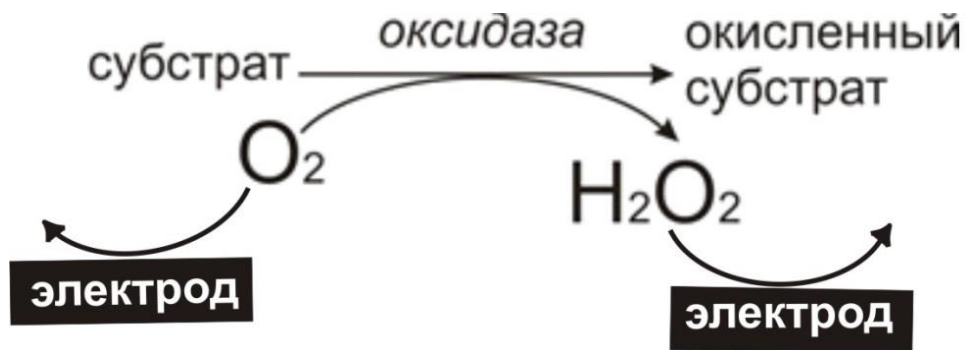


Рис. 2. Схема действия биосенсора первого поколения.

В основе первого предложенного биосенсора лежало каталитическое действие фермента глюкозооксидаза (ГОД), под действием которой происходило окисление глюкозы и фиксировалась концентрация расходуемого кислорода с использованием кислородного датчика [25].

Наряду с определением кислорода при функционировании биосенсоров часто используется метод детекции пероксида водорода, образующегося в ходе ферментативной реакции, который основан на окислении или восстановлении H_2O_2

[97]. В биосенсорах для определения лактата в качестве электрокатализаторов используют берлинскую лазурь [50, 51, 63] и фталоцианин кобальта [46, 64] (табл. 1, §1.2). Ранее было показано, что наиболее эффективное определение пероксида водорода – по его восстановлению, что обеспечивает наивысшую чувствительности и низкий предел обнаружения аналита [99].

Ко второму поколению относят биосенсоры, в которых для сопряжения электродной и ферментативной реакций используют диффузионно-подвижные переносчики электронов, или медиаторы. Медиатор – низкомолекулярный переносящий электроны аналог редокс-кофактора фермента. Он представляет собой редокс-пару, которая переносит электроны от редокс-центра фермента к поверхности электрода. В каталитическом цикле медиатор сначала реагирует с восстановленным ферментом и затем диффундирует к поверхности электрода, где подвергается быстрой электрохимической реакции с переносом заряда (рис. 3). В биосенсорах для определения лактата используют в качестве медиатора метиленовый зеленый [65], мелдоловый голубой [57, 66], гидроксиметил ферроцен [67, 68], комплексы окислительно-восстановительных полимеров осмия [69] и другие (табл. 1, § 1.2).

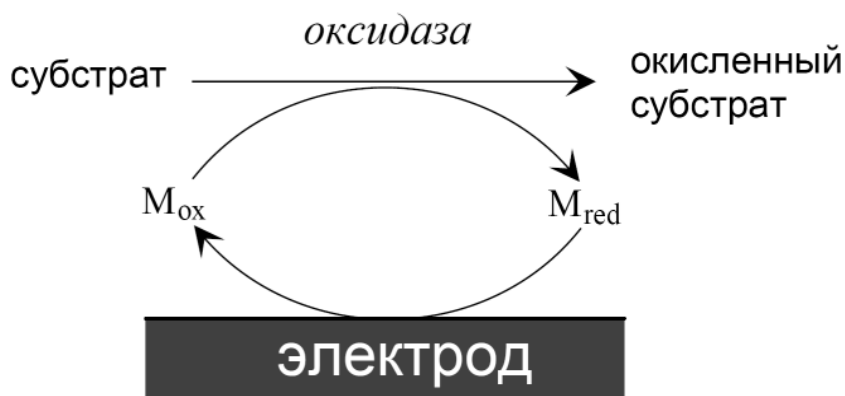


Рис. 3. Схема действия биосенсора второго поколения.

Наибольший интерес вызывают биосенсоры третьего поколения, в которых активный центр фермента может обмениваться электронами напрямую с материалом электрода без использования каких-либо медиаторов (рис. 4) [98].

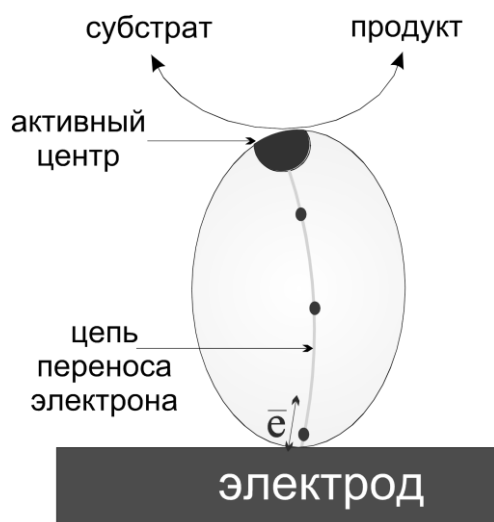


Рис. 4. Схема действия биосенсора третьего поколения.

Однако известно ограниченное число ферментов, способных к прямому биоэлектрокатализу в силу изоляции активного центра белковой оболочкой. Из примерно 1555 известных оксидоредуктаз [100] только несколько способны к прямому переносу электрона [101], среди которых лактатоксидаза не отмечена. Большинство этих ферментов содержат в активном центре гем, железо-серные кластеры или медь. Биосенсоры третьего поколения обладают рядом преимуществ, среди которых простота устройства и меньшая чувствительность к интерферирующим соединениям.

Таким образом, среди электрохимических биосенсоров для анализа реальных объектов наибольшее распространение получили биосенсоры первого поколения с детекцией пероксида водорода путем его окисления или восстановления. При создании высокоэффективных биосенсоров решающими факторами являются выбор трансдьюсера пероксида водорода и иммобилизация фермента на поверхности электрода.

Глава 3. Электрокатализаторы окисления и восстановления пероксида водорода

3.1. Физико-химические характеристики электрокатализаторов окисления и восстановления пероксида водорода

Для создания биосенсоров первого поколения одной из основных задач является нахождение наиболее эффективного трансдьюсера пероксида водорода.

Определение пероксида водорода на платиновых электродах требует использования высоких потенциалов (0.60 – 0.70 В) и представляет собой необратимый двухэлектронный процесс окисления H_2O_2 [97]. При этом константа скорости окисления H_2O_2 составляет порядка 10^{-6} см/с, а диапазон определяемых концентраций пероксида водорода – от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М [102]. Высокое значение рабочего потенциала влечет усиление мешающего влияния других восстановителей на отклик ферментного электрода, таким образом, важнейшим требованием является использование низкопотенциального определения при использовании биосенсоров для анализа биологических жидкостей. Именно поэтому гораздо большей популярностью при создании ферментных электродов пользуется метод определения пероксида водорода, основанный на его восстановлении.

Возможность избирательного определения пероксида водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода на электродах, модифицированных гексацианоферратом железа (берлинской лазурью) при нулевом потенциале и рН, близких к нейтральным, в широком диапазоне концентраций H_2O_2 , впервые была продемонстрирована в 1994 году в лаборатории Электрохимических методов Химического факультета МГУ [27]. Регистрация пероксида водорода по его восстановлению позволяет понизить потенциал и достичь максимальной селективности сенсора.

В результате оптимизации процедуры осаждения пленок БЛ на электродах был создан селективный в широком диапазоне потенциалов электрокатализатор восстановления H_2O_2 [103]. Как видно на рис. 5, при нулевом потенциале ток восстановления пероксида водорода в сотни раз превосходит таковой для кислорода. Использование низкого потенциала определения позволяет устранить шумовой ток легко восстанавливаемых веществ.

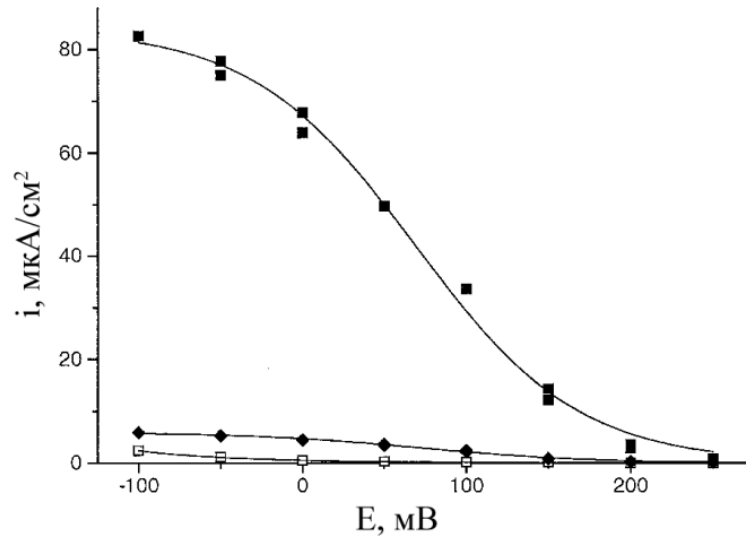


Рис. 5. Вольтамперограмма электрода, модифицированного берлинской лазурью; □ – фоновый ток восстановления кислорода воздуха, ■ – ток восстановления 0.1 мМ Н₂О₂, ◆ – 10 мкМ Н₂О₂ [103].

Таблица 2. Сравнение электрокаталитических свойств и аналитических характеристик существующих систем для определения Н₂О₂

Сенсор	Платиновый микроэлектрод [105]	Электрод на основе пероксидазы [106]	Электрод, модифицированный берлинской лазурью [107]
Электрокаталитические свойства			
Селективность, $j(\text{H}_2\text{O}_2)/j(\text{O}_2)$	0.1	30-40	400-600
Электрохимическая константа, см/с	$4 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Аналитические характеристики			
Коэффициент чувствительности, $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	2.8	1.5	1.0 ± 0.3
Линейный диапазон определяемых концентраций Н ₂ О ₂ , М	$2.0 \cdot 10^{-5} - 4.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-8} - 1.0 \cdot 10^{-6}$	$1.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-2}$

В табл. 2 приведено сравнение основных существующих электрокаталитических систем для определения пероксида водорода [104]. Видно,

что электроды на основе БЛ превосходят платиновые электроды на три порядка как по электрохимической константе, так и по селективности определения пероксида водорода в присутствии кислорода. В то же время стоимость катализатора, синтезируемого из неорганических солей железа, на три порядка ниже, чем платинового. Диапазон определяемых концентраций пероксида водорода при использовании сенсора, модифицированного БЛ, достигает 5 порядков, что значительно больше, чем при использовании платинового или пероксидазного электрода. Кроме того, электроды, модифицированные БЛ, в отличие от электродов на основе платины не подвержены отравлению низкомолекулярными соединениями (такими как тиолы, сульфиды и др.), а возможность использования низких потенциалов при определении H_2O_2 позволяет избежать мешающего влияния восстановителей, присутствующих во многих биологических системах (урат, аскорбат, парацетамол). Все это позволяет значительно расширить область применения БЛ в качестве трансдьюсера пероксида водорода в биосенсорах для анализа реальных объектов.

Таким образом, наиболее эффективным электрокатализатором для определения пероксида водорода при создании биосенсоров в настоящий момент является берлинская лазурь. Основными преимуществами сенсоров на основе БЛ по сравнению с аналогами является их стабильность, широкий диапазон определяемых концентраций и высокая селективность в присутствии кислорода, а также ряда восстановителей, присутствующих в биологических жидкостях.

3.2. Берлинская лазурь

Берлинская лазурь или феррицианид (II) железа (III) $Fe_4^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_3$ – одно из первых изученных координационных соединений, упоминания о котором относятся к началу 18 века. Однако исследования, опубликованные Неффом в 1978 году [110-111], положили начало новому направлению – использованию БЛ в области электрохимии. Берлинская лазурь может образовывать электроактивные пленки после электрохимического осаждения на поверхности электродов. В последние 20 лет активно ведутся фундаментальные исследования пленок БЛ и ее аналогов с точки зрения их синтеза и структуры.

Химический синтез БЛ может быть проведен путем смешивания ионов железа и гексацианоферрата с различной степенью окисления атомов железа, то есть, возможны оба варианта: $\text{Fe}^{3+} + [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ или $\text{Fe}^{2+} + [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. Осаждение БЛ на электродах проводится из водных растворов, содержащих смесь ионов железа Fe^{3+} и феррицианида $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, либо самопроизвольно, либо при протекании катодного тока. Первое электрохимическое осаждение БЛ было осуществлено японскими учеными в 1982 году из водных растворов, содержащих ионы Fe^{3+} и $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ в гальваностатическом режиме, при этом наблюдали за изменением потенциала рабочего электрода с течением времени [112]. Полученные кристаллы проанализированы методом циклической вольтамперометрии.

Хронопотенциометрические исследования эквимольных растворов феррицианида и трехвалентного железа демонстрируют наличие двух плато: при 0/70 В и при 0/40 В [113]. Эти плато соответствуют восстановлению открытого ранее комплекса $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ [114] и ионов трехвалентного железа. Циклическая вольтамперограмма (ЦВА) электрода, модифицированного БЛ, представлена на рис. 6.

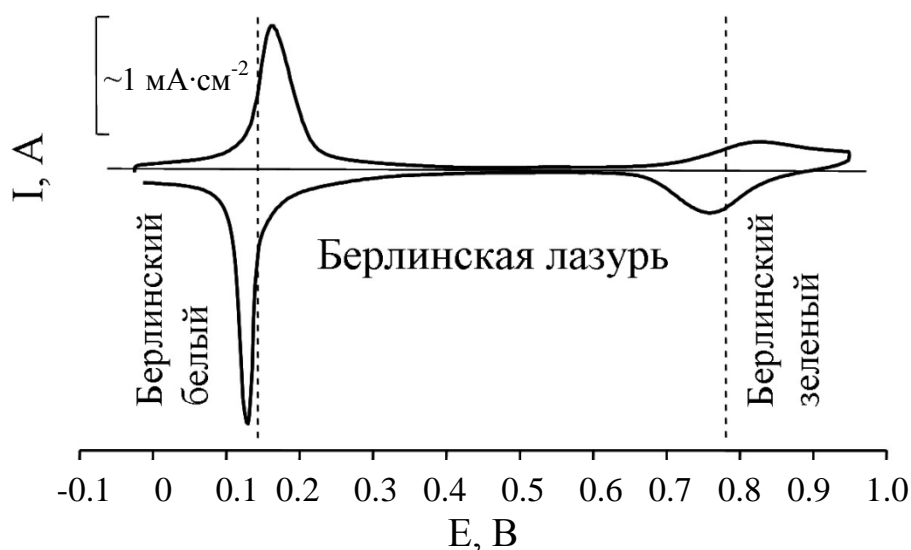


Рис. 6. Циклическая вольтамперограмма электрода, модифицированного берлинской лазурью, в растворе 0.1 М HCl / 0.1 М KCl [107].

На ЦВА пленок БЛ в растворах электролитов, представленной на рис. 6, можно выделить две пары пиков редокс-активности: положение первой пары соответствует формальному потенциалу 0.15 В и характеризует переход берлинской лазури в восстановленную бесцветную форму, именуемую берлинский

белый. Формальный потенциал второй пары пиков равен примерно 0.80 В и соответствует переходу берлинской лазури в окисленную форму, называемую берлинский зеленый. В интервале потенциалов 0.20 – 0.80 В неорганический поликристалл существует в виде яркоокрашенной берлинской лазури.

Существует зависимость редокс-потенциала от активности ионов калия, подчиняющаяся уравнению Нернста: при уменьшении концентрации в растворе ионов калия на порядок потенциал сдвигается в отрицательную область приблизительно на 0.06 В. Кроме ионов калия, в кристаллическую решетку БЛ могут проникать только ионы аммония, цезия и рубидия [115], другие одно- и двухвалентные катионы блокируют электроактивность БЛ.

О качестве электродов, модифицированных пленками БЛ, можно судить по острой форме пиков окисления и восстановления, наблюдаемых на циклических вольтамперограммах. Для достижения регулярной структуры пленок БЛ необходимо учитывать два основных фактора: потенциал электроосаждения и значение pH исходного раствора солей железа. Значение pH исходного раствора, равное 1.0, является оптимальным для осаждения пленок [116, 117].

Возможность избирательного определения пероксида водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода на электродах, модифицированных БЛ, впервые продемонстрирована в работе [108, 118]. Несколькими годами позже в печати появились работы по определению пероксида водорода, основанному на окислении пероксида водорода с помощью БЛ при высоком потенциале [102, 119, 120].

3.3. Использование берлинской лазури для создания биосенсоров первого поколения

Берлинская лазурь находит широкое применение при конструировании биосенсоров на основе иммобилизованных оксидаз. Первая работа в данном направлении опубликована в 1994 году [27]. Примерами биосенсоров, функционирующих на основе БЛ являются глюкозный биосенсор на основе модифицированного берлинской лазурью стеклоуглеродного электрода с иммобилизованной в мембране нафийон глюкозооксидазой [27, 108] и ферментный электрод на основе модифицированной БЛ платины, при приготовлении которого

ГОД иммобилизовали в слой поли-2-фенилендиамина [109]. Значения рабочих потенциалов биосенсоров находились в районе 0.00 В. А также позднее данный принцип был успешно применен для определения лактата, с использованием электродов, модифицированных БЛ с иммобилизованным ферментом лактатоксидазой [50], схема действия биосенсора приведена на рис. 7.

В основе действия биосенсора лежит реакция окисления специфического субстрата (лактата) кислородом воздуха в активном центре фермента. При этом кислород восстанавливается до пероксида водорода, который детектируется на электроде, модифицированном БЛ.

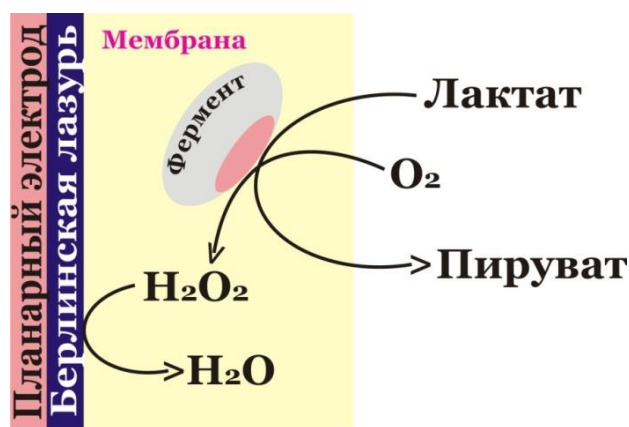


Рис. 7. Схема действия биосенсора на основе берлинской лазури для определения лактата.

В число биосенсоров на основе гексацианоферратов металлов входят также сенсоры для определения глюкозы [121-123], этанола, D-аланина, оксалата [124] и глутамата, причем БЛ используется в большей части данных аналитических устройств.

Таким образом, берлинская лазурь является наилучшим известным электрокатализатором восстановления пероксида водорода, возможность проведения экспериментов при потенциале 0.00 В позволяет избавиться от мешающего влияния восстановителей, присутствующих в биологических жидкостях. Стабильность, широкий диапазон определяемых концентраций и высокая селективность в присутствии кислорода позволяют успешно применять электроды, модифицированные берлинской лазурью, в качестве основы при создании биосенсоров для анализа биологических объектов.

Глава 4. Иммобилизация ферментов при конструировании биосенсоров

4.1. Методы иммобилизации ферментов

Функционирование электрохимических биосенсоров осуществляется посредством сопряжения биохимической и электрохимической реакций. В связи с этим помимо создания эффективного покрытия трансдьюсера при конструировании биосенсора важную роль играет иммобилизация биочувствительного элемента на поверхности рабочего электрода [125]. Иммобилизация – это процесс создания гетерогенных катализаторов путём связывания ферментов с носителями различной химической природы. Именно иммобилизация является наиболее трудоемким процессом при создании биосенсоров, так как благодаря эффективной иммобилизации фермента на поверхности электрода можно добиться длительной стабильной работы датчика, а так же повышения чувствительности и расширения диапазона определяемых концентраций.

Среди методов иммобилизации ферментов наибольшее распространение получили физическое удерживание (адсорбция или захват в полимерном геле) и ковалентное связывание с нерастворимой подложкой.

Адсорбция фермента представляет собой наиболее простой способ создания биочувствительного слоя, являющийся наименее разрушительным для ферментов. При данном способе иммобилизации глобула фермента удерживается на поверхности электрода с помощью электростатических, водородных или гидрофобных взаимодействий [126, 127]. Главным недостатком метода адсорбции фермента на поверхности электрода является вымывание фермента в процессе реакции с определяемым веществом. Для предотвращения данного явления часто применяют метод «двойной иммобилизации» [128]: на поверхность адсорбированного фермента наносят слой мембраны, выступающей также барьером для примесей, влияющих на отклик биосенсора. Однако нередко при нанесении дополнительной мембраны поверх адсорбированного фермента существенно снижается чувствительность биосенсора.

Ковалентная иммобилизация фермента на поверхности электрода позволяет достичь большей стабильности биочувствительного слоя [129]. Для этого используются функциональные группы на поверхности глобулы фермента (аминогруппы, карбоксильные, гидроксильные и имидазольные). При этом в ходе иммобилизации не затрагиваются те функциональные группы, которые важны для проявления каталитической активности фермента. Поэтому иногда ковалентную модификацию проводят в присутствии субстрата фермента. Чаще всего для ковалентной иммобилизации применяют глутаровый альдегид.

Наибольший интерес, с точки зрения сохранения активности фермента, представляет захват фермента в мембраны из полимерного геля. При формировании геля в ферментсодержащей полимерной смеси, фермент захватывается в образующийся гелевый носитель. При контроле степени сшивки геля данный метод может использоваться для любого фермента, поскольку в геле белковые молекулы удерживаются трехмерной решеткой (как, например, в желатине), что используют при создании ферментных электродов [97]. Данный способ иммобилизации обладает двумя основными преимуществами:

- есть возможность одновременно включать в гель и соответствующие переносчики электронов [130, 131];
- матрицы могут выполнять роль ионоселективных мембран, то есть участвовать в формировании отклика биосенсора, или предотвращать мешающее влияние некоторых частиц [132].

4.2. Иммобилизация лактатоксидазы

Молекула фермента лактатоксидазы состоит из 4 - 8 субъединиц массой 43500 Да [133]. Оптимальными условиями для работы фермента являются рН 6.5 и температура 25°C. Как известно из литературы, активный центр лактатоксидазы содержит два остатка аргинина Arg181 и Arg268, которые положительно заряжены [134-136]. Эти аргининовые остатки расположены в непосредственной близости к фламинмононуклеотиду и, вероятно, являются частью субстрат-связывающего участка фермента.

Сохранение длительной активности фермента, иммобилизованного на поверхности электрода, является ключевым фактором при разработке биосенсоров

для возможности их практического применения. Для стабилизации лактатоксидазы на поверхности электрода используют различные стратегии, например, сшивка в полимерную матрицу [38, 59], захват в проводящих и непроводящих полимерах [137, 138], золь-гель метод [50, 56, 139] и гидрогелевые матрицы [140, 141], а также использование бычьего сывороточного альбумина и ковалентное присоединение фермента к электроду [142, 143].

При использовании в биосенсорах иммобилизации ЛОД в γ -аминопропилтриэтоксисилан с бычьим сывороточным альбумином и сшивкой глутаровым альдегидом диапазон определяемых концентраций лактата составил от 0.25 до 1.5 мМ [144, 145], время отклика 25 с, спустя 6 ч непрерывных измерений датчик теряет 60% от первоначального значения, что объясняется вымыванием фермента. Также лактатоксидазу иммобилизовали в гидрогеле из альбумина и муцина, а затем с помощью глутарового альдегида фермент был сшит полимерной матрицей [38]. Время отклика такого биосенсора составило 90 с, а диапазон определяемых содержаний лактата от 0.7 мкМ до 1.5 мМ, при хранении в течение 28 дней датчик не теряет активности. В работе варьировали состав альбумина и муцина в иммобилизующей смеси для ЛОД с целью повышения чувствительности биосенсоров, максимальная чувствительность составила $16.9 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

В работах [146-148] получили лактатные датчики с применением фенилсилоксана. Другой распространенный способ – послойное нанесение на электрод ферментсодержащих растворов и нафионовых мембран (каждый слой сушится перед нанесением следующего) [37]. Но в этом случае увеличивается количество стадий получения сенсора, толщину же наносимых слоев контролировать трудно, поэтому такие сенсоры обладают довольно низкой воспроизводимостью.

В работе [148] были предприняты попытки нанесения на платиновые планарные электроды смеси графитовых паст с ферментом. Начальная чувствительность таких датчиков высока, но операционная стабильность достаточно низкая – уже после нескольких измерений отклики начинают снижаться.

Авторы [149] использовали гидроксиэтилцеллюлозу, синтетический сополимер винилпирролидона и диметиламиноэтилметакрилата, лактитол и

диэтиламиноэтил-декстран для иммобилизации ЛОД. Датчики с декстраном и лактитолом сохраняли около 64% от первоначального отклика после 355 дней хранения при 25°C, сенсоры с использованием сополимера не теряли в значении чувствительности после 172 дней хранения при 25°C. В работе [49] ЛОД в мембранах стабилизировали полиэтиленгликолем и поликарбомаилсульфоновым гидрогелем, ферментсодержащий слой фиксировали дополнительным водонерастворимым слоем нафтона.

Для проведения определения лактата *in vivo* разработаны микросенсоры, пригодные для имплантации в живые ткани. При получении «иглоподобных» («needle-type») биосенсоров использовали ковалентную сшивку глутаровым альдегидом, ЛОД стабилизировали дитиотриэтолом и бычьим сывороточным альбумином, для формирования мембраны внешнего диффузионного контроля использовали поливинилхлорид. При производстве имплантируемого биологического микрочипа [150], предназначенного для совместного определения глюкозы и лактата, использовали стабилизацию ферментов полиэтиленгликолем, мембрана состояла из метакриловых производных полипиррола. Этот сенсор сохранял 80% от исходного значения чувствительности после 5 дней непрерывной работы.

В работе [151] в качестве медиатора переноса электронов использовали производные индоанилина, мембрана Nuclepor® наносилась сверху фермента с медиатором, полученный биосенсор после 19 дней (1710 измерений) сохранял 30% от исходной активности.

В статье [46] описан биосенсор, созданный на основе углеродного планарного электрода, содержащего фталоцианин кобальта в качестве медиатора. В данной работе лактатоксидаза была иммобилизована в мезопористом диоксиде кремния, помещенном в матрицу из поливинилового спирта. Разработанный сенсор сохранял 98% первоначального отклика после 9 мес хранения.

Метод золь-гель иммобилизации был использован при разработке лактатного биосенсора в [152]. Лактатоксидаза была иммобилизована в пористую золь-гель пленку на основе (3-аминопропил)триметоксисилана, 2-(3,4-эпоксициклогексил)этил триметоксисилана и полиэтиленгликоля, при этом

биосенсор не терял отклика при хранении в течение 30 дней при +4°C, предел обнаружения составил $1 \cdot 10^{-5}$ М лактата.

Авторы [33] в своей работе сообщают о формировании коллоидных биокомпозитов, полученных из лактатоксидазы и наноразмерного фталоцианида кобальта. Полученные композиты были впоследствии использованы для иммобилизации лактатоксидазы на поверхности стеклоуглеродного электрода при создании лактатного биосенсора. Коэффициент чувствительности биосенсора в данном случае достигает $3.98 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, при хранении в течение 1 мес при +4°C сохраняется 72% от первоначального значения отклика.

В лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ был разработан способ иммобилизации ферментов в пленки нерастворимого полимера на поверхности трансдьюсера, заключающийся в экспонировании фермента в концентрированный органический растворитель, смешивании его с истинным раствором полимера, нанесении на поверхность трансдьюсера и высушивании [153]. Данный способ обладает тем преимуществом, что формирование мембраны происходит из истинного раствора полимера, что приводит не только к повышению однородности ферментсодержащих мембран, но и к увеличению их активности и стабильности. Эта идеология успешно была применена при создании мембран из перфторсульфонируемого полимера, содержащих иммобилизованную глюкозооксидазу и создания глюкозного биосенсора [154]. А также лактатный биосенсор, превосходящий по аналитическим характеристикам существующие аналоги (табл. 1), работает с использованием данного принципа иммобилизации фермента лактатоксидазы [50].

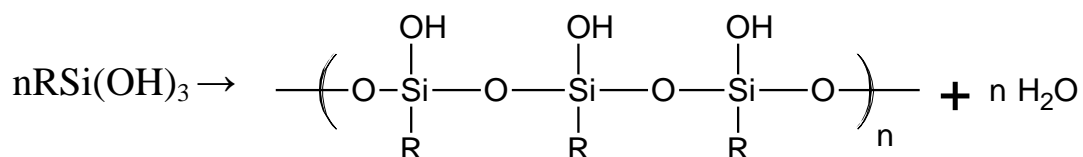
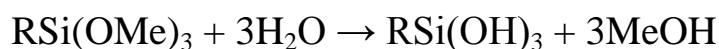
4.3. Мембраны на основе силоксанов

Метод золь-гель иммобилизации все чаще используется для создания биосенсоров. Оксид кремния – отличная матрица для стабилизации биомолекул. Золь-гель метод – низкотемпературный метод, в котором за счет гидролиза и поликонденсации алкоксидов металлов образуется материал с обширной сетью пор. Размер пор в данном методе может контролироваться, чтобы быть достаточно большим для диффузии аналита к активному центру фермента, и достаточно маленьким, чтобы удерживать фермент.

Браун в 1990 году впервые продемонстрировал возможность иммобилизации белковой молекулы в матрицу на основе геля кремния [155]. Пористая неорганическая матрица на основе геля перспективна для развития электрохимических биосенсоров, так как она обладает достаточной жесткостью, химической инертностью, высокой стабильностью и ограниченным набуханием в водном растворе.

Введение различных органических функциональных групп в матрицу на основе неорганических алкоксидов приводит к органически модифицированным гелям, имеющим ряд преимуществ по сравнению с неорганическими. Во-первых, в такой матрице происходит специфичное связывание фермента, что повышает эффективность иммобилизации. Во-вторых, это позволяет связать кофактор фермента с матрицей посредством химической реакции его с органическими группами геля. Кроме того, посредством введения различных гидрофильных или гидрофобных функциональных групп можно контролировать смачиваемость матрицы [156, 157], толщину мембраны и величину пор [158, 159].

В качестве прекурсоров для создания геля чаще всего используются тетраметоксисилан (ТМОС) и тетраэтоксисилан (ТЕОС) (рис. 8). В типичном золь-гель процессе гидролиз этих мономеров приводит к силанолам, связывающимся друг с другом с образованием полисилоксанов. Поликонденсация силанолов и полисилоксанов и последующее высушивание образующегося соединения на воздухе приводит к образованию пористой матрицы геля. Схема процесса выглядит следующим образом [160]:



Кроме ТМОС и ТЕОС часто используются мономеры с такими функциональными группами, как amino-, этокси-, глицидокси- (рис. 8) [160].

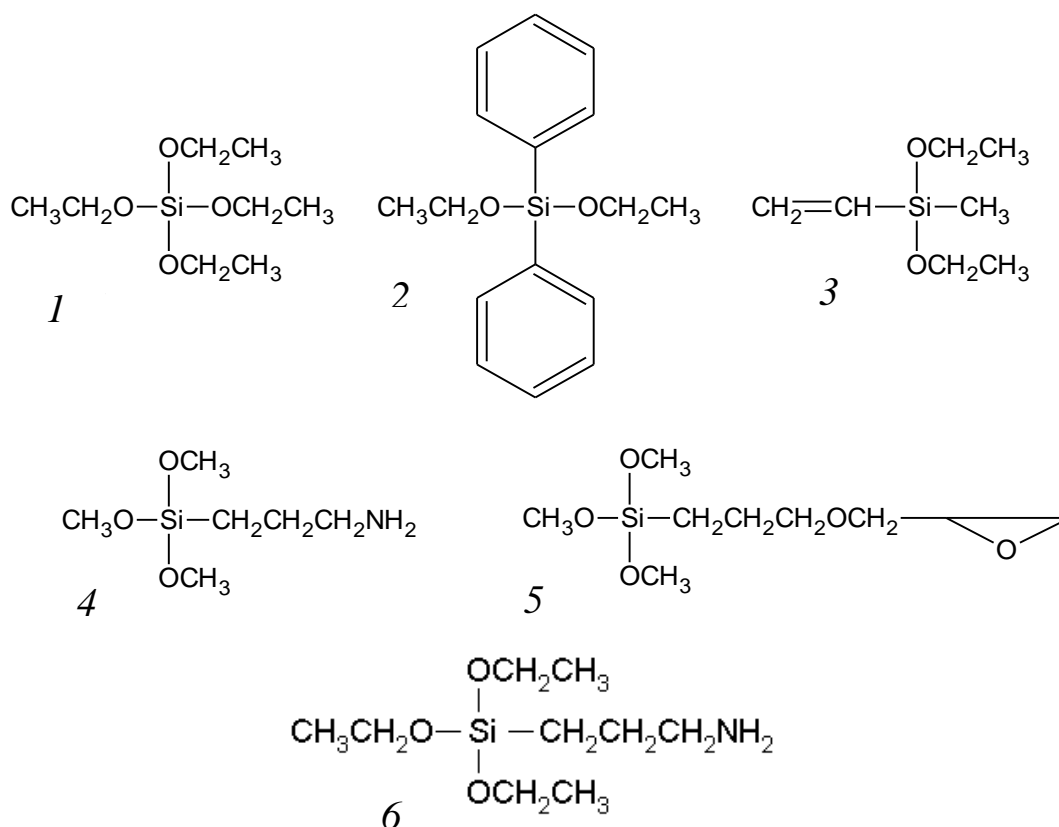


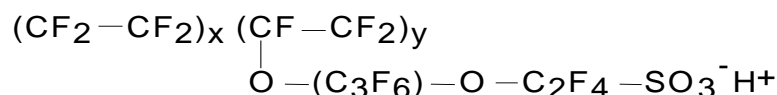
Рис. 8. Наиболее часто используемые прекурсоры в золь-гель методе: 1 – тетраэтоксисилан, 2 – дифенилдиэтоксисилан, 3 - метилвинилдиэтоксисилан, 4 – 3-аминопропилтриметоксисилан, 5 – глицидоксипропилтриметоксисилан, 6 – γ -аминопропилтриэтоксисилан.

3-аминопропилсилоксан γ -NH₂-Pr-Si(OEt)₃ (рис. 8, б), известный как APTES, а также фенилсилоксан и винилсилоксан, успешно применяются для иммобилизации ЛОД на поверхности электродов при создании лактатных биосенсоров [50, 144, 145].

Таким образом, золь-гель метод широко используется при создании биосенсоров и позволяет изменять характеристики электродов модификацией их поверхности матрицей на основе силоксанов, содержащей различные проводящие полимеры, медиаторы, ферменты. Использование геля в качестве матрицы дает возможность регулировать активность ферментов. Например, введение полимеров в матрицу геля влияет на активность иммобилизованной ГОД при создании сенсора для амперометрического определения глюкозы [161].

4.4. Мембраны на основе нафiona

За счет избирательной проницаемости, мембраны на основе полиэлектролитов используются для разделения продуктов реакции или реагентов в ходе синтеза [162]. Мембраны на основе нафiona (Nafion™) - сополимера политетрафторэтилена и полисульфонилфторидвинилового эфира



пользуются наибольшей популярностью при разработке электрохимических сенсоров [104, 163]. На настоящий момент самой широко используемой формой нафiona является 5% раствор полиэлектролита в смеси низших спиртов с 10% содержанием воды, выпускаемый фирмой Aldrich (Германия).

Исследования внутреннего строения твердого полимерного электролита показали, что он имеет двухфазную структуру (рис. 9). Основа полимера (гидрофобная фаза) состоит из фторуглеродных и эфирных цепей, расположенных в пространстве таким образом, что функциональные сульфогруппы группируются внутри сферических полостей диаметром порядка 40 Å. Система связанных узкими каналами полостей, содержащих гидратированные катионы, представляет собой вторую, гидрофильную фазу мембраны [164].

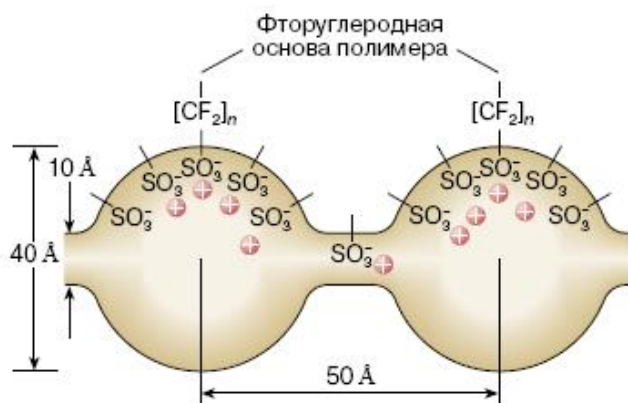


Рис. 9. Внутренняя структура твердого полимерного электролита нафion.

Мембрана нафion состоит из жесткого гидрофобного скелета, образованного политетрафторэтиленовой цепью, области локализации ионных кластеров, содержащих воду, не отличающуюся по свойствам от объемной воды, и промежуточной аморфной области [165].

В 80-х годах XX века в литературе были опубликованы первые данные о включении положительно-заряженных редокс-активных соединений в мембраны нафион [166, 167]. Полученные в результате мембраны обладали высокой степенью адгезии к поверхности платинового электрода и низким удельным электрическим сопротивлением.

Отечественный аналог нафиона – перфторсульфонируемый полимер (ПФС) применяется для создания мембран при конструировании биосенсоров, и, благодаря наличию отрицательно-заряженных сульфогрупп в составе нафиона и ПФС, данные мембраны выступают эффективным барьером для анионов легко окисляемых соединений, оказывающих мешающее влияние на отклик биосенсора. С помощью мембран нафиона и ПФС удалось добиться существенного уменьшения влияния кофеина [168], урата [169], аскорбата [170], а в последствии и парацетамола [170] на отклик глюкозных биосенсоров при физиологических концентрациях данных веществ.

На основании приведенных литературных данных можно заключить, что полимерные мембраны на основе водонерастворимых полиэлектролитов, в частности нафиона и перфторсульфонируемого полимера, являются перспективным материалом для иммобилизации ферментов на поверхности электродов. Такие мембраны характеризуются отсутствием набухаемости в воде, высокой степенью адгезии к поверхности электродов, низким удельным электрическим сопротивлением, а также позволяют создавать биосовместимые (т.е. возможность использования в имплантируемых сенсорах) датчики на их основе.

Таким образом, иммобилизация ферментов имеет немаловажное значение при конструировании биосенсоров. Золь-гель метод широко распространен при создании биосенсоров, использование геля в качестве матрицы дает возможность изменять характеристики электродов. Улучшенный способ иммобилизации ферментов, включающий солюбилизацию ферментов в водно-органических смесях с высоким содержанием органического растворителя, позволяет создать ферментсодержащие мембраны повышенной стабильности и активности и регулировать аналитические характеристики биосенсоров на их основе.

Глава 5. Сканирующая электрохимическая микроскопия

5.1. Общие сведения

Локальные физические свойства поверхности, такие как топография, морфология и реакционная способность, являются одними из наиболее важных задач, решаемых учеными различных областей. Ответ на все эти вопросы дает сканирующая туннельная микроскопия, которая была открыта в 1981 году Генрихом Рорером и Гердом Биннигом и положила начало развитию сканирующей зондовой микроскопии [171]. Сканирующая зондовая микроскопия позволяет получить изображение поверхности и её локальных характеристик. Это происходит путем сканирования поверхности зондом, и получения трехмерного изображения (топографии) с высоким разрешением.

В качестве подкласса сканирующей зондовой микроскопии в 1989 году Алленом Бардом была предложена сканирующая электрохимическая микроскопия [172]. Она представляет собой мощнейший способ визуализации в ближней зоне. В отличие от туннелирования или атомно-силовой микроскопии, СЭХМ позволяет отображать местную химическую и электрохимическую поверхностную активность в микроскопическом разрешении. При помощи данного метода возможно наблюдать пространственную реакционную активность и масс-транспорт на границе жидкость-жидкость, жидкость-твердое тело и жидкость-газ [173-176]. Сканирующая электрохимическая микроскопия применяется в таких областях как: изображение поверхности сенсора [177, 178], измерение концентрации вещества в биологических клетках [179, 180], исследования очень быстрых электрохимических реакций [181, 182], изучение локальной коррозии [183, 184], сканирование электрокатализаторов [100], модификация поверхностей [185].

Работа микроскопа основана на взаимодействии поверхности образца с зондом, который представляет собой микроэлектрод. Зонд фиксируется в системе позиционирования, что позволяет перемещать его в горизонтальном (X, Y) и вертикальном (Z) направлениях. Фарадеевский ток, генерирующийся в системе в процессе сканирования, измеряется с помощью (би)потенциостата.

5.2. Принцип работы сканирующего электрохимического микроскопа

Принципиальная схема сканирующего электрохимического микроскопа разделяется на три основные части. Во-первых, это (би)потенциостат, который контролирует три (рабочий электрод - WE, электрод сравнения - RE и вспомогательный - CE) или четыре (два рабочих электрода - WE1 и WE2, электрод сравнения - RE и вспомогательный - CE) электрода и одновременно измеряет фарадеевский ток, генерируемый подложкой и/или зондом (рис. 10). Во-вторых, это точная система позиционирования, которая позволяет перемещать зонд в горизонтальном (X, Y) и вертикальном (Z) направлениях с высокой долей точности (до нм). И, наконец, это компьютер, который позволяет управлять системой позиционирования, хранить данные, а затем их обрабатывать.

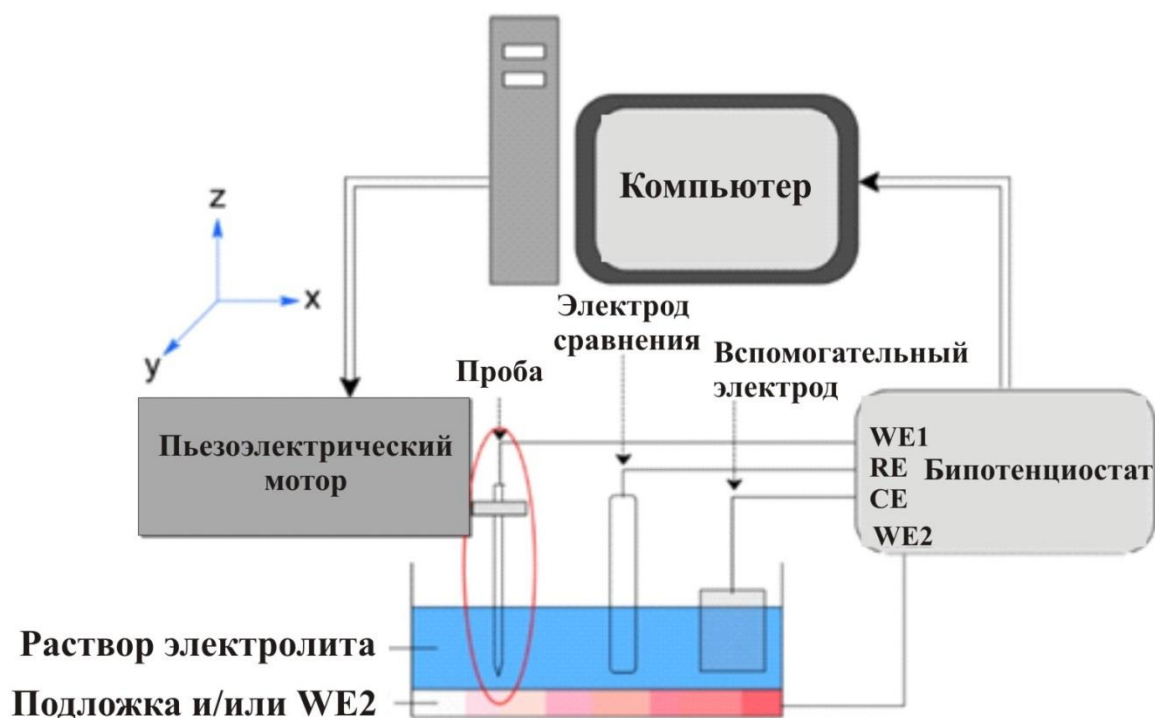


Рис. 10. Схема измерений сканирующего электрохимического микроскопа.

5.3. Гибкие планарные микроэлектроды в качестве зондов для сканирующей электрохимической микроскопии

В сканирующей электрохимической микроскопии сигнал, регистрируемый зондом, зависит от реакционной способности поверхности образца и расстояния d между поверхностью и электродом. Для получения картины реакционной

способности образца величина d должна быть постоянной в течение всего эксперимента. Наиболее часто используемыми зондами для СЭХМ являются микроэлектроды из платиновой проволоки, диаметром 10 или 25 мкм, запаянные в стеклянный капилляр [186-191]. Однако при наличии у поверхности шероховатостей и неровностей возникают сложности при работе со стеклянными электродами. Это происходит потому что расстояние между электродом и поверхностью не всегда остается неизменным, соответственно величина d не постоянна, а при столкновении с поверхностью образца микроэлектрод трескается и ломается [192].

Предложен новый вид амперометрических зондов для СЭХМ, представляющих из себя гибкие планарные микроэлектроды из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) с углеродным микроканалом [192]. Гибкие микроэлектроды лишены вышеописанного недостатка, поскольку тонкая пленка ПЭТФ изгибается при соприкосновении с поверхностью, что позволяет проводить измерения в непосредственном контакте с подложкой. Толщина пленки ПЭТФ задает постоянное рабочее расстояние между электродом и образцом, как показано на рис. 11.

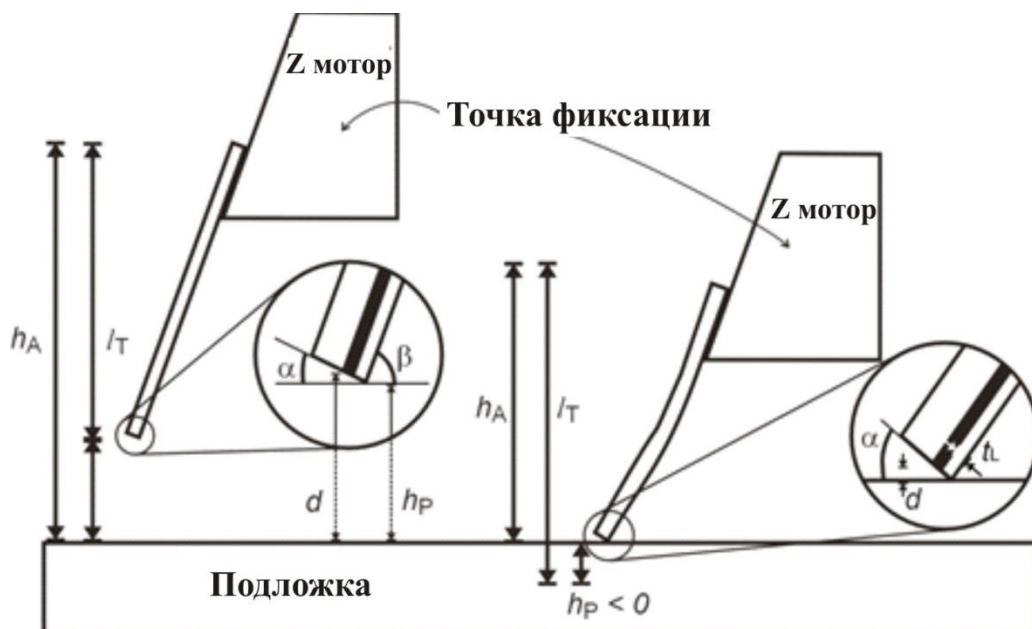


Рис. 11. Схема, демонстрирующая рабочее расстояние в отдалении и при контакте с исследуемой подложкой при проведении экспериментов на микроскопе.

Справа на рис. 11 показано как зонд касается поверхности и изгибается на некоторый угол, что позволяет проводить сканирование СЭХМ в контактном

режиме с подложкой. Это является преимуществом, так как при сканировании шероховатых поверхностей наклон зонда компенсирует топографические особенности, образуя одинаковые рабочие расстояния. Выводы по положению зонда в системе относительно подложки и введение зонда в контакт с поверхностью осуществляют на основании кривой приближения (в англоязычной литературе “approach curve”). Кривая приближения представляет собой функцию зависимости тока, регистрируемого на микроэлектроде, от расстояния до исследуемой подложки. Для математического описания ситуации после касания образца зондом была введена вертикальная координата h_p , которая представляет разницу $h_p = h_A - l_T$ между верхней точкой присоединения зонда h_A и вертикальной координатой длины выпрямленного зонда l_T (рис. 11). Таким образом, действующее рабочее расстояние d определяется как:

$$d = \begin{cases} d = h_p + t_L \sin(\alpha); & (h_p \geq 0, \text{ в отдалении от подложки}) \\ d = t_L \sin(\alpha); & (h_p < 0, \text{ контактный режим}) \end{cases}$$

где t_L – толщина пленки ПЭТФ, покрывающей углеродный канал, α – угол между плоскостью сечения зонда и поверхностью образца. Расположение зонда в контактном и неконтактном режимах показано на рис. 11.

Кривая приближения моделируется только при $h_p \geq 0$ потому что эластическая деформация и скольжение зонда при контакте с подложкой не могут быть объяснены текущей моделью [192].

Сканирование и получение изображения СЭХМ в контактном режиме было представлено и ранее [192, 193]. Однако основным преимуществом использования гибких планарных зондов для СЭХМ является возможность проведения сканирования с постоянной величиной d по неровной и наклонной поверхности без каких-либо дополнительных приспособлений [193].

Таким образом, сканирующая электрохимическая микроскопия является одним из мощнейших современных методов исследования локальных свойств поверхности, который позволяет регистрировать местную электрохимическую активность в ближней зоне. Путем адаптации сканирующей электрохимической микроскопии ферментсодержащие мембраны различных составов можно

сканировать для выявления профиля концентрации пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции, с целью упрощения и ускорения процесса оптимизации биосенсоров.

* * *

Из анализа литературных данных можно сделать следующие выводы. Лактат является одним из важнейших метаболитов, рассматриваемых в клинической диагностике и в спортивной медицине. Данные по концентрации лактата в крови в процессе физических упражнений позволяют классифицировать режимы интенсивности беговых или иных нагрузок у спортсменов и, как следствие, повысить возможности реализации функциональных и тренировочных потенциалов. У профессиональных спортсменов измерение уровня лактата в крови представляет неотъемлемый элемент тренировки, в связи с чем, неинвазивные методы определения аналита вызывают большой интерес. Исследования показали, что увеличение концентрации лактата в крови коррелирует с увеличением содержания аналита в поте [11, 77, 83].

Содержание лактата в поте в состоянии покоя по нескольким источникам составляет от 4 до 25 мМ [11, 84-87], однако при тяжелых физических нагрузках эта концентрация достигает 40 – 80 мМ [11, 84, 86]. Из всего множества методов определения лактата не существует известных, позволяющих проводить измерение аналита в данном диапазоне определяемых концентраций, даже так называемый «неинвазивный датчик для определения лактата в человеческом поте в процессе реального времени» лимитируется только 20 мМ как самой высокой определяемой концентрацией [92], чего не достаточно для мониторинга лактата в процессе физических нагрузок. В настоящей работе предлагается решить данную проблему путем создания высокоэффективных биосенсоров для определения лактата, демонстрирующих наилучшие аналитические характеристики, с возможностью расширения диапазона определяемых концентраций в область высоких значений с целью создания неинвазивного монитора на лактат для анализа неразбавленного пота.

Лидирующее место среди методов определения лактата занимают ферментативные методы, основанные на каталитическом действии фермента

лактатоксидазы, обладающие наивысшей специфичностью, точностью и воспроизводимостью результатов. При этом среди электрохимических биосенсоров для анализа реальных объектов наибольшее распространение получили биосенсоры первого поколения, при создании которых решающими факторами являются выбор трансдьюсера пероксида водорода и иммобилизация фермента на поверхности электрода.

Как известно, наилучшим известным электрокатализатором восстановления пероксида водорода признана берлинская лазурь, позволяющая проводить эксперименты при потенциале 0.00 В, и, благодаря чему, исключить мешающее влияние восстановителей, присутствующих в биологических жидкостях. А использование улучшенного способа иммобилизации ферментов, включающего солюбилизацию ферментов в водно-органических смесях с высоким содержанием органического растворителя, позволяет создать ферментсодержащие мембраны повышенной стабильности и активности и регулировать аналитические характеристики биосенсоров на их основе.

Сканирующая электрохимическая микроскопия является современным методом исследования локальных свойств поверхности и признана мощнейшим способом визуализации в ближней зоне. В данной работе предложено адаптировать сканирующую электрохимическую микроскопию для скрининга ферментсодержащих мембран с целью упрощения и ускорения процесса оптимизации биосенсоров.

Глава 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

6.1. Материалы

Все эксперименты проводились в дистиллированной воде. В работе были использованы следующие неорганические соли: хлорид калия KCl (х.ч., Химмед, Россия), дигидрофосфат калия KH_2PO_4 (ч.д.а., Хеликон, Россия), хлорид железа шестиводный $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), гексацианоферрат (III) калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (х.ч.).

Раствор соляной кислоты готовили из фиксаналов фирмы Germen (Германия). Для нейтрализации буферов использовали гидроксид калия KOH фирмы Реахим (Россия).

Для изготовления мембран использовали:

- γ -аминопропилтриэтоксисилан $\gamma\text{-NH}_2\text{PrSi}(\text{OEt})_3$ с концентрацией 97% в изопропиловом спирте, предоставленный сотрудниками группы мезоморфных кремнеорганических соединений института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС РАН);
- отечественный аналог нафiona – перфторсульфонируемый полимер (ПФС) МФ4СК (10%-ный раствор в изопропиловом спирте), производство ОАО «Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия.

Для нейтрализации растворов ПФС использовали 25% раствор гидроксида аммония NH_4OH (Феррейн, Россия).

Для создания биосенсоров была использована лактатоксидаза (ЕС 1.1.3.2) из *Rediosoccus species* в виде лиофилизованного белка с заявленной активностью $72 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Sorachim, Швейцария).

Для исследования аналитических характеристик сенсоров для определения пероксида водорода и биосенсоров применяли 30% раствор пероксида водорода H_2O_2 (Реахим, Россия) и L-лактат 40% раствор (ICN, США) соответственно. Точную концентрацию пероксида водорода определяли спекрофотометрически при длине волны 230 нм ($\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2) = 72.7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Точную концентрацию лактата определяли с помощью кислородного электрода Кларка.

Для активации потовой железы использовали пилокарпин 1% (ФГУП «Московский эндокринный завод», Москва, Россия).

Образцы пота были предоставлены студентами, аспирантами и сотрудниками МГУ им. М. В. Ломоносова и другими добровольцами.

В работе были использованы растворы:

для анализа в проточно-инжекционной системе, в режиме периодического тестирования (batch-режим), в проточной тонкослойной ячейке с капилляром и в неинвазивном мониторе:

- буферный раствор – 0.1 М КСl, 0.05 М КН₂РО₄ (рН 6.0);

для активации берлинской лазури и проведения электрофореза:

- фоновый электролит – 0.1 М КСl, 0.1 М НСl.

Для создания капилляра на поверхности планарного биосенсора использовали двухстороннюю клейкую ленту (фирмы ООО «Бизнес Парк», Россия).

6.2. Оборудование

Пробоподготовка

В ходе работы использовали шприцы Hamilton производства Aldrich (США) на 5, 10 и 20 мкл.

Мешалка для проб Vortex V6 (ELMI Латвия).

Планарные электроды

В работе использовали планарные электроды (рис. 12, 13), изготовленные методом трафаретной печати (ООО «Русенс», Россия) на трафаретном печатном станке SCF – 300 (Technical Industrial Co. Ltd., Гонконг) с использованием материалов:

- пленка полиэтилентерефталата толщиной 250 мкм (Владимирский химический завод, Россия);
- углеродная резистивная полимерная паста ПУРП-ГП-Н (НПП «Дельта-Пасты», Россия);
- высокотемпературная углеродная резистивная полимерная паста ПУРП-005 (НПП «Дельта-Пасты», Россия);

- серебрясодержащая полимерная паста ПСП-2 (НПП «Дельта-Пасты», Россия);
- углеродная паста C10903P14 (Gwent Electronic Materials Ltd., Великобритания);
- у/ф отверждаемая изоляционная паста (Gwent Electronic Materials Ltd., Великобритания).

Производство планарных электродов состояло из трёх стадий:

- 1) на основу из поливинилхлорида наносили слой серебра толщиной 20 мкм,
- 2) на область рабочего и вспомогательного электродов наносили слой углеродной пасты,
- 3) сверху наносили слой изолятора, оставляя открытыми рабочий, вспомогательный электроды и электрод сравнения.

Все значения потенциалов, приводимых в работе, измерены относительно хлоридсеребряного электрода.

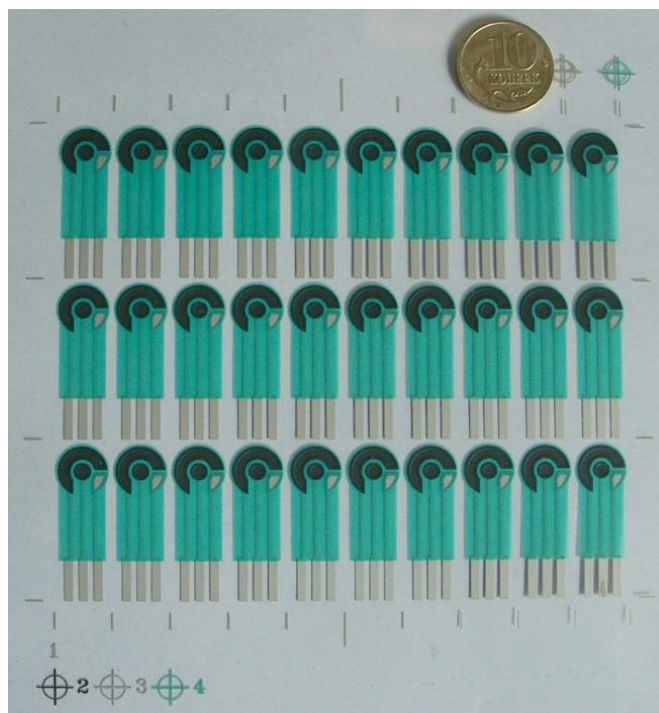


Рис. 12. Планарные электроды, изготовленные методом трафаретной печати.

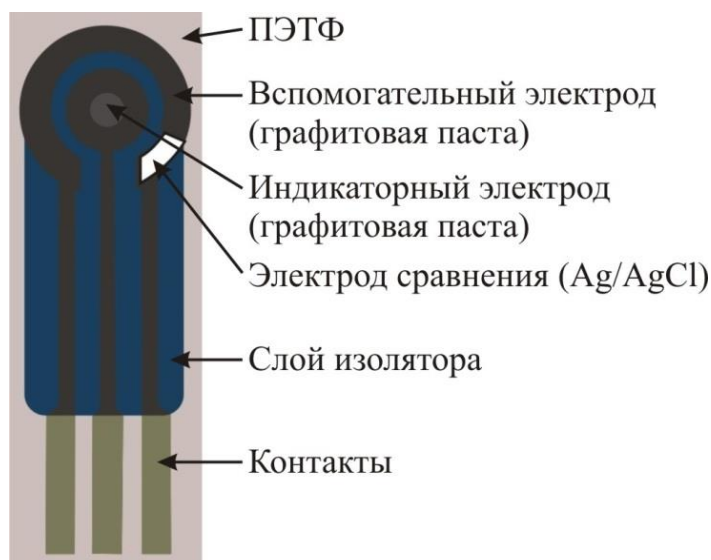


Рис. 13. Изображение планарного электрода.

Гибкие планарные микроэлектроды³

В работе использовались гибкие планарные микроэлектроды в качестве зондов для сканирующего электрохимического микроскопа (рис. 14). Для изготовления микроэлектродов использовали следующие материалы:

- пленка ПЭТФ толщиной 100 мкм (Melinex, США);
- углеродная резистивная полимерная паста Electradorcarbonink (Electra Polymer & Chemicals Ltd., Великобритания);
- пленка ПЭ(полиэтилен)/ПЭТФ для ламинирования (PE/PET, Rayne, Великобритания).

Лазерную абляцию проводили с использованием эксимерного ультрафиолетового Ar F-лазера (Lambda Physik, Германия).



Рис. 14. Схема микроэлектрода, изготовленного методом лазерной абляции.

³ Микроэлектроды изготавливались соискателем в процессе стажировки в лаборатории физической и аналитической электрохимии Федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария).

Спектрофотометрические измерения

Измерение поглощения растворов пероксида водорода осуществляли с помощью спектрофотометра LKB-Ultraspec VII (Bromma, Швеция). В эксперименте использовали кварцевую кювету толщиной 1 см.

Электрохимические измерения

Электрохимические измерения с использованием планарных электродов проводили с помощью универсального портативного потенциостата - гальваностата PalmSens или EmStat (Palm Instruments BV, Нидерланды) и персонального компьютера.

Модификация гибких планарных микроэлектродов БЛ проводилась с использованием универсального портативного потенциостата - гальваностата PalmSens. В качестве вспомогательного электрода использовалась платиновая проволока, в качестве электрода сравнения использовали истинный хлоридсеребряный электрод, находящийся в 1 М KCl и отделенный от ротового раствора керамической мембраной.

СЭХМ-измерения⁴ проводили с использованием (би)потенциостата Ivium Compact Stat под управлением пакета программ Ivium Soft (Ivium Technologies, Нидерланды). В ходе эксперимента использовалась трехэлектродная система, в качестве рабочего электрода использовали гибкие планарные микроэлектроды, модифицированные БЛ. В качестве вспомогательного электрода - платиновая проволока, в качестве электрода сравнения - серебряная проволока. Измерения проводились в растворе лактата, приготовленном с использованием буферного раствора (рН 6.0).

В ходе экспериментов поддерживали постоянное напряжение 0.00 В.

Для контроля кислотности среды использовали рН метр Cole-Parmer LH-407.

Проточно-инжекционный анализ

Система ПИА состояла из перистальтического насоса Masterflex US (Cole Parmer Instrument Company, США) и инжектора с объемом петли 50 мкл, соединенных с проточной амперометрической ячейкой. В первом случае ячейка

⁴ Эксперименты с использованием СЭХМ проводились автором в процессе стажировки в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария).

представляла собой рабочую камеру, куда помещается планарный электрод (рис. 15, а), во втором случае ячейка представляла собой капилляр, одной из стенок которого является планарный электрод (рис. 15, б).

Электрохимический сенсор представлял собой трёхэлектродную систему: на его поверхности находятся рабочий и вспомогательный электроды, а также электрод сравнения.

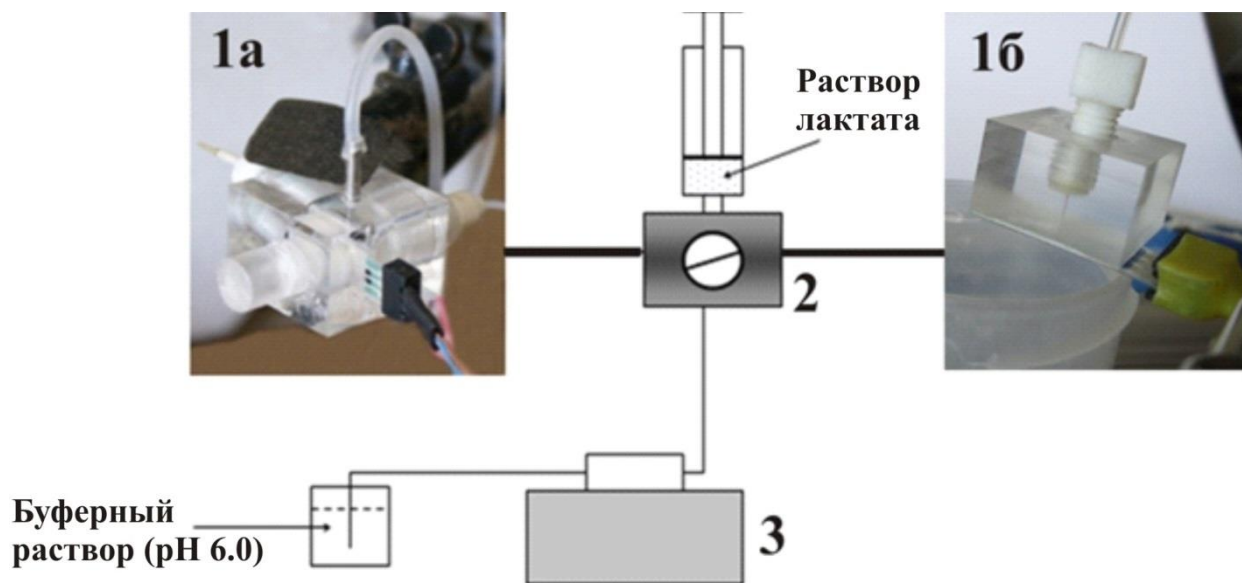


Рис. 15. Схема проточно-инжекционной системы: 1 – проточная амперометрическая ячейка, 2 – инжектор, 3 – перистальтический насос; а – стандартная проточная ячейка, б - тонкослойная ячейка.

Для тестирования амперометрического сенсора система подсоединялась к потенциостату и персональному компьютеру.

Измерения в режиме периодического тестирования (batch)

Измерения в периодическом режиме тестирования проводили при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в ячейке ёмкостью 250 мкл (рис. 16), либо в стакане ёмкостью 3 или 5 мл. Данные измерения встречаются в литературе под названием batch-режим (в «пакете») или стационарный режим.

Для тестирования сенсоров и биосенсоров система подсоединялась к потенциостату и персональному компьютеру.



Рис. 16. Ячейка для определения в batch-режиме.

Сканирующая электрохимическая микроскопия

Измерения на сканирующем электрохимическом микроскопе проводили с использованием специальной электрохимической установки, использующей систему позиционирования Märzhäuser (Märzhäuser Wetzlar Gmb H&Co KG, Германия) с пьезоэлектрической системой (PI, Gmb H&Co KG, Германия) под управлением некоммерческого программного обеспечения SECMx, все электрохимические измерения проводили с использованием (би)потенциостата Ivium Compact Stat (Ivium Technologies, Нидерланды) (рис. 17).

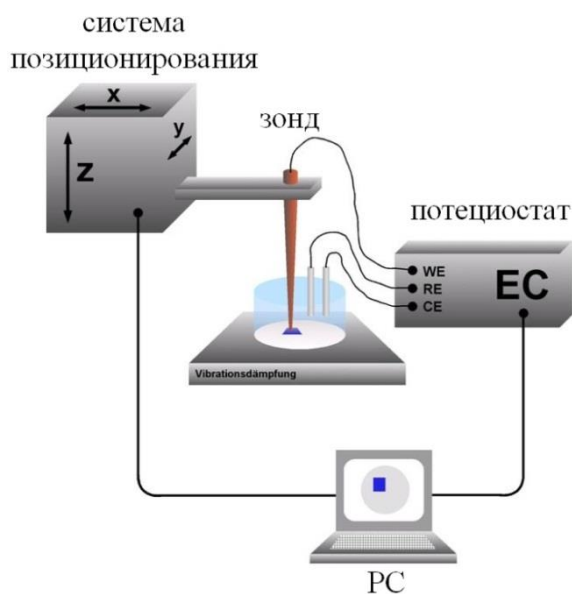


Рис. 17. Принципиальная схема сканирующего электрохимического микроскопа.

Зонды для сканирующего электрохимического микроскопа представляли собой гибкие планарные микроэлектроды, модифицированные БЛ. Типичная площадь рабочего электрода составляла порядка 200 - 300 $\mu\text{м}^2$.

Ячейка, подключенная к бипотенциостату, содержала рабочий электрод – микроэлектрод, модифицированный БЛ, платиновый вспомогательный электрод и хлоридсеребрянный электрод сравнения. Все эксперименты проводили в растворе лактата, проготовленном с использованием буферного раствора (рН 6.0).

Сканирующая электронная микроскопия⁵

Для получения трехмерного изображения шероховатости, текстуры поверхности и формы ферментсодержащих мембран использовали сканирующий электронный микроскоп LEO 1550 (Carl Zeiss, Йена, Германия).

Сканирующая лазерная микроскопия⁶

Бесконтактные 2D и 3D изображения шероховатости и текстуры поверхности ферментсодержащих мембран получали с помощью сканирующего лазерного микроскопа VK 8700 (Keyence, Осака, Япония).

Измерения на профилометре

Для измерения высот ферментсодержащих мембран и последующего расчета плотностей проводились измерения на профилометре (Talystep, Taylor-Hobson, Великобритания).

Электрофорез

Для усиления потоотделения проводили электрофорез с 1% пилокарпином. Для электрофореза использовали Гальванизатор «Поток-1» (ЗАО «Завод ЭМА», Екатеринбург, Россия).

6.3. Методы

6.3.1. Изготовление гибких планарных микроэлектродов методом лазерной абляции

С поверхности пленки из полиэтилентерефталата при помощи лазера удаляли часть материала в виде полукруглого микроканала сечением $\approx 20 \times 40$ мкм.

^{5,6} Эксперименты с использованием сканирующих электронного и лазерного микроскопов проводились автором в процессе стажировки в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария).

Затем полученный микроканал заполняли углеродной пастой, формируя стержень микроэлектрода сечением в виде полумесяца в соответствии с рис. 18.

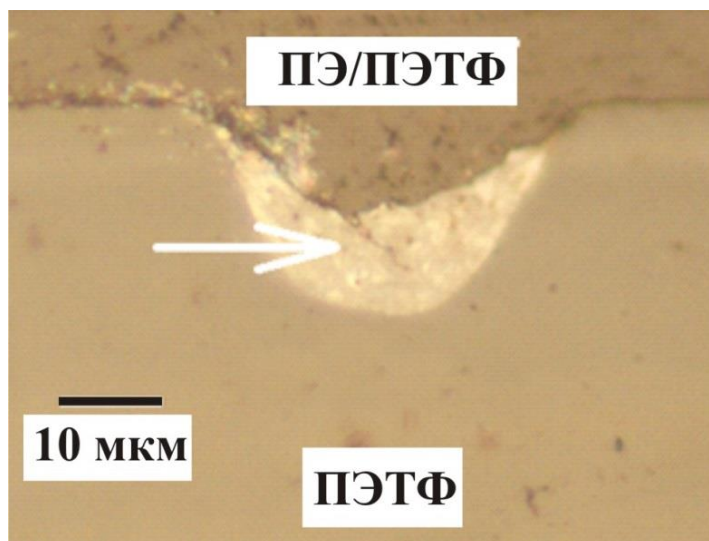


Рис. 18. Микрофотография поперечного сечения микроэлектрода, стрелкой показана углеродная поверхность.

После нанесения углеродной пасты электроды прокаливали при 100°C в течение 45 мин. Описанную процедуру нанесения углеродной пасты с последующим прокаливанием проводили трехкратно. Полученный в микроканале углеродный стержень сверху закрывали при помощи ламинирования полиэтиленовой(ПЭ)/полиэтилентерефталатной(ПЭТФ) пленкой. Для создания электрического контакта с микростержнем часть ламината удаляли вручную и в области вершины стержня наносили некоторое количество углеродной пасты для создания небольшой контактной области в соответствии с рис. 14.

6.3.2. Модификация планарного электрода берлинской лазурью

Изготовление сенсора для определения H_2O_2 на основе планарных электродов проводили методом, разработанным ранее в лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ [194] и основанным на последовательном нанесении на поверхность электрода смеси растворов соли железа с пероксидом водорода и раствором $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Пероксид водорода, используемый в смеси с катионом железа, окисляет поверхность планарного

электрода, образуя отрицательный заряд. Это способствует более сильному связыванию катионов железа с поверхностью.



На основе представленной реакции на поверхности образуется комплекс $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который, реагируя с пероксидом водорода, образует БЛ.

Осаждение берлинской лазури на поверхность электродов проводили из реакционной смеси состава: 4 мМ FeCl_3 и 4 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в фоновом электролите 0.1 М KCl , 0.1 М HCl . Смесь предварительно выдерживали в течение 20 мин в пробирке Эппендорфа в темноте, затем ее наносили на рабочий электрод (рис. 19). Через 15 мин, в каплю на электроде добавляли пероксид водорода до достижения концентрации 100 мМ в капле и выдерживали полученную смесь на электроде в течение 45 мин. На рис. 19 продемонстрировано изменение окраски капли с реакционной смесью после добавления пероксида водорода с течением времени.

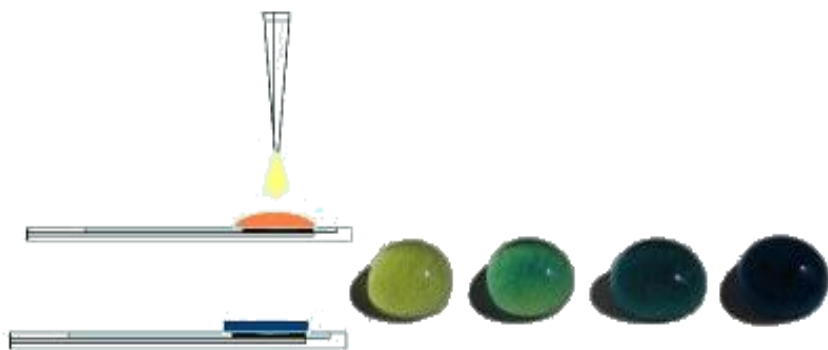


Рис. 19. Изменение окраски капли с реакционной смесью при модификации планарных электродов берлинской лазурью.

По окончании осаждения (по истечении выбранного для выдерживания капли времени) поверхность электродов промывали дистиллированной водой.

Для оценки эффективности осаждения БЛ проводили активацию электрода (потенциодинамическая обработка модифицированного БЛ электрода в циклическом режиме в фоновом электролите в интервале потенциалов от -0.05 до 0.35 В) [99]. После высыхания электроды прокаливали при 100°C в течение часа и охлаждали до комнатной температуры. Сенсоры считались надлежащего качества, если наблюдались следующие аналитические характеристики: коэффициент чувствительности не менее 0.2 $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, линейный диапазон определяемых

концентраций H_2O_2 не менее 2 порядков, операционная стабильность не менее 60 мин.

6.3.3. Модификация гибкого планарного микроэлектрода берлинской лазурью

Модификация гибких планарных микроэлектродов берлинской лазурью для определения концентрации пероксида водорода проводилась по методике, разработанной ранее в лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ [195-197].

На поверхности рабочих электродов изготовленных гибких планарных микроэлектродов осаждались электрохимически кристаллы берлинской лазури по следующей методике. Ростовый раствор содержал 4 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 4 мМ FeCl_3 в фоновом электролите 0.1 М KCl , 0.1 М HCl . Электроосаждение БЛ проводили в трехэлектродной системе в потенциодинамическом режиме, при развертке потенциала, подаваемого на рабочий электрод в диапазоне от 0.40 до 0.75 В при скорости развертки потенциала 20 мВ/с в течение 5 - 7 циклов. В качестве вспомогательного электрода использовалась платиновая проволока, в качестве электрода сравнения - истинный хлоридсеребряный электрод, находящийся в 1 М KCl и отделенный от ростового раствора керамической мембраной. После осаждения микроэлектрод удаляли из ростового раствора и тщательно промывали водой.

Микроэлектроды, модифицированные покрытиями берлинской лазури, подвергали потенциодинамической обработке в диапазоне потенциалов от -0.05 до 0.35 В в фоновом электролите 0.1 М KCl , 0.1 М HCl при скорости развертки потенциала 40 мВ/с в течение 18 циклов с целью насыщения катионами калия. После чего микроэлектроды ожигали при 100°C в течение часа и охлаждали до комнатной температуры. Сенсоры считались надлежащего качества, если наблюдались следующие аналитические характеристики: коэффициент чувствительности не менее $0.5 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, линейный диапазон определяемых концентраций H_2O_2 не менее 2 порядков, операционная стабильность не менее 120 мин.

6.3.4. Спектрофотометрическое определение концентрации пероксида водорода

Концентрацию пероксида водорода в коммерческом препарате определяли спектрофотометрически: разбавляли коммерческий раствор (в $2 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^4$ раз) в дистиллированной воде, затем полученный раствор пероксида водорода помещали в кварцевую кювету. Измеряя оптическую плотность растворов H_2O_2 при длине волны 230 нм, рассчитывали концентрацию пероксида водорода в образцах ($\epsilon(H_2O_2) = 72.7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $l = 1 \text{ cm}$).

6.3.5. Измерение активности лактатоксидазы в водно-органических смесях по скорости окисления лактата

Скорость окисления лактата под действием лактатоксидазы (общей активности ЛОД) измеряли при помощи планарного электрода, модифицированного БЛ в ячейке на 250 мкл в batch-режиме при 25°C. А именно, регистрировали изменение тока, пропорциональное скорости накопления пероксида водорода в системе в ходе химической реакции, катализируемой ферментом.

Для измерения общей активности растворенного в воде фермента ячейку заполняли фосфатным буферным раствором, содержащим ЛОД (1 мг/мл) и при рабочем потенциале 0.00 В и постоянном перемешивании следили за установлением фонового тока. После чего инжесктировали раствор лактата натрия, до достижения концентрации его в растворе $1 \cdot 10^{-5}$ М. Фиксировали скорость накопления пероксида водорода – тангенс угла наклона прямой. Далее подобные измерения проводили при концентрациях лактата: $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ М, для каждой концентрации аналитический сигнал рассчитывали по результатам трех измерений.

Общую активность фермента определяли как скорость накопления пероксида водорода в ходе реакции ($\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$). Удельную активность фермента в растворе определяли как количество мкмоль пероксида водорода, накопленного в присутствии 1 мг фермента в течение 1 мин.

Удельная активность фермента равняется его массе (в мг), которая способна превратить 1 мкмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях и выражается в [мкмоль/мин/мг].

6.3.6. *Определение концентрации лактата с использованием электрода Кларка*

Измерение концентрации лактата осуществляли при помощи кислородного электрода Кларка при 25°C: при этом регистрировали изменение тока, пропорциональное скорости убывания кислорода в системе в ходе химической реакции, катализируемой ферментом.

Ячейку со встроенным электродом Кларка заполняли раствором лактата, приготовленным с использованием буферного раствора (рН 6.0). Для этого коммерческий препарат лактата последовательно разбавляли в $3 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^6$ раз. При рабочем потенциале -0.60 В и постоянном перемешивании следили за установлением базового (фонового) тока восстановления кислорода. Величина тока восстановления кислорода пропорциональна растворимости молекулярного кислорода в буферном растворе при температуре 25°C, т.е. $2.5 \cdot 10^{-4}$ М. После выхода на стационарный уровень инжескировали водный раствор фермента, до конечной концентрации в ячейке 1 мг/мл.

Концентрацию лактата определяли как количество израсходованного в реакции кислорода, для этого рассчитывали интеграл на основании экспериментальной кривой.

6.3.7. *Иммобилизация лактатоксидазы в мембрану силоксана*

Иммобилизация лактатоксидазы в мембрану γ -аминопропилтриэтоксисилана проводилась по методике, разработанной ранее [89, 198]. Методика включала в себя следующие стадии:

- 1) разбавление коммерческого препарата силоксана абсолютным изопропиловым спиртом;
- 2) разбавление фермента ЛОД дистиллированной водой до концентрации 10 мг/мл;

- 3) смешивание водного раствора фермента со спиртовым раствором силоксана (до достижения концентрации фермента 1 мг/мл, а содержания силоксана от 0.1 до 5.0 об.%);
- 4) нанесение аликвоты 2 мкл ферментсодержащей смеси на рабочую поверхность электрода, модифицированного БЛ;
- 5) высушивание при +4°C 45 мин.

6.3.8. Иммобилизация лактатоксидазы в мембрану перфторсульфонируемого полимера

Иммобилизация лактатоксидазы в мембрану перфторсульфонируемого полимера (ПФС - аналога нафiona), проводили по методике, описанной выше на примере силоксана, с тем лишь различием, что на первом этапе спиртовой раствор ПФС нейтрализовали 25%-ным раствором аммиака для достижения величины рН раствора полиэлектролита 6.0.

Концентрация фермента в фермент-полиэлектролитном комплексе составляла 1 мг/мл, содержание воды в мембране - 10 %, ПФС 0.1 – 1.0 об.%.

6.3.9. Иммобилизация лактатоксидазы в смешанную мембрану силоксан – перфторсульфонируемый полимер

Для иммобилизации лактатоксидазы была опробована схема иммобилизации фермента в мембрану силоксан и ПФС из органического растворителя, которая описана выше.

Концентрация фермента в фермент-полиэлектролитном комплексе составляла 1 мг/мл, содержание воды в мембране - 10 %, γ -аминопропилтриэтоксисилана 0.01 – 5.00 об.%, ПФС 0.10 – 8.50 об.%.

6.3.10. Проточно-инжекционное определение лактата

Перед началом измерений через ячейку, содержащую электрод, модифицированный берлинской лазурью с иммобилизованной лактатоксидазой, пропускали буферный раствор до полного установления базового тока.

Для построения градуировочного графика электрода определяли лактат натрия в проточно-инжекционном режиме. Для этого проводили инъецирование 50 мкл модельного раствора лактата ($1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ М) в буферном растворе (рН

6.0). Среднюю величину отклика электрода на лактат вычисляли по результатам 3 единичных измерений. О величине отклика судили по величине тока пика, прописываемого на мониторе компьютера сразу после инжектирования, при подсчетах также учитывали величину базового тока. Время единичного измерения отклика электрода составляло не более 2 мин. По значениям средних величин откликов строили градуировочный график.

В зависимости от состава иммобилизующей смеси для фермента, модельные концентрации лактата составляли: $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М, либо $5 \cdot 10^{-5} - 1$ М.

6.3.11. Определение лактата в batch-режиме

В ячейку, ёмкостью 250 мкл, заполненную буферным раствором (рН 6.0), помещали планарный электрод, модифицированный БЛ с иммобилизованной ЛОД. Измерения проводили при постоянном перемешивании. В течение 5 - 7 мин регистрировали значение базового тока до выхода его на постоянный уровень. Далее в систему инжектировали лактат, чтобы концентрация в ячейке составляла $1 \cdot 10^{-6}$ М, наблюдали ступеньку. Затем, после выхода на стационарный уровень, вводили лактат в таком количестве, чтобы концентрация достигала $5 \cdot 10^{-6}$ М и так далее до конечной концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. О величине отклика судили по значению тока на вводимую концентрацию лактата. Эксперимент воспроизводили трехкратно, на основании чего строили градуировочный график.

В зависимости от состава иммобилизующей смеси для фермента, модельные концентрации лактата составляли: $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М, либо $5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$ М.

6.3.12. Определение пероксида водорода в batch-режиме с помощью микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью

В стакан, ёмкостью 5 мл, заполненный буферным раствором, помещали гибкий планарный микроэлектрод, модифицированный БЛ. В качестве вспомогательного электрода использовалась платиновая проволока, в качестве электрода сравнения использовался истинный хлоридсеребряный электрод, находящийся в 1 М КСl. Измерения проводили при постоянном перемешивании. В течение 5 - 7 мин фиксировали значение базового тока до выхода его на постоянный уровень. Далее в стакан инжектировали пероксид водорода, чтобы

концентрация в ячейке составляла $1 \cdot 10^{-5}$ М, наблюдали ступеньку. Затем, после выхода на стационарный уровень, вводили H_2O_2 в таком количестве, чтобы концентрация достигала $5 \cdot 10^{-5}$ М и так далее до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М. О величине отклика судили по высоте тока ступеньки на вводимую концентрацию пероксида водорода. Эксперимент воспроизводили трехкратно, на основании чего строили градуировочный график.

6.3.13. Изучение стабильности сенсоров и биосенсоров

Операционную стабильность сенсора в batch-режиме определяли как изменение амперометрического отклика в ячейке или стакане на нахождение электрода в неизменной концентрации аналита при постоянном перемешивании.

Стабильность = $i_n/i_1 \cdot 100\%$, где i_n – величина отклика на n-ое измерение, i_1 – величина начального отклика.

Стабильность сенсора при хранении определяли в ходе его тестирования по прошествии определенного времени хранения в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$. Тестировали биосенсор в модельных растворах лактата в периодическом режиме, о стабильности сенсора судили по величине чувствительности.

6.3.14. Создание проточной тонкослойной ячейки

В качестве модельной системы при создании неинвазивного монитора, была сконструирована тонкослойная ячейка на поверхности планарного электрода. Для этого был изготовлен параллелепипед из органического стекла, содержащий отверстие для штутсера, переходящее в капилляр, чертеж образца приведен на рис. 20. Для создания капилляра на поверхности электрода и, тем самым, конструирования тонкослойной ячейки на элемент из органического стекла наносили слой клея, толщиной 100 мкм, оставляя незаклеенную поверхность по трафарету шириной 1 - 1.5 мм. Далее приклеивали электрод к детали таким образом, чтобы незаклеенная поверхность содержала часть вспомогательного электрода, рабочего и электрода сравнения, оставшуюся липкую часть ячейки герметично заклеивали пластиком (рис. 21). Края ячейки обрабатывали герметиком и оставляли сушиться на воздухе в течение 20 мин. Таким образом, ячейка

представляла собой капилляр, одной из стенок которого является планарный электрод.

Тонкослойную ячейку подключали с одной стороны к перистальтическому насосу, а с другой к потенциостату с компьютером и проводили измерения модельных растворов лактата и потовых проб в фосфатном буферном растворе.

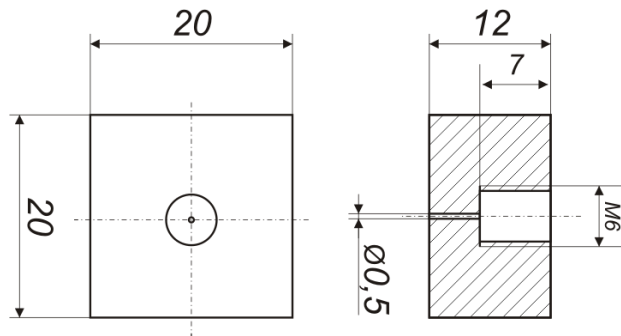


Рис. 20. Чертеж детали из органического стекла, используемой при создании проточной тонкослойной ячейки.



Рис. 21. Создание капилляра на поверхности планарного электрода.

6.3.15. Разработка конструкции неинвазивного монитора для определения лактата в поте в процессе реального времени

Для проведения измерений лактата в поте в процессе реального времени, указанная выше тонкослойная ячейка была модифицирована в конструкцию неинвазивного монитора, как показано на рис. 22. Монитор крепился непосредственно на поверхность кожи, образовавшийся пот всасывался в капилляр через отверстие 2, заполнял его, и сигнал тока от биосенсора регистрировался на экране компьютера.

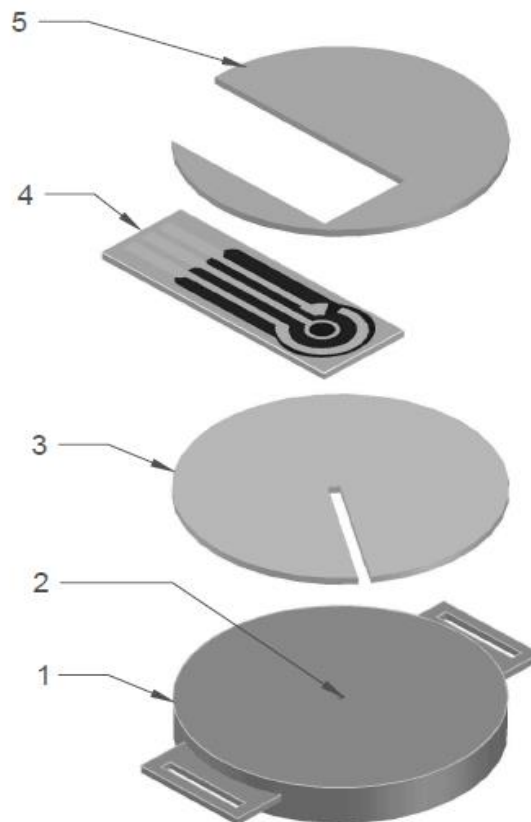


Рис. 22. Схема неинвазивного монитора. 1 – основа, 2 – отверстие, 3 – двухсторонний липкий слой, 4 – биосенсор для определения лактата, 5 – покрытие из ПЭТФ.

6.3.16. Проведение электрофореза для увеличения потоотделения

С целью увеличения потоотделения непосредственно перед экспериментом проводился электрофорез с пилокарпином, стимулирующий выработку пота. По следующей методике:

- 1) Взятие потовой пробы может быть осуществлено из любого участка тела человека.
- 2) Для проведения исследований по установлению корреляций при нагрузочных тестах для взятия пробы используют части тела, непосредственно участвующие в нагрузке.
- 3) Доброволец должен сесть и расслабиться.
- 4) Участок для взятия пота протирают спиртом.
- 5) Первый электрод (анод) из углеволокна, обмотанный белой тканью, промокают 1% раствором пилокарпина. Ткань должна быть пропитана полностью. Подключают электрод к проводу (в карман белой ткани, которой обмотано углеволокно, кладут кольцо на конце провода так, чтобы графитовая ткань с ним соприкасалась).
- 6) Второй электрод (катод) из углеволокна, обмотанный белой тканью, промокают 0.1 М раствором HCl и KCl. Ткань должна быть пропитана полностью. Подключают электрод к проводу.
- 7) Для проведения активации кожи для взятия потовой пробы до физической нагрузки на участок кладут анод контактом вверх (т.е. когда с кожей соприкасается только белая ткань) и фиксируют на конечности эластичным жгутом.
- 8) На расстоянии приблизительно 50 мм снизу от анода кладут катод контактом вверх и также фиксируют на конечности при помощи эластичного жгута.
- 9) Прибор «Поток-1» подключают к сети, устанавливают минимальный предел плотности тока (5 мкА), а ручку увеличения тока на минимум нагрузки (т.е. до упора против часовой стрелки). В выключенном состоянии к прибору подключают провода от электродов. Провод от анода к гнезду «+», от катода – к «-».
- 10) Включают прибор «Поток-1». Просят добровольца вращать ручку увеличения тока по часовой стрелке до того, как человек почувствует неприятные ощущения покалывания на коже под катодом. После достижения ощущений засесть 15 мин.

- 11) По истечению 15 мин электрофореза прибор выключают. Жгут, фиксирующий анод ослабляют и вынимают анод. На место него ставят коллектор пота воронкой к коже или тонкослойную ячейку всасывающую пот с поверхности кожи и фиксируют жгутом. Так же ослабляют и вынимают катод.
- 12) Для проведения активации участка кожи для снятия потовой пробы после физической нагрузки повторяют п. 4 - 11.
- 13) По истечении 30 мин жгуты ослабляют, вынимают коллекторы пота и при помощи дозатора вытягивают собранный пот через входное отверстие воронки, либо прекращают измерения неинвазивного монитора ввиду уменьшения объема пота.
- 14) После проведения процедур, использованные коллекторы пота и тонкослойную ячейку промывают избытком воды с помощью шприца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 7. Высокочувствительный биосенсор для определения лактата на основе лактатоксидазы и мембран с использованием силоксана

7.1. Получение электродов, модифицированных берлинской лазурью

На сегодняшний день наиболее эффективными датчиками на пероксид водорода считаются электроды, модифицированные берлинской лазурью, которая позволяет избирательно определять пероксид водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода. В настоящее время электроды на основе берлинской лазури широко используются при конструировании сенсоров на пероксид водорода и биосенсоров, содержащих иммобилизованные оксидазы в качестве биочувствительного элемента, как в нашей стране, так и за рубежом (например, в США, Китае, Италии, Швеции, Ирландии).

Сенсор на основе берлинской лазури имеет следующие аналитические характеристики: высокая чувствительность ($1 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$), низкий предел обнаружения H_2O_2 (менее 0.01 мкмоль/л), малые времена отклика (менее 30 с на одно измерение в проточно-инжекционном анализе), широкий линейный диапазон измеряемых концентраций пероксида водорода (0.1 мкмоль/л - 0.1 моль/л H_2O_2), нечувствительность к присутствию природных восстановителей в анализируемых образцах из-за низкого потенциала измерения (0.00 В) и высокая операционная стабильность (более 1000 измерений) [104]. Высокая операционная стабильность электродов подтверждает тот факт, что неорганический катализатор не смывается с поверхности электрода во время работы и делает возможным их использование в качестве имплантируемых сенсоров для клинического анализа.

Для создания сенсоров на пероксид водорода использовали планарные электроды, изготавливаемые методом трафаретной печати, они просты и удобны в использовании, на единой подложке представлены рабочий, вспомогательный и электрод сравнения (рис. 23). Трафаретная печать (screen-printing) – это метод печати графических изображений и текста на различных поверхностях при помощи

специальной формы (трафарета). Краска наносится на трафарет, затем проникает сквозь него посредством механического воздействия, ложась на поверхность.

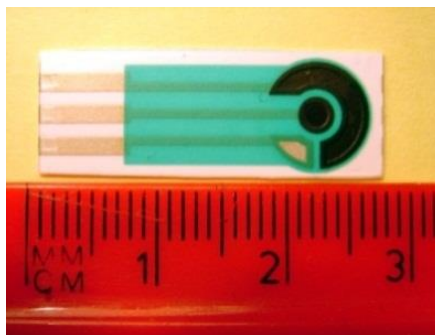


Рис. 23. Планарный электрод, изготовленный методом трафаретной печати.

Трудоемкость стадий нанесения пленок берлинской лазури на планарные электроды электрохимическими методами делает предпочтительным использование химических методов, единственно перспективных для массового производства сенсоров в связи с простотой, дешевизной и воспроизводимостью. Показано, что метод межфазного синтеза, единственный среди методов химической модификации, позволяет получить электрокаталитические покрытия, лишь немногим уступающие по аналитическим характеристикам синтезированным электрохимически.

Модификация поверхности рабочего электрода трехэлектродной планарной структуры была осуществлена методом межфазного синтеза берлинской лазури путем восстановления комплекса $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$. Аналогично пограничной полимеризации [199], за счет концентрирования реагентов на границе раздела фаз становится возможным осуществлять синтез преимущественно на подложке. Метод пограничной полимеризации не требует ни проводимости подложки, ни наложения внешнего потенциала.

Синтез проводился из смеси солей, содержащей Fe^{3+} и $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ионы. Образующийся в этом случае комплекс $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ является сильным окислителем, поэтому присутствие любых веществ, способных окисляться при таких потенциалах, приведет к осаждению берлинской лазури. Для осуществления протекания реакции в объеме раствора в качестве внешнего восстановителя комплекса $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ использовали пероксид водорода.

Для оценки эффективности осаждения проводили активацию электрода методом потенциодинамической обработки модифицированного БЛ электрода в циклическом режиме в фоновом электролите в интервале потенциалов от -0.05 до 0.35 В. Циклическая вольтамперограмма (ЦВА) представлена на рис. 24, высокие пики окислительно-восстановительного перехода берлинской лазури в берлинский белый и их близкое расположение по оси потенциалов свидетельствуют о регулярной структуре неорганического поликристалла [94], которая обеспечивает стабильность, селективность [200], а также низкие шумы получаемого датчика.

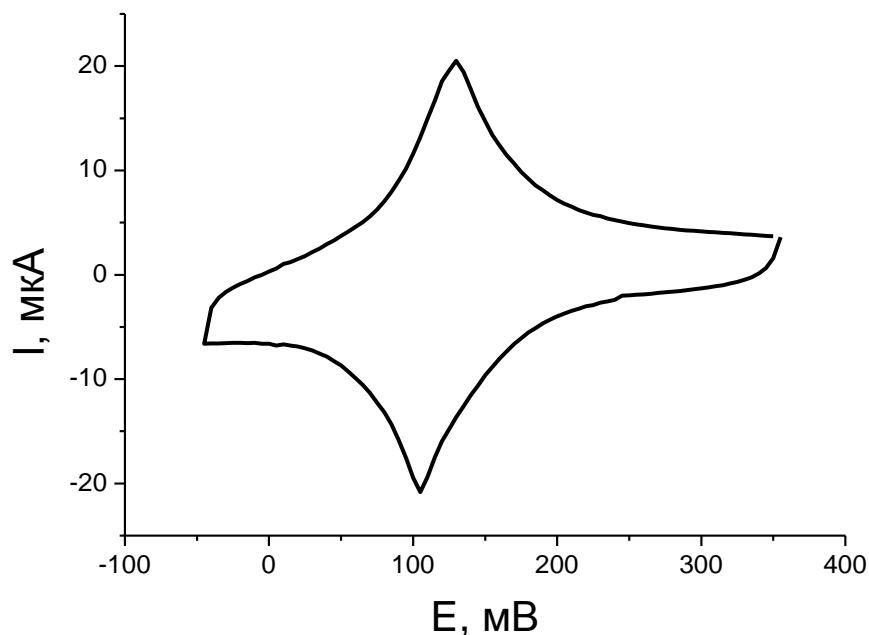


Рис. 24. Циклическая вольтамперограмма активации берлинской лазури на планарном электроде в растворе 0.1 М КСl, 0.1 М НСl, скорость развертки 40 мВ/с.

На циклической вольтамперограмме видны два симметричных пика окисления-восстановления БЛ, при этом разница между этими пиками, равная 0.05 В, меньше, чем аналогичная величина для БЛ, синтезированной лучшим из известных химических методов (~ 0.10 В [201]), что свидетельствует о высокой регулярности структуры полученной пленки.

На электроде, модифицированном БЛ, определяли пероксид водорода в системе ПИА, для этого инжестировали модельные растворы H_2O_2 в диапазоне концентраций: $1 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-3}$ М в буферном растворе. На основании полученных данных строили градуировочный график (рис. 25).

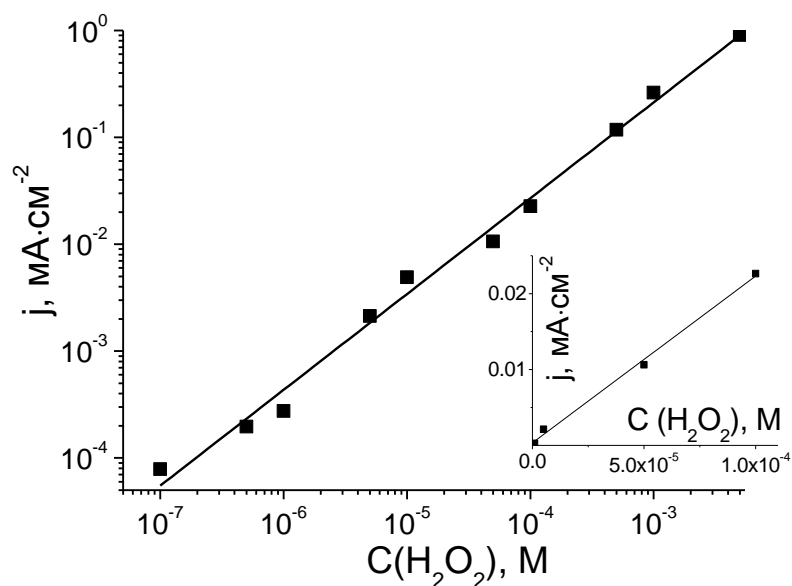


Рис. 25. Градуировочный график для определения пероксида водорода в системе проточно-инжекционного анализа с помощью сенсора на основе берлинской лазури. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М КН₂РО₄ (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

Из градуировочной зависимости определяли аналитические характеристики сенсора, которые представлены в табл. 3.

Таблица 3. Аналитические характеристики сенсора на пероксид водорода в системе проточно-инжекционного анализа ($n = 10$, $P = 0.95$)

Сенсор для определения пероксида водорода	Коэффициент чувствительности, А·М ⁻¹ ·СМ ⁻²	Линейный диапазон определяемых концентраций Н ₂ О ₂ , М
Электроды, модифицированные БЛ	0.6 ± 0.1	$1 \cdot 10^{-7} \div 1 \cdot 10^{-3}$

Таким образом, подготовлены электроды для определения пероксида водорода, характеризующиеся высокой чувствительностью и широким диапазоном определяемых концентраций. Берлинская лазурь является высокоэффективным катализатором восстановления пероксида водорода и может выступать в качестве трансдьюсера при создании лактатных биосенсоров.

7.2. Использование силоксана для иммобилизации фермента на поверхность планарных электродов, модифицированных берлинской лазурью

Иммобилизация фермента на поверхности электрода является важнейшей стадией создания биосенсора. Наиболее широко используется в литературе принцип включения фермента в полимерные мембраны. При этом предпочтительно использовать раствор уже готового полимера, избегая проведения реакции полимеризации в ферментсодержащей рабочей смеси. Упрощение процесса получения биосенсоров позволяет добиться высокой воспроизводимости, что является необходимым условием для их массового производства.

Биосенсоры используют для работы в водной среде, поэтому для иммобилизации фермента необходимо применять водонерастворимые мембраны. Полимеры, образующие такие мембраны, растворяются только в органических растворителях. Таким образом, при смешивании фермента и полимера нельзя избежать контакта белка с органическим растворителем. Детальное исследование поведения ферментов в средах с низким содержанием воды началось около 15 лет назад и получило название «неводная энзимология». Было показано, большинство ферментов довольно стабильны в смесях с содержанием воды 10 - 15% [153].

В лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ был разработан способ иммобилизации ферментов в пленки нерастворимого полимера на поверхности трансдьюсера, заключающийся в экспонировании фермента в концентрированный органический растворитель, смешивании его с истинным раствором полимера, нанесении на поверхность трансдьюсера и высушивании [153]. Эта идеология успешно была применена при создании мембран из перфторсульфонируемого полимера, содержащих иммобилизованную глюкозооксидазу, при разработке глюкозного биосенсора [198].

В качестве растворителя при иммобилизации лактатоксидазы использовался изопропиловый спирт, ферментсодержащую водно-органическую смесь наносили на планарный электрод, модифицированный БЛ. При высыхании смеси происходило испарение органического растворителя, и на поверхности оставалась ферментсодержащая мембрана регулярной структуры, благодаря небольшому

содержанию воды. На протяжении некоторого промежутка времени фермент контактировал с органическим растворителем, что приводило к потере активности ЛОД. Ранее проводили исследование влияния органических сред с низким содержанием воды на активность фермента, изучая остаточную активность ЛОД после инкубации в водно-органической смеси. Зависимость остаточной активности лактатоксидазы от содержания воды в водно-органической смеси представляет собой сигмовидную кривую с высоким плато активности в районе 5 - 10% и постепенным снижением активности от 10 до 20%, локальный экстремум наблюдается в области 15%-ного содержания воды, что совпадает с точкой образования азеотропа изопропанол-вода [89].

В настоящей работе было выбрано содержание воды в мембране 10% и изопропанола – 90%, так как при этом соотношении водно-органической фазы сохраняется довольно высокая активность фермента и можно включить в мембрану достаточное количество ЛОД, избегая больших погрешностей при отборе пипеткой нужного объёма водного раствора фермента.

Ранее в лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ проводили иммобилизацию ЛОД в мембраны γ -аминопропилтриэтоксисилана, фенилсилоксана и винилсилоксана, содержанием в смеси от 0.1 до 0.5 об.% [89]. Из рассмотренных мембранообразующих соединений содержание 0.3% γ -аминопропилтриэтоксисилана было выявлено в качестве лучшего, т.к. биосенсор на основе данной смеси обладал наивысшей чувствительностью ($0.18 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$), а также широким линейным диапазоном определяемых концентраций ($1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ лактата) и низким пределом обнаружения.

Поскольку ЛОД представляет собой очень лабильный фермент, то было необходимо оптимизировать условия иммобилизации с целью увеличения стабильности биосенсоров на её основе. В настоящей работе было решено исследовать более высокие содержания γ -аминопропилтриэтоксисилана в иммобилизующей смеси для фермента, что могло привести к повышению стабильности и активности биосенсоров на основе данных мембран.

С этой целью было предложено использовать сканирующую электрохимическую микроскопию, а именно, сканирование матрицы различных ферментсодержащих мембран на единой подложке и выявление максимумов локальной ферментативной активности. За счет того, что сканирование осуществляется на единой подложке в совершенно идентичных условиях, то наглядно наблюдается картина максимумов ферментативной активности. Предполагалось, что биосенсор на основе мембраны, демонстрирующей наивысшую ферментативную активность в СЭХМ, впоследствии будет обладать наилучшими аналитическими характеристиками.

Стоит отметить, что на подготовку одного биосенсора для определения лактата уходит в среднем 3 часа (1 час на осаждение БЛ на планарный электрод, 1 час на нанесение ферментсодержащей мембраны и 1 час на проведение градуировки), а для подготовки эксперимента с использованием СЭХМ в среднем 1.5 часа (0.5 часа на осаждение БЛ на микроэлектрод, 1 час на нанесение ферментсодержащих мембран на подложку). Однако при проведении экспериментов с СЭХМ на подложке можно исследовать от 1 до 9 ферментсодержащих мембран одновременно. Таким образом, время подготовки единичного эксперимента уменьшается примерно в 20 раз.

7.3. Использование сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран различного состава

Сканирующая электрохимическая микроскопия, являясь подклассом сканирующей зондовой микроскопии, представляет собой современный метод отображения местной электрохимической активности в микроскопическом разрешении.

В настоящей работе СЭХМ была впервые адаптирована для определения профиля концентрации пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции. С помощью микроскопа сканировали участок подложки с ферментсодержащими мембранами и измеряли ток, продуцируемый на микроэлектроде. На основании регистрируемого тока получали изображение, по которому судили об изменении ферментативной активности ЛОД при

иммобилизации в различные полимерные мембраны, таким образом, целью было выявить наилучший состав смеси для иммобилизации фермента для повышения стабильности и чувствительности биосенсоров для определения лактата на основе планарных электродов, модифицированных БЛ.

Для этого гибкие планарные микроэлектроды, изготовленные методом лазерной абляции, модифицировали БЛ и использовали в качестве зондов для СЭХМ. На подложке иммобилизовали ЛОД в различные мембраны и, с помощью зонда, регистрировали локальный ток восстановления пероксида водорода в растворе лактата в буферном растворе, как схематически показано на рис. 26. Для иммобилизации ЛОД использовали силоксан, с содержанием в смеси от 0.1 до 3.0 об.%.

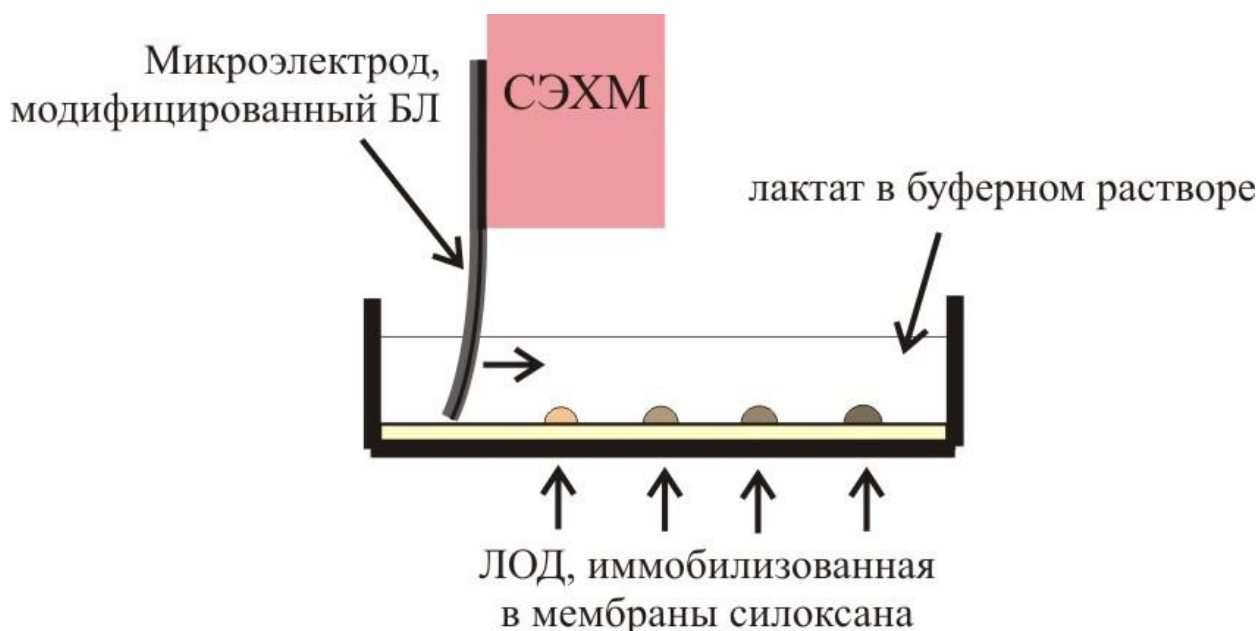


Рис. 26. Схема измерений, проводимых на сканирующем электрохимическом микроскопе.

7.3.1. Изготовление гибких планарных микроэлектродов и модификация их берлинской лазурью

Гибкие планарные микроэлектроды в качестве зондов для СЭХМ изготавливали с использованием метода лазерной абляции. Изображение поперечного сечения микроэлектрода, сделанное с помощью сканирующего лазерного микроскопа (СЛМ) показано на рис. 27. Из данного изображения была

рассчитана площадь рабочей области электрода, составляющая в данном случае 322 мкм^2 .

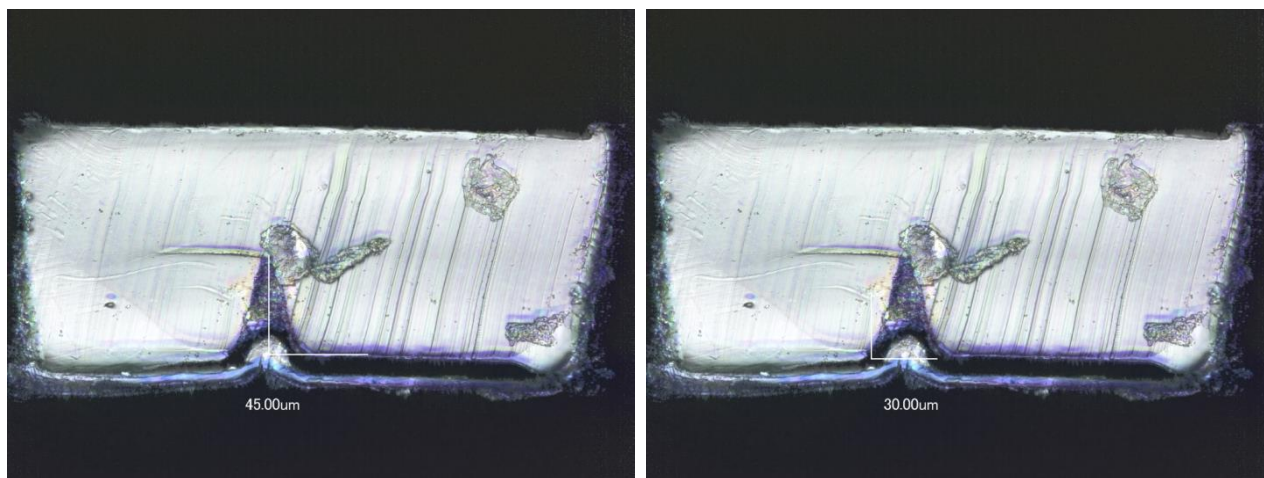


Рис. 27. Изображение поперечного сечения гибкого планарного микроэлектрода, сделанное при помощи сканирующего лазерного микроскопа.

На рабочей поверхности гибких планарных микроэлектродов осаждали электрохимически кристаллы берлинской лазури. Ростовой раствор содержал 4 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 4 мМ FeCl_3 в фоновом электролите 0.1 М KCl , 0.1 М HCl , данная методика была разработана ранее и успешно используется для модификации БЛ планарных электродов и микроэлектродов [195-197].

Микроэлектроды, модифицированные БЛ, подвергали потенциодинамической обработке в диапазоне потенциалов от -0.05 до 0.35 В в фоновом электролите 0.1 М KCl , 0.1 М HCl . Покрытие берлинской лазури считалось насыщенным катионами калия, если последние ЦВА обработки имели одинаковые площади, т.е. совпадали или незначительно отличались при наложении друг на друга.

Циклическая вольтамперограмма активации БЛ на микроэлектроде представлена на рис. 28, на вставке приведена вольтамперограмма электроосаждения БЛ. Стрелками показано увеличение значений токов, соответствующее увеличению количества БЛ, осаждаемой от цикла к циклу.

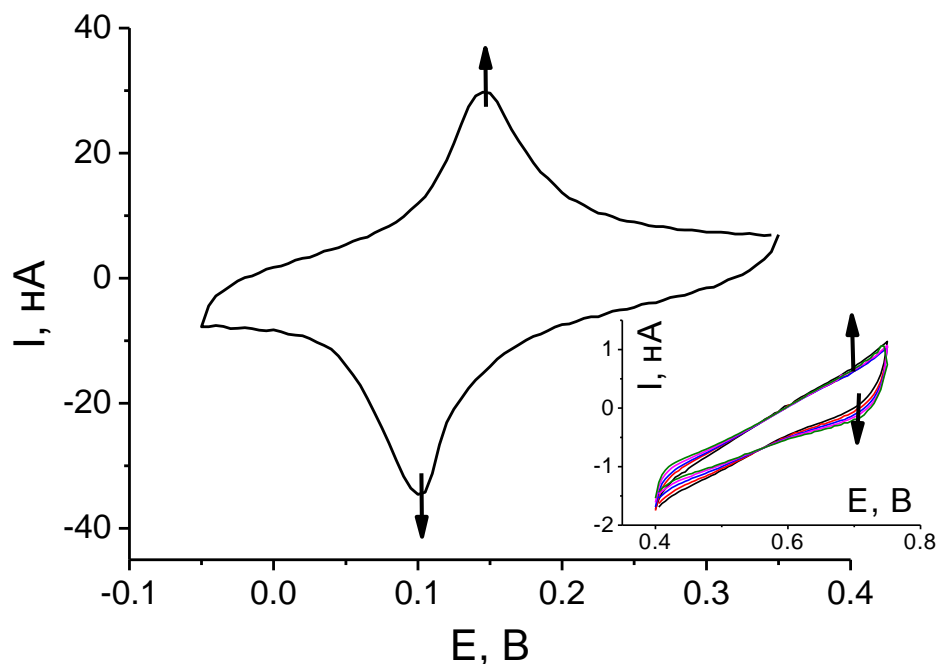


Рис. 28. Циклическая вольтамперограмма активации берлинской лазури на микроэлектроде в растворе 0.1 М КСl и 0.1 М НСl, скорость развертки 40 мВ/с. На вставке: электроосаждение БЛ, 5 - 7 циклов в растворе 4 мМ FeCl₃, 4 мМ K₃[Fe(CN)₆] в фоновом электролите, скорость развертки 20 мВ/с.

7.3.2. Аналитические характеристики микросенсоров для определения пероксида водорода в качестве зондов для сканирующей электрохимической микроскопии

Для определения качества полученных зондов для СЭХМ исследовали аналитические характеристики микроэлектродов, модифицированных БЛ. С этой целью определяли пероксид водорода в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-2}$ М в batch-режиме в буферном растворе при постоянном перемешивании. Модельные растворы H₂O₂ тестировали с помощью микросенсора трехкратно, на основании чего строили градуировочный график (рис. 29). Коэффициент чувствительности определяли как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости токового отклика сенсора на рассчитанную концентрацию пероксида водорода в растворе. Площадь рабочего электрода составляла 322 мкм².

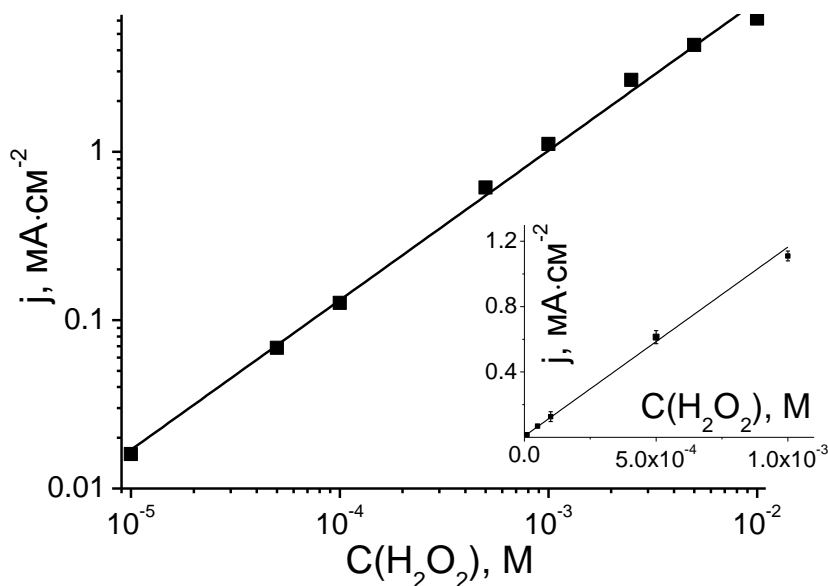


Рис. 29. Градуировочный график для определения пероксида водорода с помощью микросенсора, модифицированного берлинской лазурью. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

Коэффициент чувствительности созданных сенсоров на пероксид водорода составляет $1.6 \pm 0.5 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 4$, $P = 0.95$), а линейный диапазон определяемых концентраций H_2O_2 три порядка от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М, предел обнаружения $9 \cdot 10^{-6}$ М.

Для оценки операционной стабильности сенсора фиксировали время абсолютной неизменности токового отклика. Первые 2 часа работы сенсор стабильно работает и не теряет сигнала (рис. 30), а также спустя 8 часов непрерывной работы обеспечивается по крайней мере 70% от начального значения, а после 17 часов работы - около 57% от первоначального сигнала тока. Стоит отметить, что стабильность была измерена при высокой концентрации пероксида водорода (1 мМ H_2O_2), что представляет собой довольно жесткие условия для сенсора, так как продукт восстановления H_2O_2 – гидроксил-ионы – растворяют берлинскую лазурь [200], и чем концентрированнее раствор пероксида водорода, тем быстрее смывается покрытие пленок БЛ. Концентрация пероксида водорода в реальном эксперименте на СЭХМ на несколько порядков меньше, а, следовательно, стабильность будет гораздо выше.

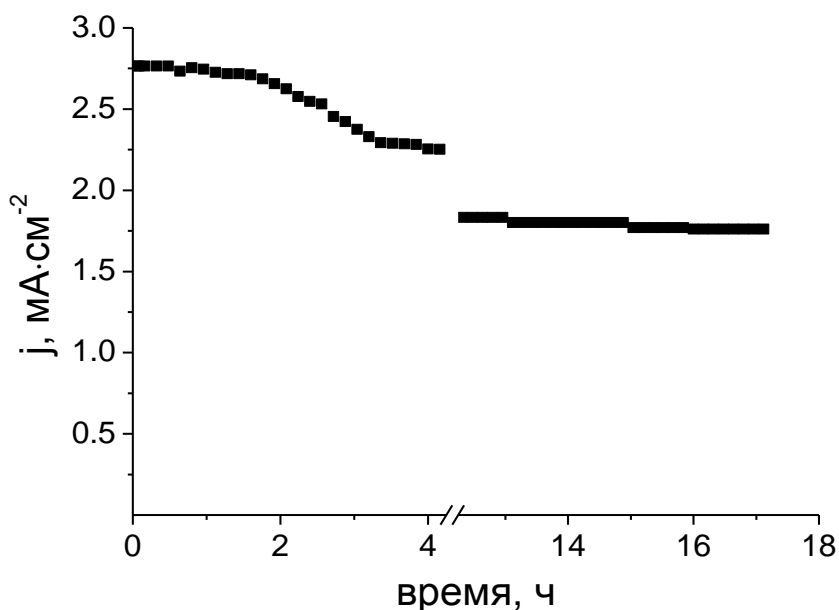


Рис. 30. Операционная стабильность микро сенсора на пероксид водорода в batch-режиме при постоянном перемешивании в растворе 1 мМ H_2O_2 . Буферный раствор 0.1 М KCl , 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

Таким образом, впервые был разработан сенсор на пероксид водорода для использования его в качестве зонда для сканирующей электрохимической микроскопии. Микроэлектрод, модифицированный БЛ, характеризуется высокой чувствительностью, широким линейным диапазоном определяемых концентраций, вплоть до трех порядков, а также высокой операционной стабильностью, которой достаточно для проведения измерений СЭХМ (длительность измерений составляет до 10 часов). Можно сделать вывод, что разработанные сенсоры подходят для длительной непрерывной работы в качестве зондов для СЭХМ для определения профиля концентрации пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции.

7.3.3. Получение изображения ферментсодержащей мембраны с использованием сканирующего электрохимического микроскопа

Иммобилизация лактатоксидазы в мембрану γ -аминопропилтриэтоксисилана происходила из сред с высоким содержанием органического растворителя [89, 198]. Коммерческий препарат силоксан разбавляли абсолютным изопропиловым спиртом до необходимой концентрации, фермент ЛОД разбавляли

дистиллированной водой до концентрации 10 мг/мл. Далее к спиртовому раствору силоксана добавляли водный раствор фермента, активно перемешивали, после чего наносили 2 мкл смеси на подложку. Стоит иметь ввиду, что спустя несколько минут после попадания в водный раствор силоксан полимеризуется, густеет и в пробирке Эппендорфа образуется взвесь с белым осадком, которую уже невозможно нанести на подложку, поэтому нанесение смеси следует проводить немедленно после смешения водного и спиртового растворов.

В качестве подложки для иммобилизации фермента при первоначальном рассмотрении была использована пленка полиэтилентерефталата (ПЭТФ), используемая при печати планарных электродов. Однако при проведении экспериментов СЭХМ сигнала не наблюдалось, для объяснения данного явления мембрана была изучена с помощью сканирующего лазерного микроскопа (СЛМ). При рассмотрении участка подложки с ферментсодержащей пробой после проведенного эксперимента было обнаружено, что от мембраны остались только обломки по краям капли. Было видно, что ферментсодержащая мембрана была сломана (рис. 31). Это могло происходить при фиксировании образца, либо при сканировании подложки микроэлектродом.

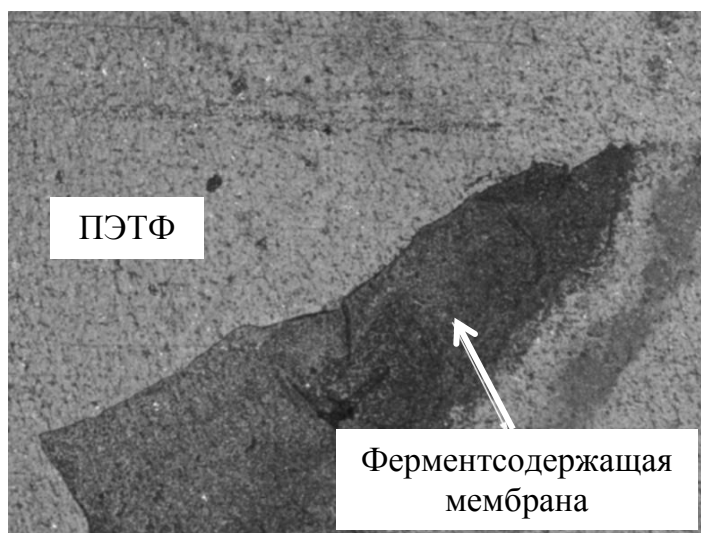


Рис. 31. Изображение сломанной ферментсодержащей силоксановой мембраны на подложке из полиэтилентерефталата.

Таким образом, было выявлено, что мембрана на поверхности ПЭТФ растрескивается и ломается, для решения этой проблемы в качестве подложки была использована пленка ПЭТФ с нанесенной на неё графитовой пастой. Данное

покрытие полностью воспроизводит поверхность планарных электродов и, тем самым, приближает условия эксперимента к реальным – при иммобилизации фермента на поверхность планарных структур для создания биосенсоров на лактат.

С помощью сканирующей электрохимической микроскопии регистрировали электрохимическую активность в микроскопическом разрешении, для этого эксперимент проводили в контактном режиме с подложкой. Приведение микроэлектрода в контакт с исследуемой поверхностью осуществлялось на основании кривой приближения зонда в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0). Данная концентрация была выбрана для достижения максимального контраста изображения.

В режиме обратной связи зонд изначально находился на некотором расстоянии от исследуемой поверхности, где через него протекал фоновый ток, обусловленный фоновым электролитом и лимитированный полусферической диффузией электроактивных частиц к рабочей поверхности микроэлектрода. Зонд позиционировался таким образом, чтобы при касании подложки он находился у края ферментсодержащей капли, а сканирование по оси X проходило по её центру. По мере приближения к поверхности диффузия всё больше затруднялась, из-за чего наблюдалось постепенное увеличение катодного тока в соответствии с рис. 32.

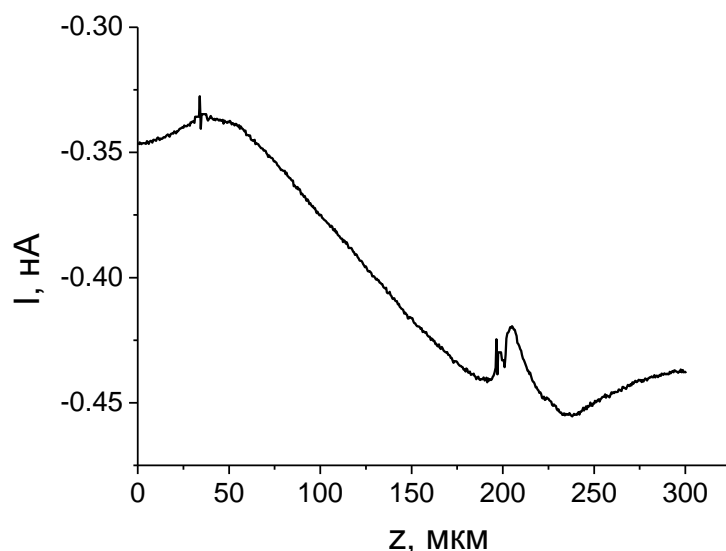


Рис. 32. Кривая приближения зонда в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (по оси абсцисс отложено расстояние, пройденное зондом, по оси ординат – ток); скорость 1 мкм/с, шаг 0.5 мкм, потенциал 0.00 В.

Ось Z , приведенная на рис. 32, является относительной величиной, демонстрирующей степень приближения к подложке, наглядно представлена на рис. 33. Как видно на рис. 32, от 50 до 200 мкм по оси Z наблюдается увеличение катодного тока, что демонстрирует процесс восстановления пероксида водорода на микроэлектроде, далее - точка перегиба, соответствующая расстоянию, на котором зонд коснулся поверхности. После этого гибкий планарный микроэлектрод начинает изгибаться, что обуславливает скачок и последующий выход на стационарный уровень.

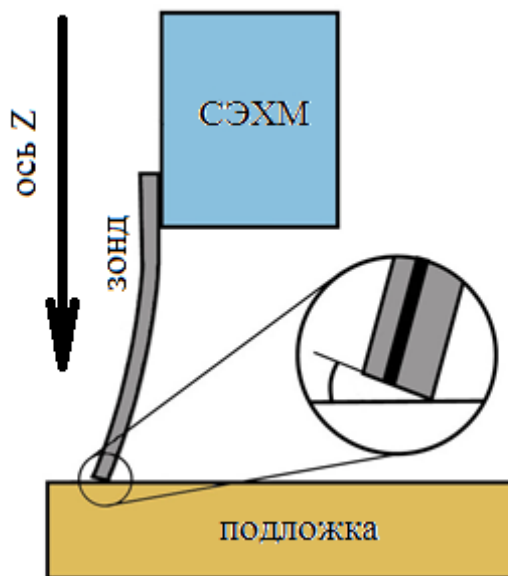


Рис. 33. Физический контакт зонда с исследуемой поверхностью.

После приведения зонда в контакт с подложкой, содержащей иммобилизованную ЛОД, микроэлектрод опускали ниже на величину $h_p = -100$ мкм, достигая изгиба зонда на некоторый угол для более уверенного контакта с исследуемой поверхностью. Далее проводили линейное сканирование пробы по оси X .

На рис. 34 видно, что по мере приближения к центру капли наблюдается возрастание катодного тока, что демонстрирует процесс восстановления на электроде пероксида водорода. Для подтверждения полученных данных эксперимент был воспроизведен в отсутствие фермента в мембране, в данном случае, как и ожидалось, не наблюдалось возрастания катодного тока при прохождении зондом вдоль капли.

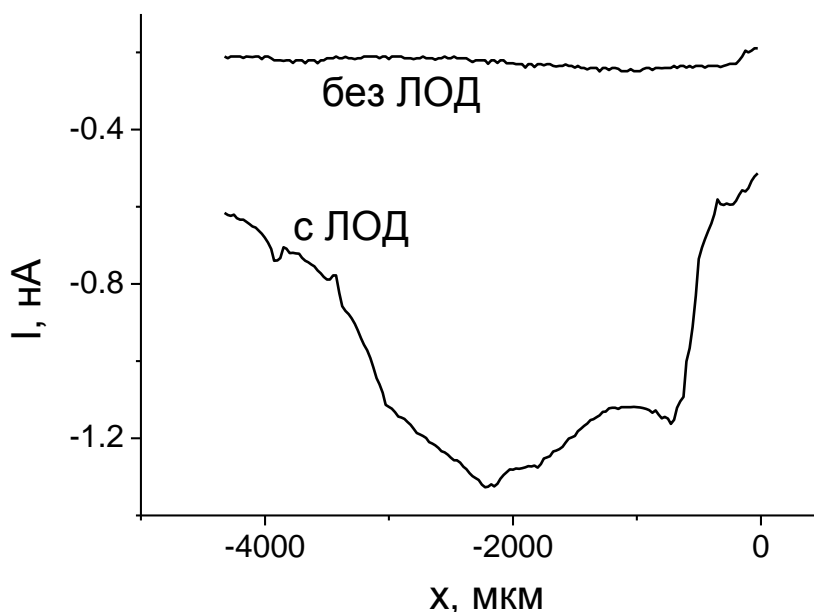


Рис. 34. Линейное сканирование ферментсодержащей силиконовой мембраны и аналогичной капли в отсутствие фермента в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В.

Кривая приближения и линейное сканирование пробы являются неотъемлемыми составляющими проведения экспериментов СЭХМ, именно с помощью них демонстрируется пригодность сенсора и подложки для получения изображения иммобилизованной ЛОД путем амперометрической детекции выделяющегося при ферментативном катализе пероксида водорода.

Подложка нанесенной ферментсодержащей мембраной находилась в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе для последующего сканирования электрохимической активности поверхности в режиме коллекции-генерации. Данная концентрация лактата была выбрана для усиления контраста на получаемом изображении между областями, где пероксид водорода генерировался ферментом, и областью, где H_2O_2 появлялся в результате диффузии. Режим коллекции-генерации заключается в том, что на модифицированном БЛ зонде поддерживается рабочий потенциал, необходимый, в данном случае, для восстановления получающегося продукта ферментативной реакции пероксида водорода, и регистрируется величина силы тока в каждой точке над поверхностью.

Для сканирования была выбрана область поверхности 4x4 мм (рис. 35). Установленный рабочий потенциал составлял 0.00 В, скорость линейного сканирования 25 мкм/с, шаг по оси X 25 мкм, расстояние между областями линейного сканирования установлено 50 мкм, что соответствует приблизительной ширине электрода.

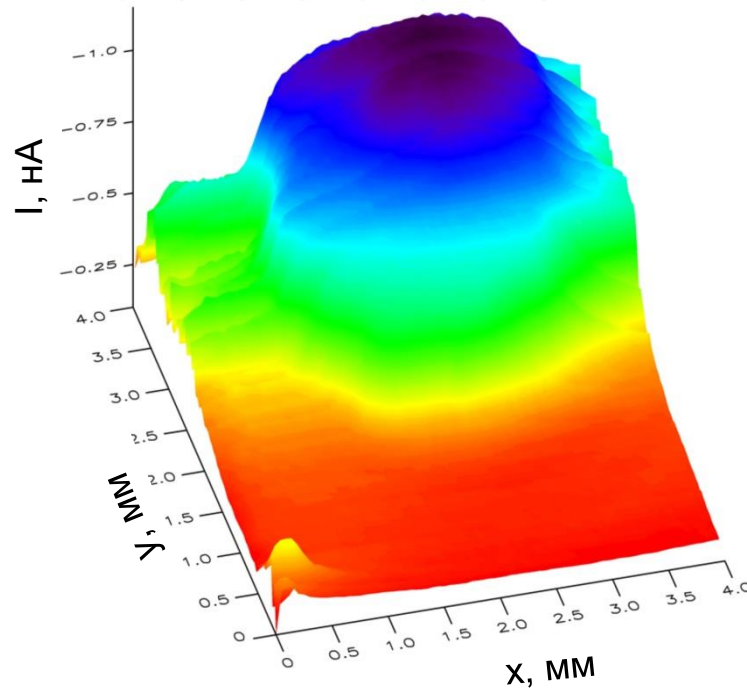


Рис. 35. Изображение участка подложки с ферментсодержащей силиконовой мембраной в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе. Скорость 25 мкм/с, шаг по X 25 мкм, шаг по Y 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В.

Синие участки на рис. 35 соответствуют высоким значениям катодных токов, демонстрируя, таким образом, участки подложки, где происходит генерация пероксида водорода в результате ферментативной реакции. Видно, что наивысший сигнал наблюдается в центре капли. Необходимо заметить, что, несмотря на проведение эксперимента по получению изображения в течение 10 часов, наблюдается заметный локальный контраст с точностью до десятков микрон между областями генерации и областями проникновения пероксида в результате диффузии, что говорит о высокой точности данного метода получения трехмерного электрохимического изображения.

7.3.4. Получение трехмерного изображения ферментсодержащих мембран с использованием сканирующего электрохимического микроскопа

В качестве мембранообразующего соединения для создания высокочувствительного лактатного биосенсора был рассмотрен γ -аминопропилсилоксан с содержанием в смеси для иммобилизации фермента от 0.1 до 3.0 об.%. С помощью СЭХМ одновременно сканировали несколько ферментсодержащих силоксановых мембран на единой подложке. Содержание силоксана в иммобилизующей смеси составляло: 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 и 3.0 об.%. Одно сканирование данной подложки с нанесенными мембранами позволяло судить об изменении ферментативной активности ЛОД при использовании различных содержаний силоксана для иммобилизации. В качестве примера приведены четыре мембраны с содержанием силоксана: 0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.8% в иммобилизующей смеси. Объем пробы каждого состава - 0.1 мкл, измерения проводились в растворе 50 мМ лактата, приготовленном с использованием буферного раствора. Данная концентрация лактата была выбрана для получения максимального контраста изображения.

Приведение зонда в контакт с поверхностью осуществлялось на основании кривой приближения в растворе 50 мМ лактата, приготовленном с использованием буферного раствора. По мере приближения к поверхности диффузия всё больше затрудняется, из-за чего наблюдается постепенное увеличение величины катодного тока в соответствии с рис. 36. В районе 700 мкм на кривой наблюдается точка перегиба, соответствующая расстоянию, на котором зонд коснулся поверхности, далее зонд начинает изгибаться, что обуславливает последующее уменьшение тока.

После приведения зонда в контакт с подложкой, содержащей ферментсодержащие мембраны, микроэлектрод опускали ниже на величину $h_p = -100$ мкм, достигая изгиба зонда на некоторый угол для более уверенного контакта с исследуемой подложкой.

Далее проводили линейное сканирование пробы по оси X. Видно, что по мере прохождения вдоль капель (в областях -8000, -7000, -4000 и -1500 мкм по оси X) наблюдается увеличение катодных токов, что демонстрирует протекание биохимической реакции (рис. 37).

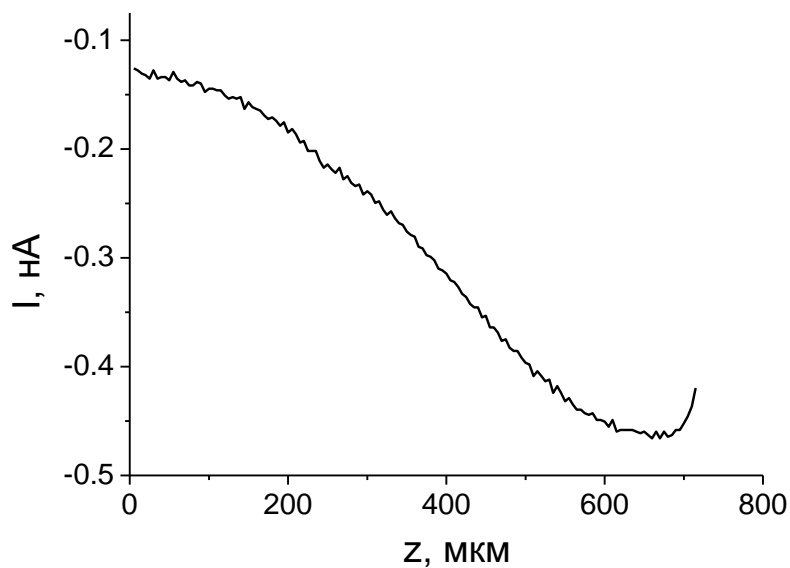


Рис. 36. Кривая приближения зонда в растворе 50 мМ лактата, приготовленном с использованием буферного раствора (по оси абсцисс отложено расстояние, пройденное зондом, по оси ординат – ток); скорость 1 мкм/с, шаг 0.5 мкм, потенциал 0.00 В.

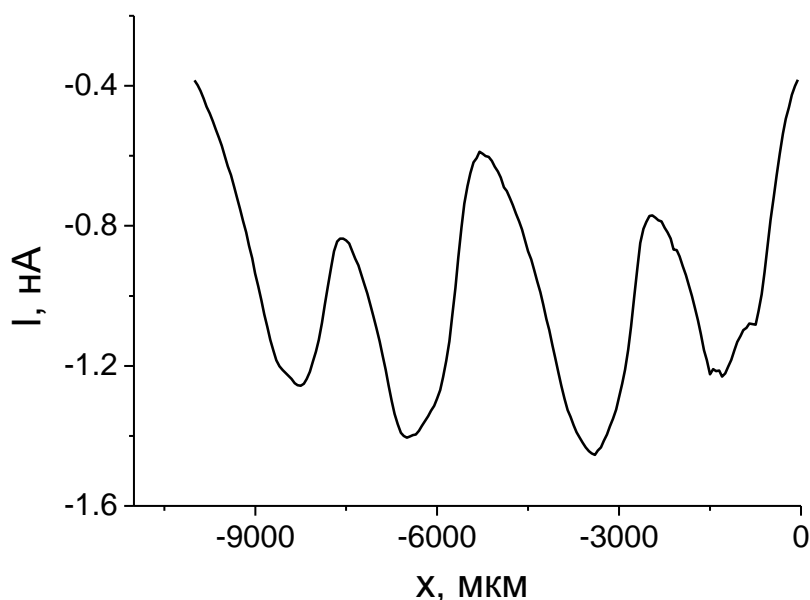


Рис. 37. Линейное сканирование четырех ферментсодержащих силоксановых мембран в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В. Содержание силоксана в смеси для иммобилизации фермента (слева направо): 0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.8%.

Для получения изображения СЭХМ была выбрана область размером 10.5x1.5 мм (рис. 38). Установленный рабочий потенциал для амперометрической детекции 0.00 В, скорость линейного сканирования 50 мкм/с, шаг по оси X 50 мкм, расстояние между областями линейного сканирования 50 мкм, что соответствует приблизительной ширине электрода.

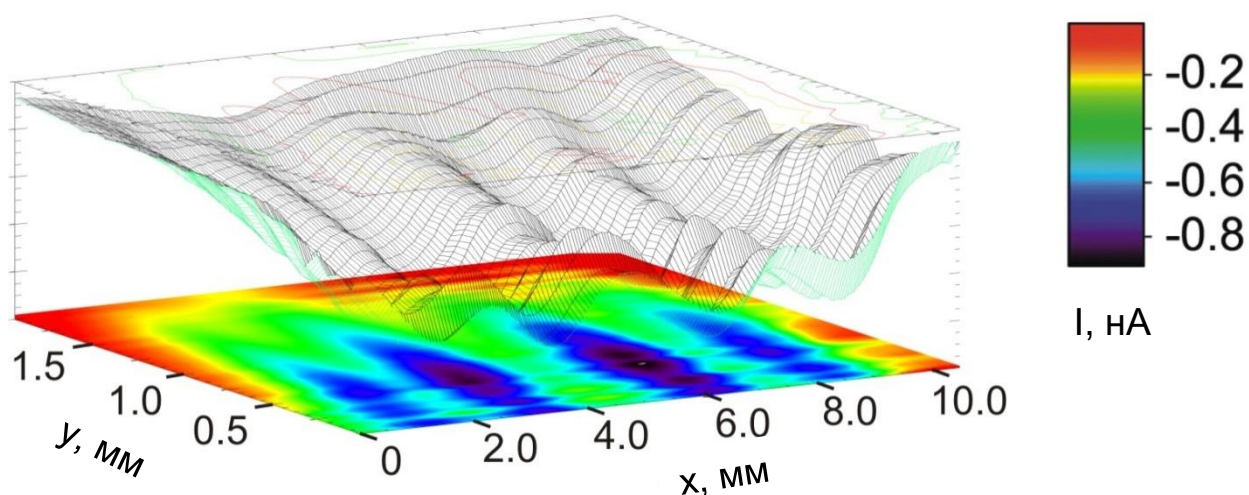


Рис. 38. Объёмное изображение участка поверхности с ферментсодержащими силиконовыми мембранами в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг по X 50 мкм, шаг по Y 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В. Содержание силиксана в смеси для иммобилизации фермента (слева направо): 0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.8%.

Тёмно-синие участки на рис. 38 соответствуют высоким значениям катодных токов, демонстрируя, таким образом, участки подложки, где происходит генерация пероксида водорода в результате ферментативной реакции, красные участки соответствуют нулевым значениям токов, зеленые – переходным; отчетливо видны области нанесения четырех мембран. Необходимо заметить, что, несмотря на проведение эксперимента по получению изображения в течение 10 ч, наблюдается локальный контраст с точностью до десятков микрон между областями генерации и областями проникновения пероксида водорода в результате диффузии, что говорит о высокой точности данного метода получения изображения. Мембрана с содержанием силиксана 0.3% использовалась для сравнения, так как биосенсор на её основе превосходил по аналитическим характеристикам существующие аналоги.

Однако, при использовании силоксана в широком диапазоне содержаний видно, что данная мембрана демонстрирует наименьший сигнал, а наивысшей ферментативной активностью обладает ЛОД в смеси, содержащей 1.5% силоксана. Сравнительно хороший результат достигается также при использовании 0.9% силоксана, чуть хуже с применением 2.8% силоксана.

Идентичный эксперимент был воспроизведен на квадратной подложке, линейное сканирование проб по двум рядам представлено на рис. 39. Также наблюдается увеличения катодных токов при прохождении зондом вдоль капель ЛОД. На рис. 39 (1) от -4000 до -2000 мкм по оси X виден сигнал от фермента в 0.3% силоксане, от -2000 до -500 мкм – с использованием 0.9% силоксана, сигналы от мембран плохо разделены и наблюдаются низкие значения токов, что можно объяснить тем, что сканирование проводилось не по центру капель. На рис. 39 (2) отчетливо наблюдаются сигналы от двух ферментсодержащих мембран.

Для получения СЭХМ-изображения подложки с ферментсодержащими мембранами была выбрана область размером 4x4 мм (рис. 40). Установленный рабочий потенциал для амперметрической детекции 0.00 В, скорость линейного сканирования 50 мкм/с, шаг по оси X 50 мкм, расстояние между областями линейного сканирования было установлено в 50 мкм, что соответствует приблизительно ширине электрода.

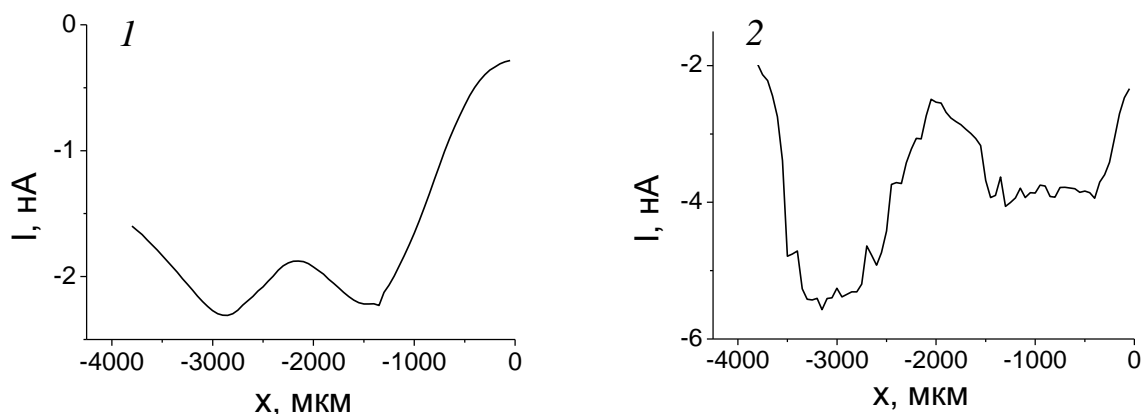


Рис. 39. Линейное сканирование четырех ферментсодержащих силоксановых мембран в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В. Содержание силоксана в смеси для иммобилизации фермента (слева направо): 1 - 0.3%, 0.9%, 2 - 1.5%, 2.8%.

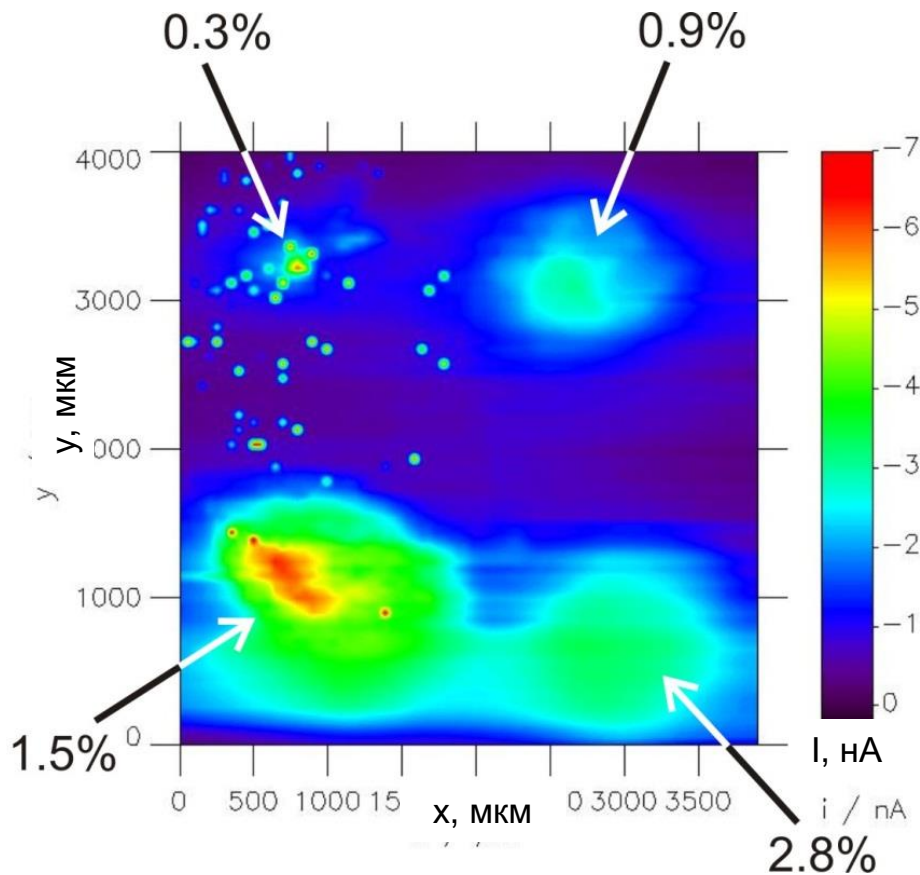


Рис. 40. Изображение участка подложки с ферментсодержащими силоксановыми мембранами в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг по X 50 мкм, шаг по Y 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В.

Красные участки на рис. 40 соответствуют высоким значениям катодных токов, синие – нулевым значениям, а зеленые – промежуточным; отчетливо наблюдаются области расположения четырех мембран. Видно, что лактатоксидаза в смеси из 1.5% силоксана обладает наивысшей ферментативной активностью, и образец с использованием 0.3% силоксана демонстрирует наименьший сигнал, по сравнению со всеми представленными, что подтверждает результаты, полученные в первом эксперименте (рис. 38). Но, можно заметить, что в данном образце фермент, иммобилизованный в смесь, содержащую 2.8% силоксана, обладает чувствительностью выше, чем 0.9%, что противоречит результатам, полученным по первому образцу (рис. 38). Можно предположить, что ферментативная активность ЛОД при иммобилизации в смеси, содержащие 0.9% и 2.8% силоксана схожа по величине.

Таким образом, сканирующая электрохимическая микроскопия позволила быстро и результативно оценить изменение ферментативной активности ЛОД при иммобилизации в смеси с различным содержанием силоксана. Предполагалось, что биосенсоры на основе мембран, обладающих наивысшей ферментативной активностью, будут обладать наилучшими аналитическими характеристиками. Для подтверждения полученных результатов было необходимо провести иммобилизацию фермента в смеси силоксана на поверхность планарных электродов, модифицированных БЛ, и протестировать полученные биосенсоры на лактат, что описано в следующей главе.

7.4. Лактатные биосенсоры на основе ферментсодержащих силоксановых мембран различной плотности

С помощью сканирующей электрохимической микроскопии была изучена ферментативная активность лактатоксидазы при иммобилизации в смеси силоксана в широком диапазоне содержаний. Максимальная активность фермента наблюдалась при использовании 1.5% силоксана для иммобилизации ЛОД. Данные результаты подтвердились при тестировании лактатных биосенсоров, на основе планарных структур, модифицированных БЛ с иммобилизованным ферментом в мембраны силоксана. В табл. 4 приведены аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата. На рис. 41 наглядно представлена зависимость коэффициента чувствительности биосенсоров для определения лактата (S) от содержания силоксана в иммобилизующей смеси.

В табл. 4 и на рис. 41 видно увеличение чувствительности на участке от 0.1 до 1.5% силоксана, оптимум наблюдается в диапазоне 1.3 - 2.2% в иммобилизующей смеси, использование более высоких содержаний силоксана ведет к понижению чувствительности. Максимальные значения коэффициента чувствительности наблюдаются в диапазоне концентраций содержания силоксана от 1.3 до 2.2% в иммобилизующей смеси, однако в качестве лучшего был отмечен биосенсор с использованием 1.5% раствора для иммобилизации, как обладающий наиболее широким диапазоном определяемых концентраций лактата $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М, а также наилучшей стабильностью и воспроизводимостью.

Таблица 4. Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата на основе γ -аминопропилсилоксана ($n = 10, P = 0.95$)

Содержание силоксана в смеси, об. %	Линейный диапазон определяемых концентраций, М	c_{max} , мМ	Коэффициент чувствительности, $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$	K_M , мМ
0.1	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	31 ± 5	0.6 ± 0.1
0.2	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	50 ± 4	0.5 ± 0.1
0.3	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	62 ± 23	0.6 ± 0.3
0.4	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	65 ± 10	0.4 ± 0.1
0.5	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	125 ± 38	0.3 ± 0.1
0.6	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	107 ± 54	0.5 ± 0.2
0.7	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	130 ± 42	0.4 ± 0.2
0.8	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	111 ± 63	0.4 ± 0.1
0.85	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	125 ± 53	0.4 ± 0.1
0.9	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	164 ± 119	0.4 ± 0.1
1.0	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	183 ± 96	0.3 ± 0.1
1.2	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	175 ± 83	0.3 ± 0.1
1.3	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	229 ± 62	0.3 ± 0.1
1.5	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	261 ± 97	0.3 ± 0.1
1.7	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	158 ± 100	0.3 ± 0.1
1.8	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	266 ± 121	0.2 ± 0.1
2.0	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	263 ± 95	0.3 ± 0.1
2.2	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	1	248 ± 117	0.4 ± 0.1
2.4	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	1	185 ± 25	0.4 ± 0.1
2.8	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	136 ± 78	0.4 ± 0.1
3.0	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	113 ± 74	0.3 ± 0.1

Данные, полученные при тестировании лактатных биосенсоров, полностью согласуются с результатами, показанными с использованием СЭХМ. На рис. 41 видно, что наивысшей чувствительностью обладает датчик с содержанием силоксана в смеси 1.5%, а также биосенсор с 0.3% содержанием силоксана обладает наименьшей чувствительностью, относительно рассмотренных с

помощью СЭХМ. Биосенсоры с содержанием силоксана в смеси для иммобилизации фермента 0.9% и 2.8% с учетом погрешности показывают приблизительно одинаковые значения коэффициента чувствительности, что объясняет расхождение в показателях ферментативной активности между первым и вторым образцом, которые были показаны на рис. 35 и 40. Стоит заметить, что чувствительность биосенсоров при использовании 1.3 – 2.2 % силоксана в смеси для иммобилизации фермента увеличена в четыре раза по сравнению с чувствительностью лучшего лактатного датчика, с применением 0.3% силоксана.

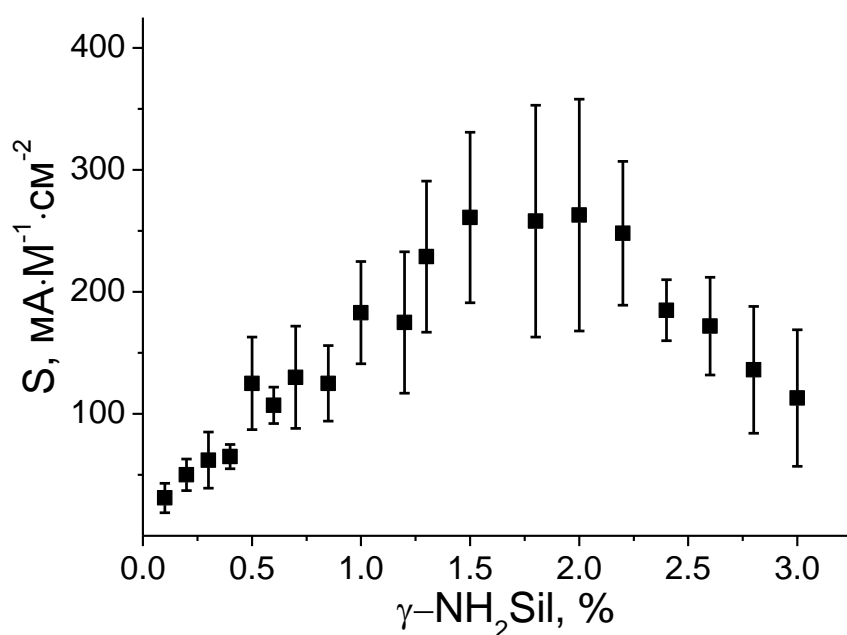


Рис. 41. Зависимость коэффициента чувствительности биосенсоров для определения лактата от содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента ($n = 10, P = 0.95$).

В табл. 4. приведены значения кажущейся константы Михаэлиса фермента лактатоксидазы при использовании различных смесей для иммобилизации. Кажущаяся константа Михаэлиса K_m - кинетический параметр ферментативной реакции, численно равный концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. K_m характеризует сродство фермента к субстрату: чем меньше значение константы, тем сильнее связывание фермента с субстратом [202-207]. Такие ферменты, как карбоангидраза и каталаза, требуют относительно высокой концентрации субстрата для достижения скорости, равной

половине максимальной. Другие же ферменты, например гексокиназа мозга, катализирующая перенос фосфатной группы от аденозинтрифосфата на глюкозу, обеспечивают скорость, равную половине максимальной, при очень низкой концентрации субстрата. Ферменты, имеющие два или более субстрата, такие как гексокиназа или аспартатамино-трансфераза, могут иметь различные значения K_m для разных субстратов. Если фермент, например химотрипсин, действует на несколько разных субстратов, имеющих какую-то общую структурную особенность, то величины K_m для всех этих субстратов могут значительно различаться. Этот параметр введен Леоном Михаэлисом в 1913 году.

Кинетика большинства ферментативных реакций может быть формально описана при помощи уравнения Михаэлиса-Мэнтен. На рис. 42 показана зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента. Из экспериментальных данных о скорости реакции при различных начальных концентрациях субстрата можно определить кинетические параметры K_m (кажущуюся) и V_m (кажущуюся).

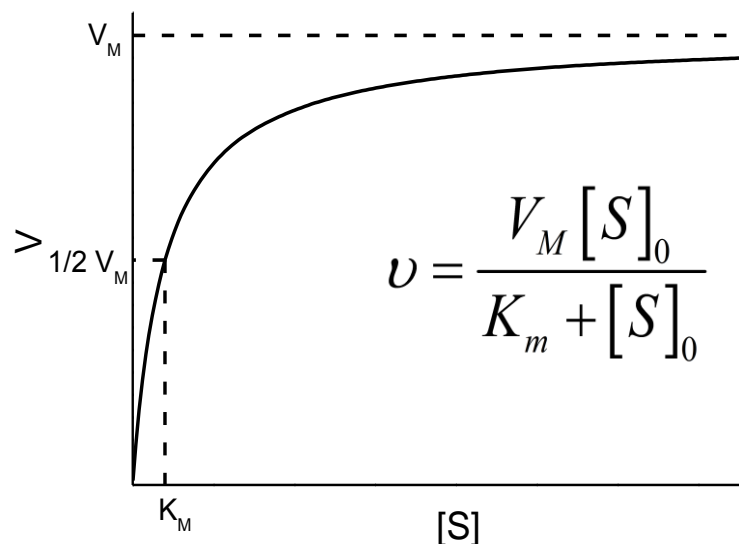


Рис. 42. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента. Уравнение Михаэлиса-Мэнтен.

Зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата представляет собой фрагмент ветви гиперболы. Зависимость $[S]_0$ от V

может быть использована для определения концентрации субстрата методом градуировочного графика. Таким образом, кажущаяся константа Михаэлиса K_m может использоваться для оценки верхней границы диапазона определяемых концентраций.

Отношение V_m (каж.) к K_m (каж.) характеризует коэффициент чувствительности отдельного биосенсора в условиях эксперимента. С точностью до концентрации фермента отношение V_m (каж.)/ K_m (каж.) равно константе специфичности, мере частоты и эффективности образования фермент-субстратного комплекса.

На рис. 43 показана зависимость K_m (здесь и везде далее рассматривается кажущаяся константа Михаэлиса) от содержания силоксана в смеси для иммобилизации фермента. На графике видно увеличение сродства фермента к субстрату при увеличении концентрации силоксана в смеси для иммобилизации фермента от 0.1 до 1.5 %, наблюдается оптимум в диапазоне 1.3 – 2.2 % силоксана, а дальнейшее увеличение содержания силоксана в смеси ведет к понижению аффинности фермента к субстрату.

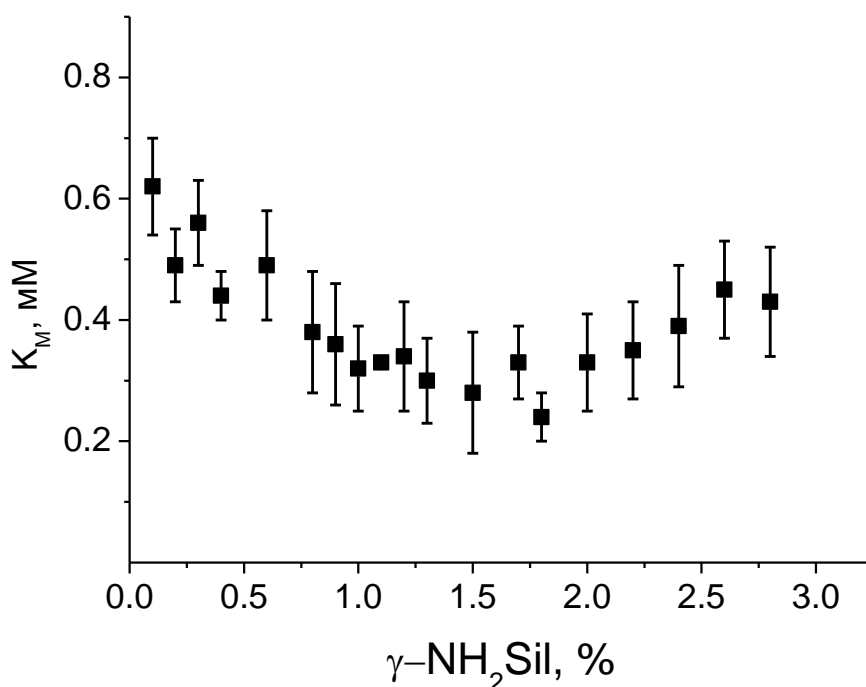


Рис. 43. Зависимость кажущейся константы Михаэлиса от содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента ($n = 10$, $P = 0.95$).

Стоит отметить, что увеличение плотности мембраны создает диффузионные затруднения для субстрата и, тем самым, понижает аффинность фермента к субстрату. Но в данном случае сродство фермента к субстрату возрастает при увеличении концентрации (от 0.1 до 1.5% силоксана в смеси), что говорит о создании наиболее благоприятной среды для фермента. Дальнейшее понижение сродства при увеличении содержания силоксана в мембране можно объяснить предположительно чрезмерным уплотнением мембраны и, таким образом, частичным блокированием фермента. Для подтверждения данного предположения было необходимо определить плотности ферментсодержащих мембран, что описано в следующей главе.

Таким образом, можно сделать вывод, что данные, показанные с помощью СЭХМ, полностью согласуются с результатами, полученными при тестировании планарных биосенсоров на лактат. Найдено оптимальное содержание силоксана в смеси для иммобилизации фермента для создания высокоэффективного биосенсора для определения лактата.

7.5. Использование методов сканирующей электронной и лазерной микроскопии и профилометра для исследования ферментсодержащих мембран

Для изучения структуры ферментсодержащих мембран, их шероховатости и текстуры поверхности была использована сканирующая электронная микроскопия, а также для расчета плотностей была применена сканирующая лазерная микроскопия и профилометрия.

При первоначальном рассмотрении мембраны были исследованы на подложке из ПЭТФ с нанесенной графитовой пастой методом СЛМ, но результаты не увенчались успехом по причине того, что графитовая паста при близком рассмотрении рельефная, как видно на рис. 44, и мембрана, вероятно, оседает в неровностях поверхности.

Для решения этой проблемы мембраны были рассмотрены на подложке из ПЭТФ при использовании шкалы приближений на 100 и 10 мкм (рис. 45 и 46).

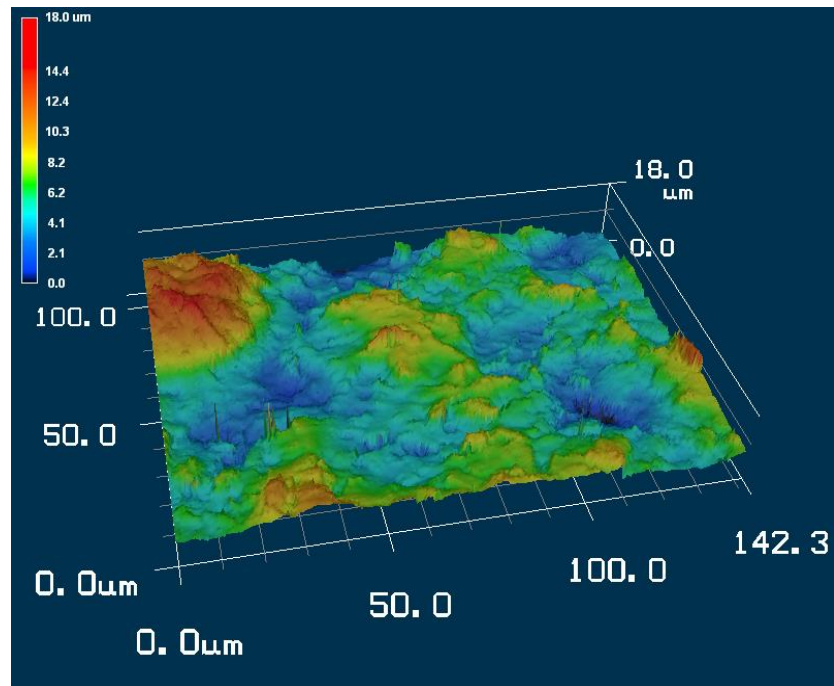


Рис. 44. Трехмерное изображение поверхности полиэтилентерефталата с нанесенной графитовой пастой с использованием сканирующего лазерного микроскопа.

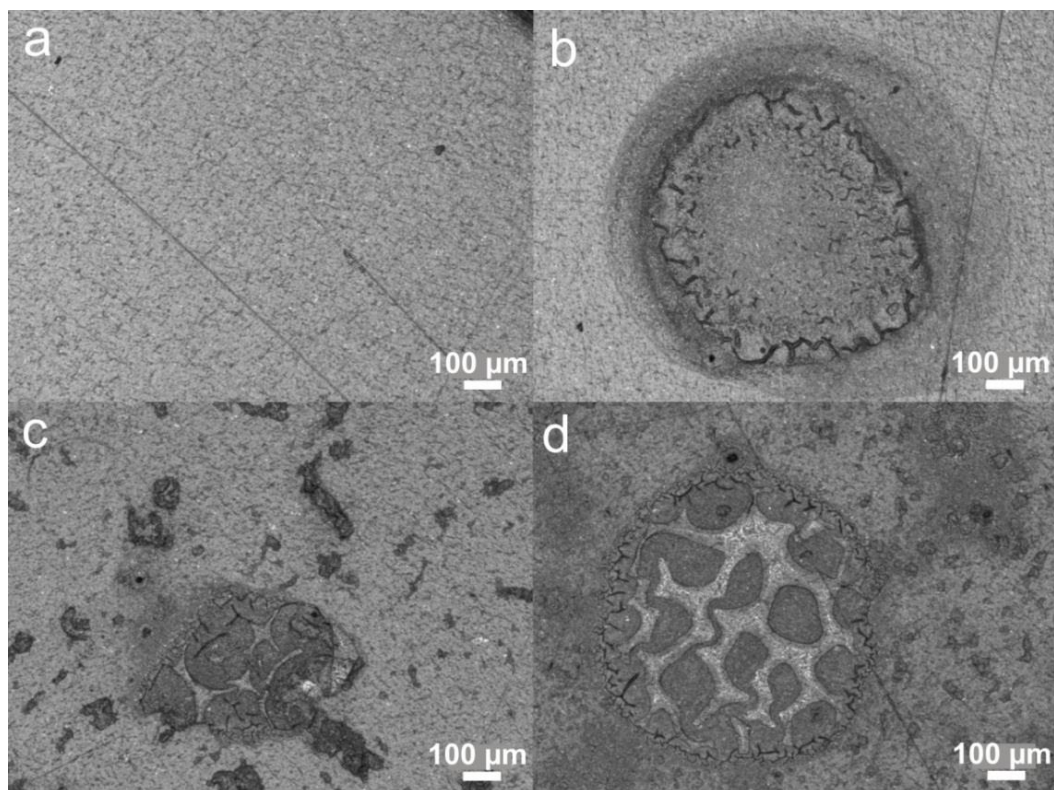


Рис. 45. Изображения ферментсодержащих мембран различной плотности с помощью сканирующего лазерного микроскопа; а) подложка из ПЭТФ и три

ферментсодержащие капли с содержанием силоксана в смеси для иммобилизации: b) 0.3%, c) 1.5% и d) 2.8%. Шкала 100 мкм.

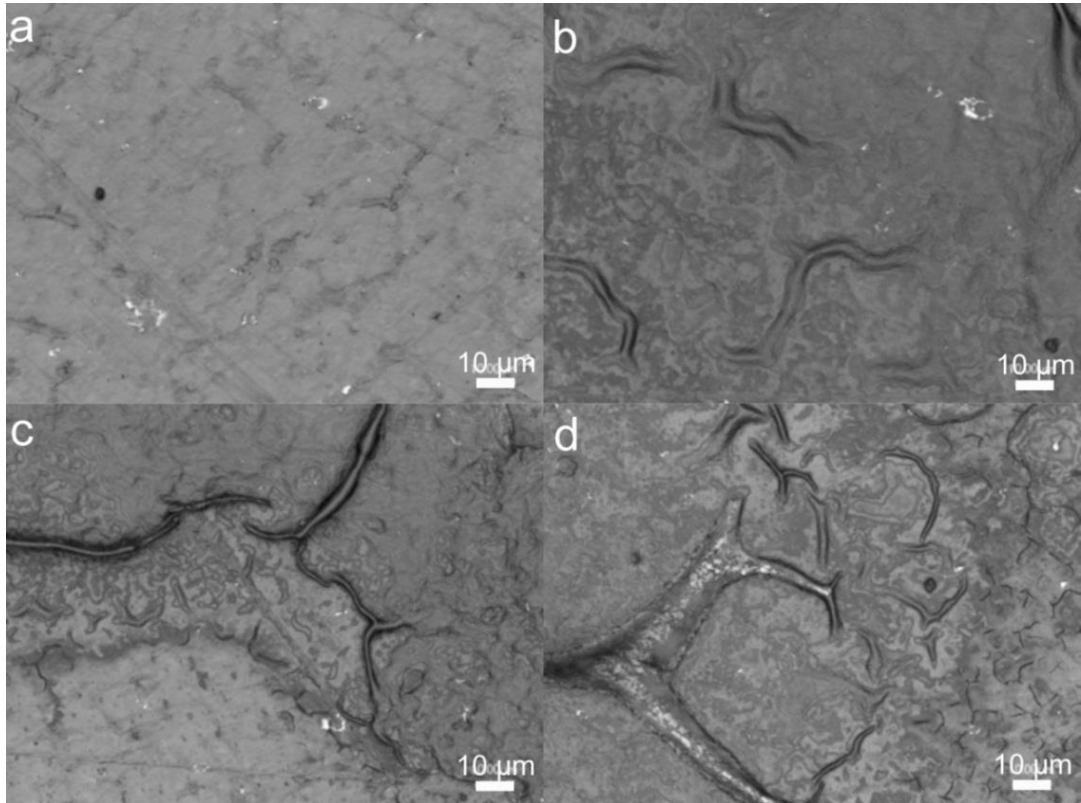


Рис. 46. Изображения ферментсодержащих мембран различной плотности с помощью сканирующего лазерного микроскопа; а) подложка из ПЭТФ и три ферментсодержащие капли с содержанием силоксана в смеси для иммобилизации: b) 0.3%, c) 1.5% и d) 2.8%. Шкала 10 мкм.

Также мембраны были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии на подложке ПЭТФ с нанесенной на нее графитовой пастой, что в точности воспроизводит поверхность рабочего электрода планарной трехэлектродной структуры. Была использована шкала приближений на 20 и 5 мкм (рис. 47 и 48).

На рис. 47 и 48 видно, что поверхность рабочего электрода планарного биосенсора рельефная, мембрана заполняет собой микроскопические неровности и оседает сверху островками.

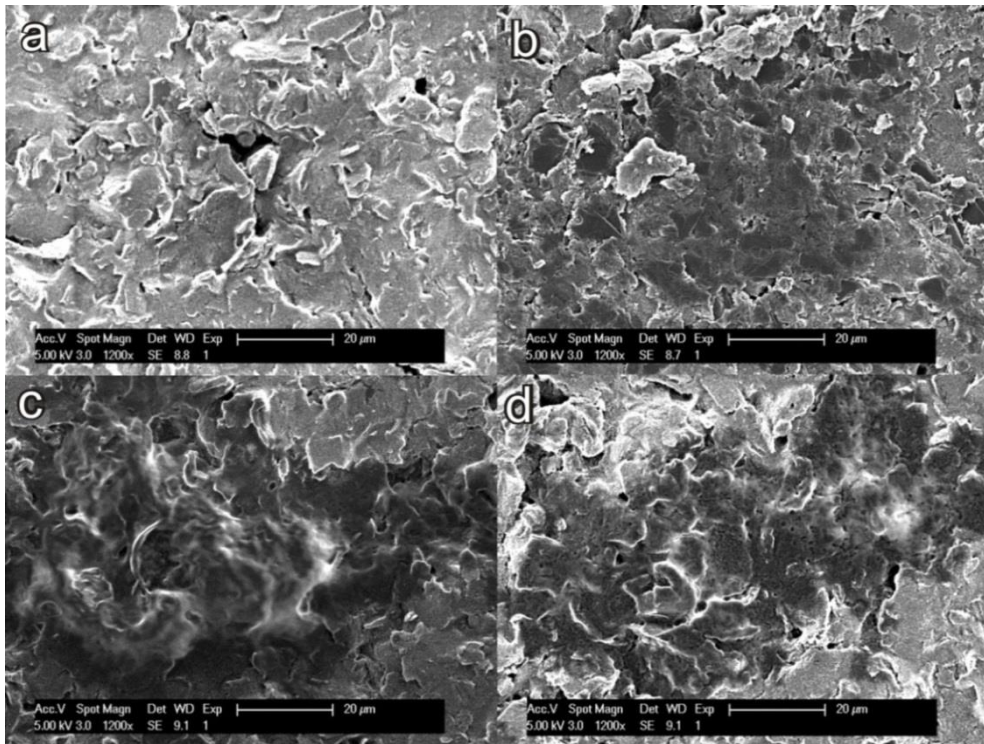


Рис. 47. Изображения ферментсодержащих мембран различной плотности с помощью сканирующего электронного микроскопа; а) подложка из ПЭТФ и три ферментсодержащие капли с содержанием силоксана в смеси для иммобилизации: б) 0.3%, с) 1.5% и д) 2.8% силоксана. Шкала 20 мкм.

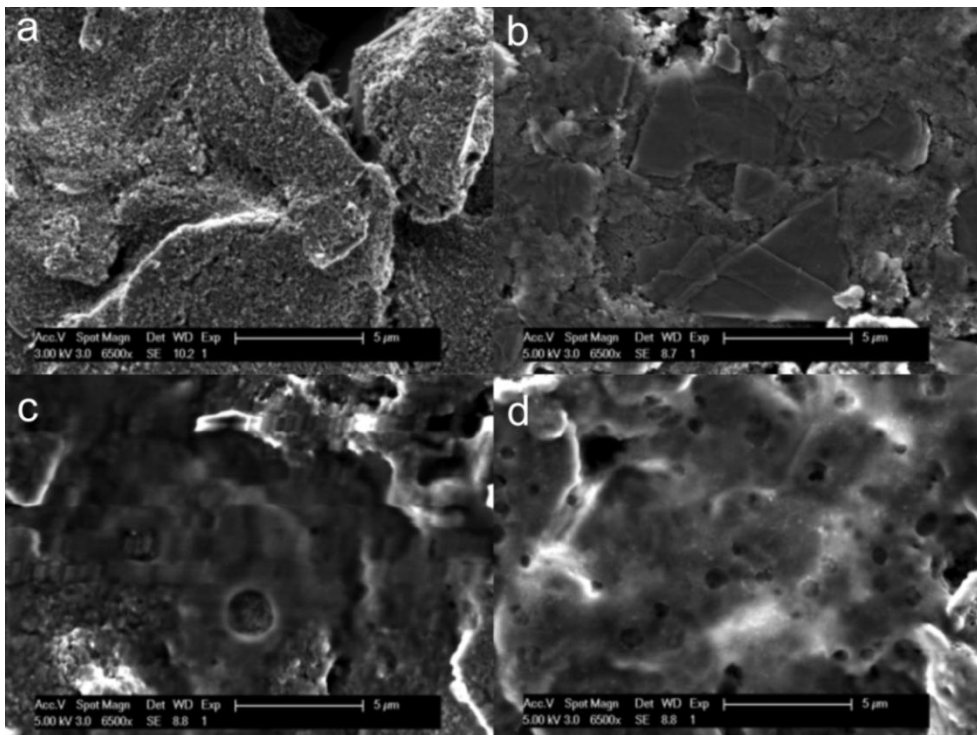


Рис. 48. Изображения ферментсодержащих мембран различной плотности с помощью сканирующего электронного микроскопа; а) подложка из ПЭТФ и три

ферментсодержащие капли с содержанием силоксана в смеси для иммобилизации: b) 0.3%, c) 1.5% и d) 2.8% силоксана. Шкала 5 мкм.

На рис. 44 – 48 отчетливо наблюдается изменение структуры и пористости мембран при иммобилизации фермента в смеси с различными содержаниями силоксана. При сильном увеличении заметно, что все мембраны обладают индивидуальной структурой: при использовании 0.3% силоксана она схожа с игольчатой структурой, при применении 1.5 и 2.8% мембраны представляют собой пористую массу, 1.5 – с крупными, а 2.8 – с мелкими порами. Для подтверждения предположения об увеличении плотности мембраны при иммобилизации фермента в более концентрированные растворы силоксана были рассмотрены высоты и площади мембран с помощью профилометра и СЛМ для дальнейшего расчета плотностей. Полученные данные приведены в табл. 5.

Таблица 5. Высоты и площади ферментсодержащих силоксановых мембран, полученные с помощью профилометра и сканирующего лазерного микроскопа. Исследуемый объем пробы составлял 0.1 мкл

Содержание силоксана в смеси для иммобилизации, %	0.3	1.5	2.8
Средняя высота мембраны, мкм	1.7	5.0	9.0
Площадь мембраны, мм ²	1194	1808	1661

Из данных табл. 5 было рассчитано увеличение плотностей мембран относительно 0.3%-ного содержания силоксана в смеси для иммобилизации. Мембраны, с содержанием силоксана 1.5 % в смеси демонстрируют увеличение плотности относительно 0.3 % в 1.1 раза, а 2.8 % силоксана – в 1.3 раза. Из чего можно сделать вывод, что, как и предполагалось, плотности ферментсодержащих силоксановых мембран возрастают с увеличением концентрации силоксана в иммобилизующей смеси.

Как было описано в предыдущей главе, при увеличении плотности ферментсодержащей мембраны сродство лактатоксидазы к субстрату обычно падает, что объясняется диффузионными затруднениями между ферментом и субстратом. Однако в нашем случае наблюдается обратная картина - сродство фермента к субстрату возрастает при увеличении плотности мембраны (от 0.1 до

1.5 % силоксана в смеси), а минимум значения K_m приходится на 1.3 – 2.2 % силоксана, что говорит о создании максимально благоприятной среды для фермента (рис. 43). Из чего можно сделать вывод, что именно в такой мембране лактатоксидаза будет демонстрировать наивысшую активность и стабильность.

Таким образом, с помощью методов сканирующей лазерной микроскопии и профилометрии было выявлено, что плотности ферментсодержащих мембран возрастают с увеличением концентрации силоксана в иммобилизующей смеси, наилучшее сродство фермента к субстрату наблюдается при использовании 1.3 – 2.2 % силоксана. Это говорит о создании наиболее благоприятной среды для лактатоксидазы и указывает на перспективу создания высокочувствительного и высокостабильного биосенсора для определения лактата.

7.6. Аналитические характеристики высокочувствительного биосенсора для определения лактата

Наилучшей воспроизводимостью, а вместе с тем и максимальной чувствительностью, наиболее широким диапазоном определяемых концентраций лактата и высокой стабильностью характеризовался биосенсор с использованием смеси для иммобилизации лактатоксидазы, содержащей 1.5% силоксана.

На рис. 49 представлен отклик биосенсора для определения лактата в batch-режиме, видны маленькие значения фоновых токов, первая определяемая концентрация четко различима. Видна стабильность отклика, также можно отметить, что значения тока не уменьшаются, а даже немного растут со временем. Биосенсор тестировали с использованием модельных растворов лактата трехкратно, на основании чего строили градуировочную зависимость (рис. 50). Диапазон определяемых концентраций лактата составляет более чем 3 порядка с $1 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ М, предел обнаружения – $0.9 \cdot 10^{-6}$ М лактата. Время отклика порядка 40 с, коэффициент чувствительности биосенсора, измеряемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, составляет $0.33 \cdot A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$. Чувствительность разработанного биосенсора в четыре раза превышает значение лучшего высокочувствительного датчика на лактат, с использованием смеси 0.3% силоксана для иммобилизации [50]. Также стоит заметить, что данное значение

только в два раза меньше, чем чувствительность датчика трансдьюсера на пероксид водорода берлинской лазури [108], что является очень хорошим результатом.

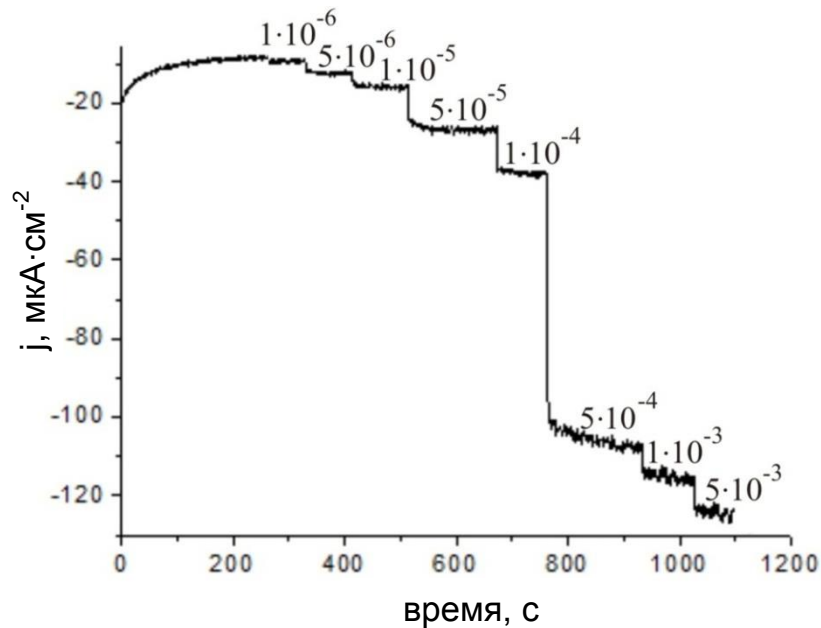


Рис. 49. Отклик биосенсора при определении лактата в batch-режиме при построении градуировочной зависимости (смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силоксана).

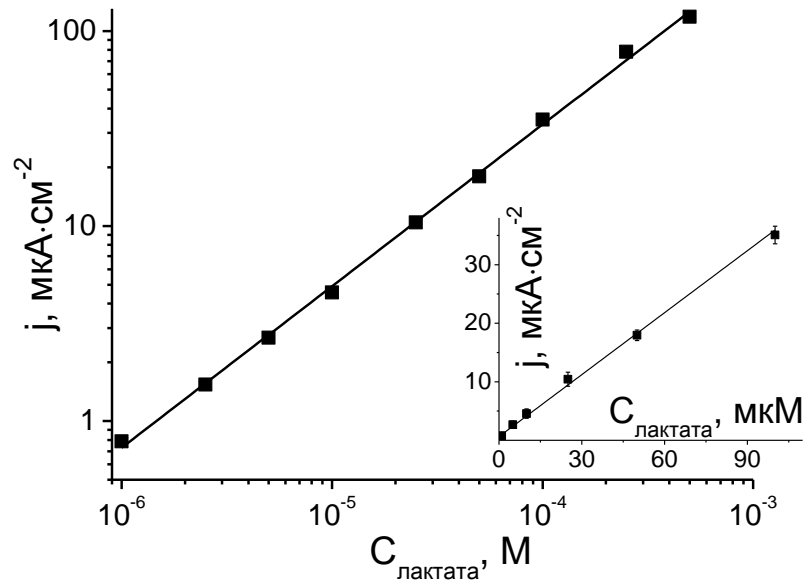


Рис. 50. Градуировочный график для определения лактата в batch-режиме при перемешивании (смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силоксана). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М КН₂РО₄ (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

Для определения операционной стабильности датчика были проведены эксперименты в batch-режиме при постоянном перемешивании в растворе $5 \cdot 10^{-4}$ М лактата (рис. 51). Измерения проводились с использованием высоких концентраций лактата, что представляет собой довольно жесткие условия, так как продукт восстановления H_2O_2 – гидроксил-ионы – растворяют берлинскую лазурь [200], и чем концентрированнее раствор лактата, тем больше образуется пероксида водорода, и тем быстрее смывается покрытие пленок БЛ. И, таким образом, длительные эксперименты в концентрированных растворах лактата приводят к быстрой потере отклика, однако, после 2 ч непрерывных измерений при постоянном перемешивании в batch-режиме разработанный биосенсор сохраняет 85% от первоначального отклика, как видно на рис. 51. Спустя 4 ч непрерывных измерений обеспечивается по крайней мере 50% от исходного значения тока, что представляет собой высокую операционную стабильность в сравнение с биосенсорами, при иммобилизации фермента в смеси 0.3% и 2.8% силоксана (рис. 52), где датчики теряют 50% отклика спустя 2 ч. Биосенсор с составом смеси 0.9% силоксана показал высокую операционную стабильность, сохраняя 50% отклика после 5 ч непрерывной работы (рис. 53). Сравнение операционной стабильности биосенсоров для определения лактата на основе силоксана представлено в табл. 6.

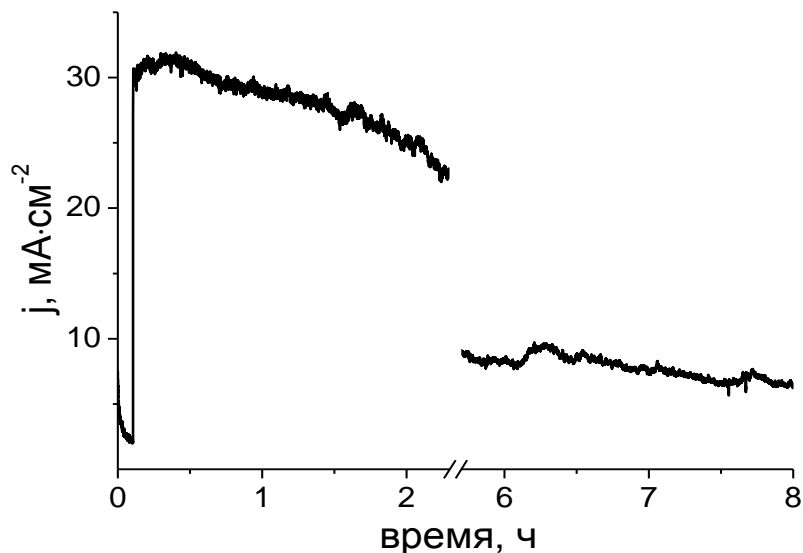


Рис. 51. Операционная стабильность биосенсора при определении лактата в batch-режиме при постоянном перемешивании раствора $5 \cdot 10^{-4}$ М лактата в буферном растворе (рН 6.0, смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силоксана).

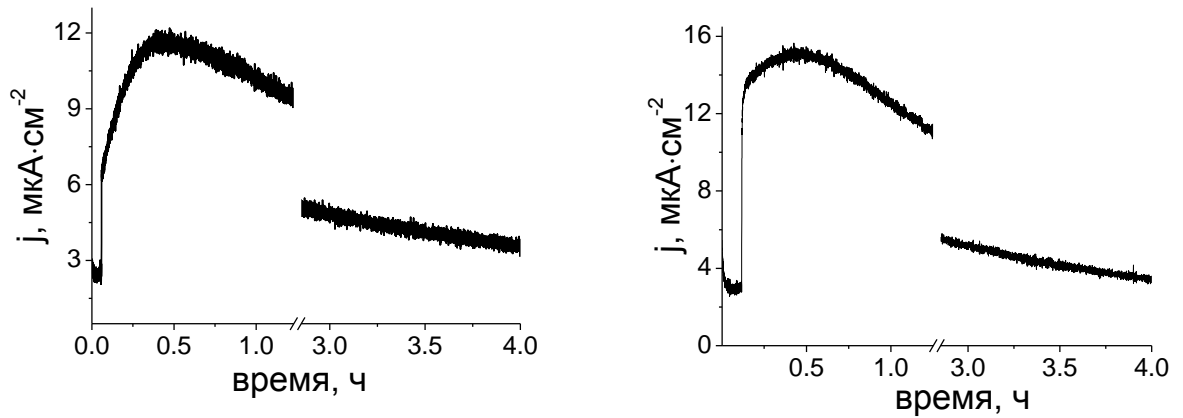


Рис. 52. Операционная стабильность биосенсоров при определении лактата в batch-режиме при постоянном перемешивании раствора $5 \cdot 10^{-4}$ М лактата в буферном растворе (рН 6.0, содержание силоксана в иммобилизующей смеси для фермента: слева - 0.3%, справа - 2.8%).

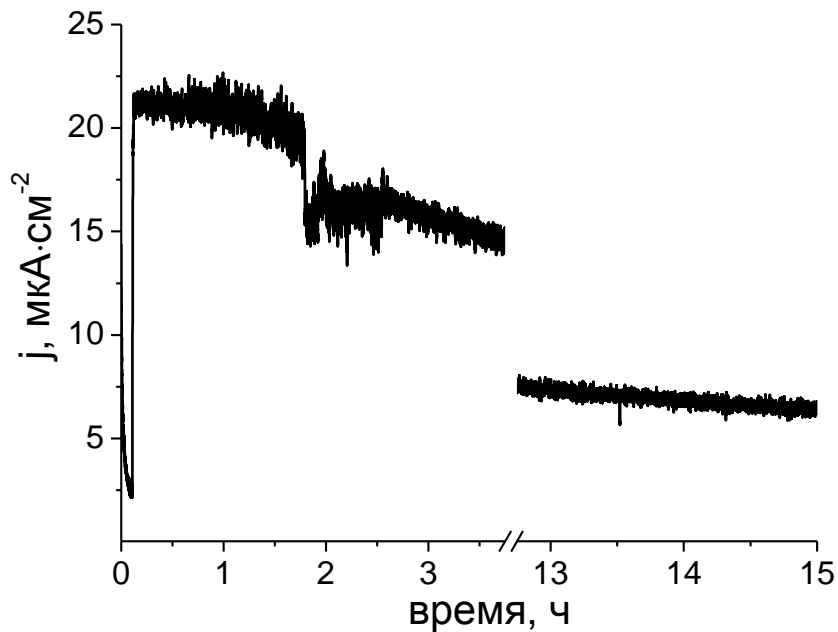


Рис. 53. Операционная стабильность биосенсора для определения лактата в batch-режиме при постоянном перемешивании раствора $5 \cdot 10^{-4}$ М лактата в буферном растворе (смесь для иммобилизации фермента содержала 0.9% силоксана).

Таблица 6. Сравнение операционной стабильности биосенсоров для определения лактата на основе силиконовых мембран ($n = 3, P = 0.95$)

Содержание силиксана в смеси, об.%	0.3	0.9	1.5	2.8
Время потери 15% от первоначального отклика, ч	1.1 ± 0.3	1.6 ± 0.3	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
Время потери 50% от первоначального отклика, ч	2.0 ± 0.4	5.0 ± 0.5	4.0 ± 0.2	2.0 ± 0.4

Также была протестирована стабильность при хранении, для этого запечатанные в конверты биосенсоры хранились в холодильной камере при $+4^{\circ}\text{C}$. После хранения биосенсоров в течение 18 мес они были протестированы в batch-режиме, отклик биосенсора показан на рис. 54. Наблюдаются маленькие значения фоновых токов, ровный стабильный сигнал и требуемые соотношения между исследуемыми концентрациями. Биосенсор тестировали в модельных растворах лактата трехкратно, на основании чего строили градуировочный график и рассчитывали аналитические характеристики.

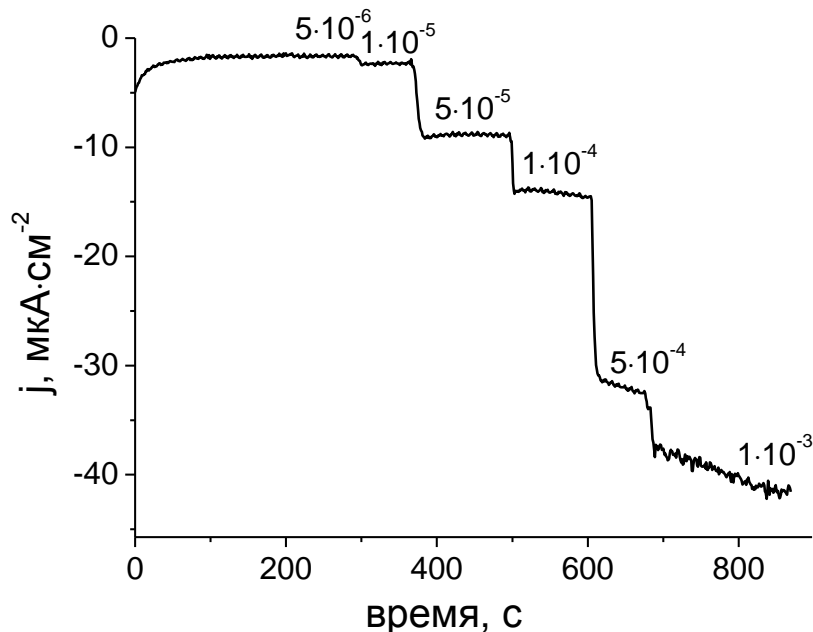


Рис. 54. Отклик биосенсора для определения лактата после хранения в течение 18 мес (смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силиксана) в batch-

режиме при построении градуировочной зависимости. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

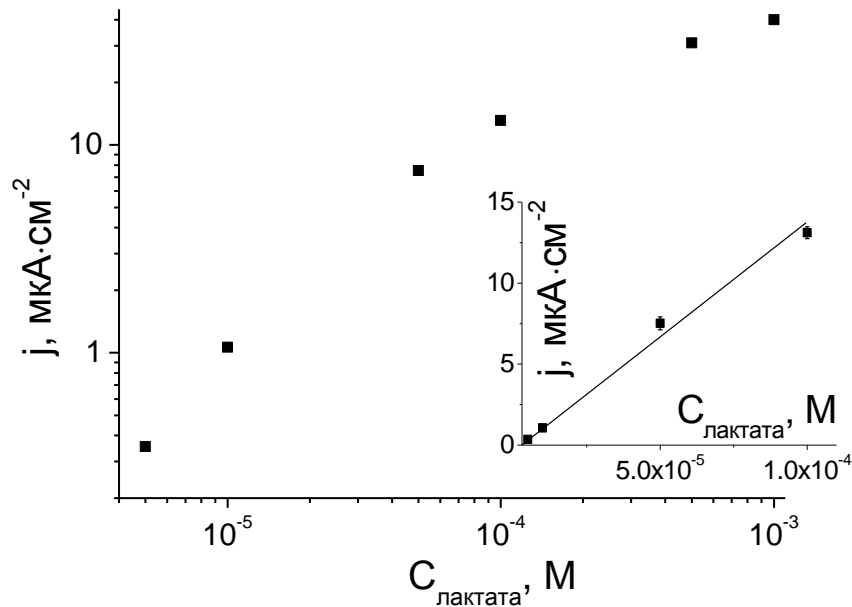


Рис. 55. Градуировочный график для определения лактата в batch-режиме при перемешивании после хранения биосенсора в течение 18 мес (смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силоксана). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

Коэффициент чувствительности биосенсоров после длительного хранения, рассчитанный как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, составил $0.13 \pm 0.06 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 3$, $P = 0.95$), а диапазон определяемых концентраций лактата почти три порядка от $5 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ М. Из чего можно сделать вывод, что даже спустя 18 мес хранения биосенсор стабильно работает и лишь незначительно теряет в аналитических характеристиках, сохраняется по крайней мере 80% от исходного значения чувствительности. Данный факт достоин внимания, особенно ввиду того, что фермент ЛОД является одной из наиболее лабильных оксидаз и создание условий для длительного сохранения активности и стабильности фермента является сложной задачей, которая была решена путем нахождения оптимального состава смеси для иммобилизации фермента на поверхности высокоэффективного трансдьюсера.

Таким образом, разработан биосенсор для определения лактата, характеризующийся коэффициентом чувствительности $0.33 \cdot \text{А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, высокой операционной стабильностью, а также стабильностью при хранении как минимум 18 мес, время отклика биосенсора составило 40 с. После двух часов непрерывной работы сохраняется по крайней мере 85% от первоначального отклика. Биосенсор показывает улучшение характеристик относительно ранее признанного лучшего лактатного датчика чувствительности - в четыре раза, а операционной стабильности - в два раза.

Глава 8. Биосенсор для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата

8.1. Методы сдвига диапазона определяемых концентраций в область высоких значений

Целью данных исследований является разработка неинвазивных методов мониторинга лактата. Ранее была показана корреляция по увеличению концентрации лактата в крови и в поте [11, 77, 83]. Именно поэтому было необходимо разработать биосенсор для определения лактата в неразбавленном поте с целью дальнейшего конструирования неинвазивного монитора состояния гипоксии, проводящего непрерывные измерения уровня лактата в процессе физических нагрузок.

Концентрация лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физических нагрузок по различным источникам варьируется от 4 до 80 мМ [11, 84, 86]. Для непрерывного мониторинга лактата в поте было необходимо создать биосенсор на высокие (миллимолярные) концентрации лактата. Для этого за основу был взят созданный в настоящей работе биосенсор (§ 7), характеризующийся диапазоном определяемых концентраций лактата от $1 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ М. Более высокие содержания аналита не могут быть определены с помощью данного биосенсора по причине лимитирования по второму субстрату реакции – кислороду (как известно, концентрация молекулярного кислорода в буферном растворе при нормальных условиях составляет 0.25 мМ).

Были рассмотрены известные способы расширения диапазона определяемых концентраций в область высоких значений, а именно:

- изменение плотности мембранообразующего соединения (в данном случае концентрации силоксана в иммобилизующей смеси);
- изменение аффинности (сродства) фермента лактатоксидазы к субстрату (лактату).

Как было рассмотрено в § 7, первый способ не даёт сдвига диапазона определяемых концентраций больше, чем в 5 раз, чего не достаточно, так как требуемые диапазоны различаются более чем в 100 раз.

Было решено понизить аффинность ЛОД к субстрату путем инженерии лактатоксидазы при ее иммобилизации. Из литературных источников известно, что в активном центре лактатоксидазы присутствуют два положительно заряженных аргининовых остатка Arg181 и Arg268. Остатки аргинина расположены в непосредственной близости от кофактора флавиномононуклеотида и вероятно являются частью субстрат-связывающего участка фермента [134-136]. В настоящей работе было предложено экранировать субстрат-связывающий участок отрицательным зарядом, и, благодаря чему добиться увеличения значения кажущейся константы Михаэлиса. При понижении сродства фермента к субстрату ожидался сдвиг диапазона определяемых концентраций лактата в область более высоких значений.

Ранее, на примере глюкозооксидазы, было показано, что перфторсульфонированный полимер (ПФС – отечественный аналог нафiona) является хорошим мембранообразующим соединением и на его основе был создан глюкозный биосенсор [198]. Доказано, что при иммобилизации образуется комплекс полиэлектролита с ферментом, к преимуществам данного полимера можно отнести водонерастворимость, биосовместимость, а также высокую степень адгезии к поверхности и низкую набухаемость в водных растворах.

Таким образом, для создания биосенсора на высокие концентрации лактата было предложено понизить сродство фермента к субстрату путем экранирования субстрат-связывающего участка ЛОД. Для этого для иммобилизации лактатоксидазы было решено использовать перфторсульфонированный иономер, который содержит отрицательно заряженные сульфогруппы.

8.2. Использование перфторсульфонированного полимера для иммобилизации лактатоксидазы при создании биосенсоров для определения лактата

Иммобилизацию ЛОД в мембраны из перфторсульфонированного полимера проводили по ранее разработанной методике, заключающейся в смешивании водного раствора фермента со спиртовым раствором ПФС, в нашем случае использовали изопропанол. Содержание воды в иммобилизующей смеси, как и ранее, составляло 10%. Биосенсоры представляли собой планарные

трехэлектродные структуры, модифицированные БЛ с иммобилизованной ЛОД в мембрану ПФС.

Содержание ПФС в иммобилизующей смеси для фермента варьировалось от 0.2 до 1.0 об.%. Биосенсоры тестировались с использованием системы проточно-инжекционного анализа и в batch-режиме, аналитические характеристики при использовании ПИА приведены в табл.7.

Таблица 7. Аналитические характеристики лактатных биосенсоров на основе перфторсульфонируемого полимера, протестированные в системе проточно-инжекционного анализа ($n = 5$, $P = 0.95$)

Содержание ПФС в иммобилизующей смеси, %	Коэффициент чувствительности, $\text{мкА} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	Линейный диапазон, М
0.2	20 ± 2	0.05 - 1
0.3	15 ± 3	0.05 - 0.5
>0.5	нет отклика	

Наилучшими аналитическими характеристиками обладал биосенсор с содержанием ПФС в смеси для иммобилизации - 0.2 об.% ПФС (рис.55).

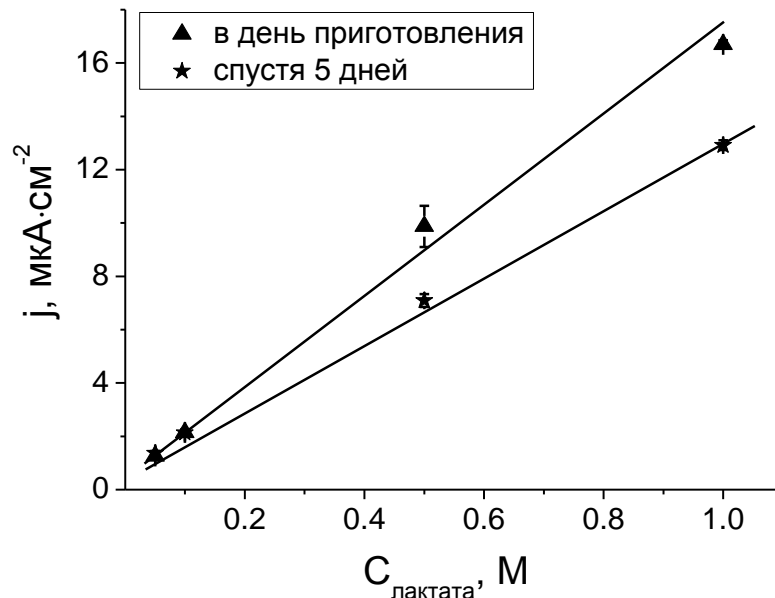


Рис. 55. Градуировочные графики для определения лактата с помощью биосенсора при тестировании в день приготовления и спустя 5 дней хранения (смесь для

иммобилизации фермента содержала 0.2% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

Следует заметить, что полученный датчик стабильно работает даже спустя 5 дней хранения при $+4^\circ\text{C}$ и лишь незначительно теряет в чувствительности с $20 \text{ мкА}\cdot\text{М}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$ до $17 \text{ мкА}\cdot\text{М}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$, что наглядно показано на рис. 55, так как тангенс угла наклона градуировочной зависимости свидетельствует о коэффициенте чувствительности биосенсора. Тем не менее, чувствительность биосенсора очень низкая, а диапазон определяемых концентраций лактата составляет меньше двух порядков и настолько сдвинут в область высоких значений, что нижний предел определяемых содержаний становится чрезмерно высоким для определения аналита в поте.

При высоких содержаниях ПФС в смеси (более 0.3%) в системе ПИА отклика не наблюдалось. Также проводили определение лактата в batch-режиме в диапазоне концентраций: $1\cdot 10^{-6}$ – $1\cdot 10^{-1}$ М в буферном растворе, но никакого сигнала не было обнаружено. Это подтверждает блокирование активного центра фермента отрицательно заряженными сульфо-заместителями молекулы ПФС.

Таким образом, при использовании низких содержаний ПФС для иммобилизации ЛОД происходит значительное ухудшение аналитических характеристик биосенсора, что объясняется экранированием активного центра фермента. Чувствительность биосенсора значительно падает, а диапазон определяемых концентраций лактата сдвигается в область высоких значений, однако нижний предел определяемых содержаний становится чрезмерно высоким для определения аналита в поте. Поэтому, для достижения требуемого диапазона определяемых концентраций целесообразно было иммобилизовать фермент в смешанные мембраны силоксана и ПФС.

8.3. Скрининг различных составов ферментсодержащих мембран с использованием сканирующей электрохимической микроскопии

Для выявления закономерностей по изменению ферментативной активности ЛОД при использовании силоксановых, ПФС и смешанных мембран была использована сканирующая электрохимическая микроскопия. Для этого на единой подложке из ПЭТФ с графитовой пастой были нанесены три ферментсодержащие

мембраны с использованием смесей для иммобилизации, содержащих: 1.5% силоксана, 1.5% силоксана с 0.75% ПФС и 0.75% ПФС. Мембрана из смеси 1.5%-ного силоксана была выбрана как обладающая наивысшей чувствительностью (§ 7). Объем пробы каждого состава - 0.1 мкл, измерения проводились в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе.

Приведение зонда в контакт с поверхностью осуществлялось на основании кривой приближения в растворе лактата в буферном растворе. Концентрация 5 мМ лактата была выбрана для усиления контраста на получаемом изображении между областями, где пероксид генерировался ферментом, и областью, где пероксид появлялся в результате диффузии. В режиме обратной связи зонд изначально находился на некотором расстоянии от исследуемой поверхности, где через него протекал фоновый ток, обусловленный фоновым электролитом и лимитированный полусферической диффузией электроактивных частиц к рабочей поверхности микроэлектрода. Зонд позиционировался таким образом, чтобы при касании подложки он находился у края ферментсодержащей капли, а сканирование по оси X проходило по её центру.

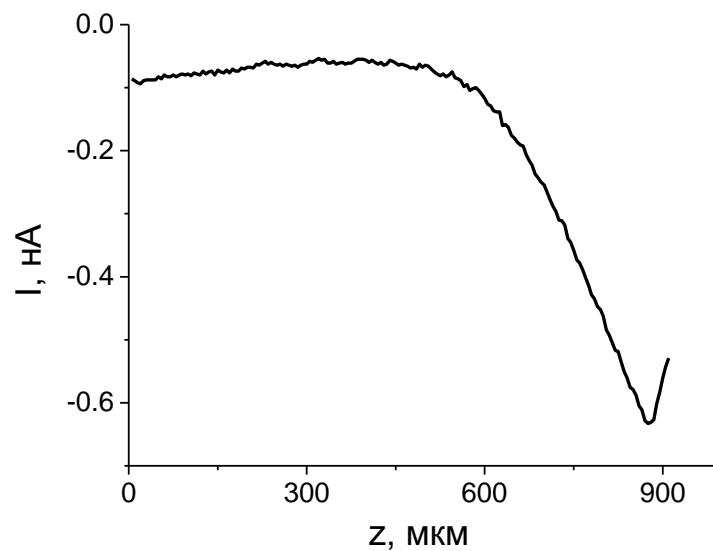


Рис. 56. Кривая приближения зонда в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0). По оси абсцисс отложено расстояние, пройденное зондом, по оси ординат – ток, скорость 1 мкм/с, шаг 0.5 мкм, потенциал 0.00 В.

По мере приближения к поверхности диффузия всё больше затруднялась и наблюдалось постепенное увеличение катодного тока от 600 до 850 мкм по оси Z

(рис. 56). После чего на кривой наблюдается точка перегиба, соответствующая расстоянию, на котором зонд коснулся поверхности. Далее зонд начинает изгибаться, что обуславливает уменьшение катодного тока.

После приведения зонда в контакт с подложкой, содержащей иммобилизованную ЛОД, микроэлектрод опускали ниже на величину $h_p = -100$ мкм, достигая изгиба на некоторый угол для более уверенного контакта с исследуемой подложкой. Далее проводили линейное сканирование пробы по оси X, проходя зондом вдоль капель.

При сканировании по оси X отчетливо наблюдается увеличение катодного тока при прохождении вдоль капель ЛОД (рис. 57). В районе 0 - 4000 мкм по оси X виден сигнал от фермента с использованием смеси 1.5% силоксана, далее от 4000 до 6000 мкм сигнал от ЛОД, иммобилизованной в смешанную силоксан-ПФС мембрану, однако на месте нахождения фермента в мембране из ПФС (в районе 6000 - 8000 мкм), наблюдается падение катодного тока до фонового значения. Это обуславливается блокированием фермента отрицательно заряженным ПФС, что предотвращает сигнал. Данное явление подтверждает результаты, полученные при тестировании лактатных биосенсоров, которые были описаны в предыдущей главе (§ 8.2).

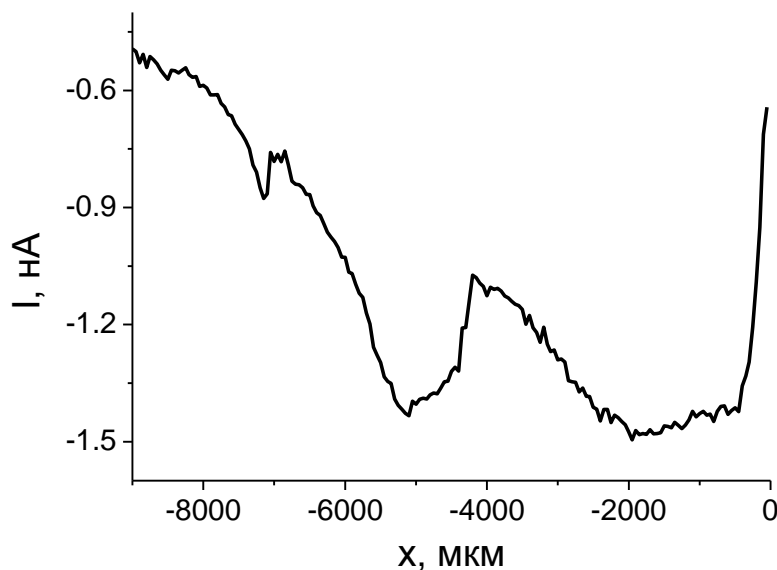


Рис. 57. Линейное сканирование трех ферментсодержащих мембран в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -100$ мкм,

потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала (слева направо): 0.75% ПФС, 1.5% силоксана и 0.75% ПФС, 1.5% силоксана.

Подложка с иммобилизованными каплями ЛОД находилась в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0) для последующего сканирования электрохимической активности поверхности в режиме коллекции-генерации. Была выбрана область размером 9.0x1.2 мм, установленный рабочий потенциал 0.00 В, скорость линейного сканирования 50 мкм/с, шаг по оси X 50 мкм, расстояние между областями линейного сканирования было установлено в 50 мкм, что соответствует приблизительной ширине электрода.

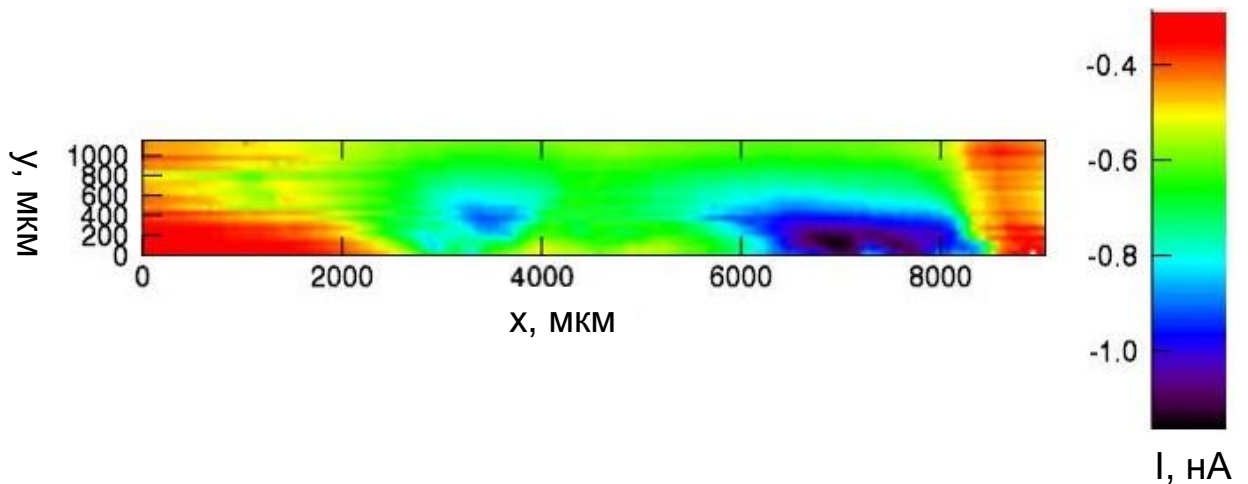


Рис. 58. СЭХМ-изображение участка подложки с ферментсодержащими мембранами в растворе лактата в буферном растворе. Скорость 50 мкм/с, шаг по X 50 мкм, шаг по Y 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала (слева направо): 0.75% ПФС, 1.5% силоксана и 0.75% ПФС, 1.5% силоксана.

Темно-синяя окраска на рис. 58 соответствует высоким значениям катодных токов. Справа, на месте нанесения силоксановой ферментсодержащей мембраны, наблюдается высокая ферментативная активность ЛОД. В середине виден сигнал от фермента, иммобилизованного в смешанную силоксан-ПФС мембрану, заметна окраска капли в голубой цвет, что соответствует промежуточным значениям токов и говорит о значительном понижении ферментативной активности. Однако на месте капли ЛОД в мембране ПФС наблюдается красная область, соответствующая нулевым значениям токов. Отсутствие сигнала от фермента, иммобилизованного в

смесь 0.75% ПФС, подтверждает факт блокирования ЛОД отрицательно-заряженными сульфогруппами полимера.

Таким образом, при использовании смешанных силоксан-ПФС мембран для иммобилизации ЛОД происходит понижение сродства фермента к субстрату, как следствие наблюдается падение ферментативной активности, а вместе с тем и изменение аналитических характеристик лактатных биосенсоров на основе данных смесей и, предположительно, сдвиг диапазона определяемых концентраций в область высоких значений.

8.4. Линейные сканирования двух ферментсодержащих мембран в растворах лактата

Для подтверждения гипотезы о сдвиге диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений при использовании смешанных силоксан-ПФС мембран были проведены линейные СЭХМ-сканирования проб ЛОД в растворах лактата. На единой подложке из ПЭТФ с графитовой пастой были нанесены две ферментсодержащие мембраны: силоксановая (1.5% силоксана в смеси) и смешанная (1.5% силоксана и 0.75% ПФС в смеси). Сначала проводили линейное сканирование проб в растворе 0.5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0), далее раствор аккуратно сливали, чтобы не произошло смещение зонда и повторяли сканирование в растворе 5 мМ, а после чего в 50 мМ лактата. Результаты трех совмещенных линейных сканирований приведены на рис. 59.

Как отчетливо видно на рис. 59, увеличение концентрации лактата в системе не дает существенного увеличения сигнала при иммобилизации фермента в силоксановую мембрану. Полученный результат подтверждается ранними исследованиями (§ 7), так как диапазон определяемых концентраций лактата при тестировании биосенсоров с силоксановыми мембранами составляет $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М и, дальнейшее увеличение концентрации лактата не дает увеличения сигнала. Однако при иммобилизации фермента в смешанную мембрану наблюдается возрастание отклика при увеличении концентрации лактата в системе, что говорит о том, что при использовании данной смеси для иммобилизации фермента при разработке биосенсора будет происходить расширение диапазона определяемых концентраций в область высоких значений.

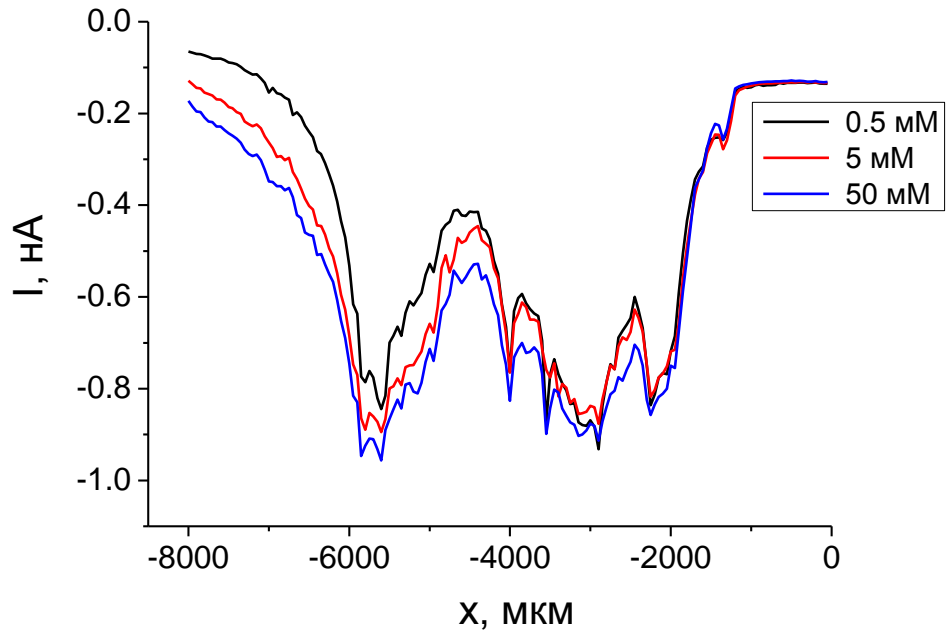


Рис. 59. Линейные сканирования двух ферментсодержащих мембран в растворах 0.5, 5 и 50 М лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -60$ мкм, потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации ЛОД содержала: слева - 1.5% силоксана и 0.75% ПФС, справа - 1.5% силоксана.

Таким образом, иммобилизация лактатоксидазы в смешанные мембраны силоксан-ПФС может использоваться с целью смещения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений при создании биосенсоров.

8.5. Сканирование четырех проб лактатоксидазы в смешанных мембранах методом сканирующей электрохимической микроскопии

Для изучения ферментативной активности ЛОД при иммобилизации в смеси силоксан-ПФС, мембраны были нанесены на единую подложку из ПЭТФ с графитовой пастой для проведения эксперимента на сканирующем электрохимическом микроскопе. Используемые смеси для иммобилизации фермента содержали: 0.4% силоксана и 0.2% ПФС, 1% силоксана и 0.5% ПФС, 1% силоксана и 1% ПФС и последняя: 0.4% силоксана и 0.6% ПФС. Кривая приближения зонда приведена на рис. 60.

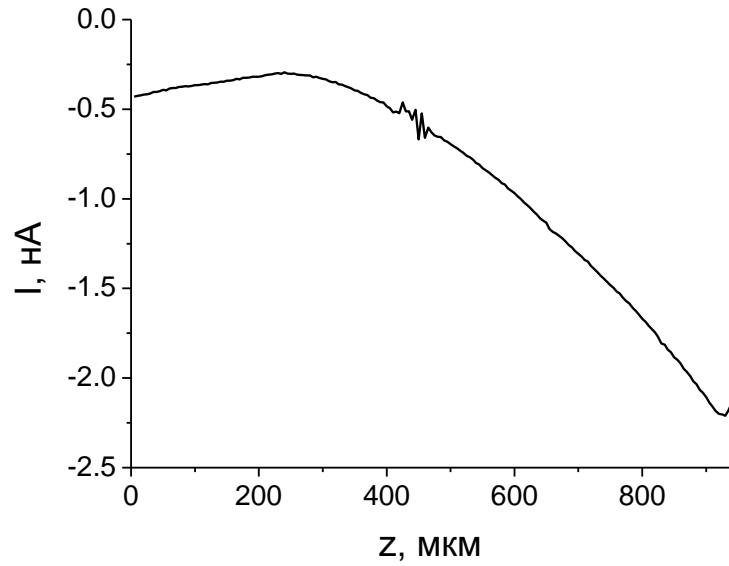


Рис. 60. Кривая приближения зонда в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (по оси абсцисс отложено расстояние, пройденное зондом, по оси ординат – ток). Скорость 1 мкм/с, шаг 0.5 мкм, потенциал 0.00 В.

На кривой приближения (рис. 60) видно увеличение катодного тока от 300 до 900 мкм по оси Z, после чего наблюдается точка перегиба, соответствующая расстоянию, на котором микроэлектрод коснулся поверхности, далее зонд начинает изгибаться, что обуславливает последующее уменьшение тока.

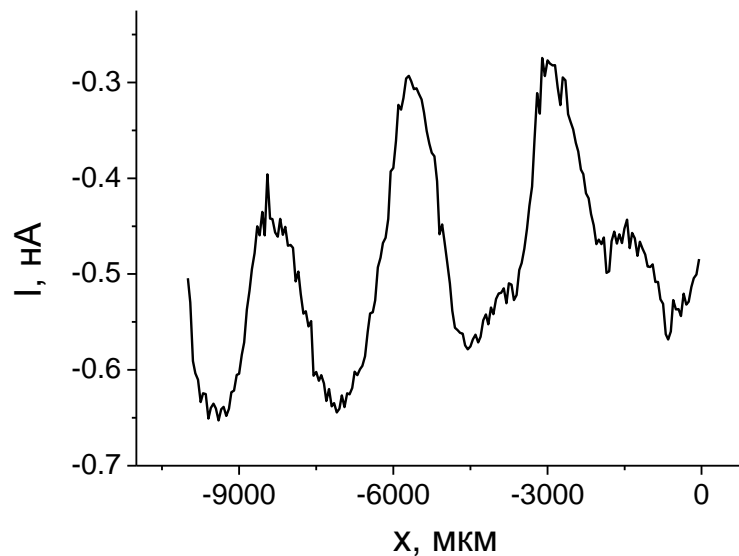


Рис. 61. Линейное сканирование четырех ферментсодержащих мембран в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм, $h_p = -100$ мкм,

потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала (слева направо): 0.4% силоксана и 0.2% ПФС, 1% силоксана и 0.5% ПФС, 1% силоксана и 1% ПФС и последняя: 0.4% силоксана и 0.6% ПФС.

Линейное сканирование подложки с нанесенными ферментсодержащими мембранами отчетливо демонстрирует увеличение катодного тока при прохождении вдоль капель (рис. 61).

Подложка с нанесенными ферментсодержащими мембранами находилась в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе для последующего сканирования электрохимической активности поверхности в режиме коллекции-генерации, была выбрана область размером 11.0x1.2 мм. Для амперометрической детекции был установлен рабочий потенциал 0.00 В, скорость линейного сканирования 50 мкм/с, шаг по оси X 50 мкм, расстояние между областями линейного сканирования было установлено в 50 мкм, что соответствует приблизительной ширине электрода.

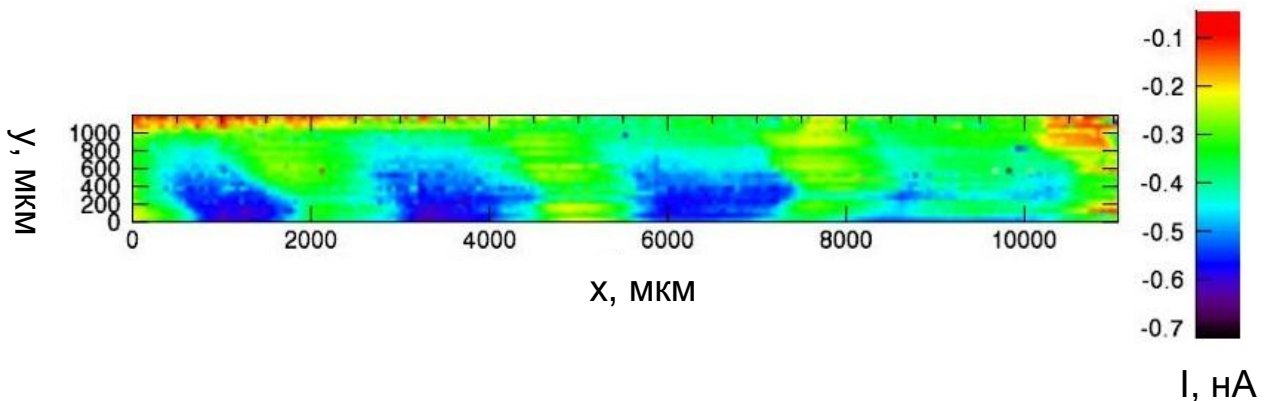


Рис. 62. СЭХМ-изображение четырех ферментсодержащих мембран в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе; скорость 50 мкм/с, шаг по X 50 мкм, шаг по Y 50 мкм, $h_p = -100$ мкм, потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала (слева направо): 0.4% силоксана и 0.2% ПФС, 1% силоксана и 0.5% ПФС, 1% силоксана и 1% ПФС и последняя: 0.4% силоксана и 0.6% ПФС.

На рис. 62 видно, что первые три пробы демонстрируют приблизительно одинаковый сигнал, то есть наблюдаются близкие значения ферментативной активности и, как следствие, чувствительности лактатных биосенсоров при использовании данных иммобилизующих смесей. Однако наблюдается очень слабый сигнал от мембраны с использованием смеси для иммобилизации 0.4%

силоксана и 0.6% ПФС. Это можно объяснить тем, что соотношение силоксана и ПФС в данном случае сдвинуто в сторону ПФС, что значительно понижает сродство фермента к субстрату и, как следствие, ферментативную активность.

Таким образом, из данных СЭХМ можно сделать вывод, что в зависимости от соотношения силоксана и перфторсульфонируемого полимера в иммобилизующей смеси меняется сродство фермента к субстрату и, как следствие, изменяются ферментативная активность и аналитические характеристики лактатных биосенсоров на основе данных смесей для иммобилизации лактатоксидазы.

8.6. Использование смешанных мембран для иммобилизации лактатоксидазы при создании лактатных биосенсоров

Кажущаяся константа Михаэлиса K_m характеризует сродство фермента к субстрату: чем меньше значение константы, тем сильнее связывание фермента с субстратом [202-207]. Как уже было описано в § 7.4, кинетика большинства ферментативных реакций может быть формально описана при помощи уравнения Михаэлиса-Мэнтен, а кажущаяся константа Михаэлиса K_m может использоваться для оценки верхней границы диапазона определяемых концентраций биосенсора. Константа Михаэлиса ЛОД при иммобилизации в благоприятные электронейтральные для фермента мембраны силоксана может варьироваться от 0.24 (при содержании силоксана в смеси - 1.8%) до 0.62 мМ (0.1% силоксана) как было описано в § 7.4. Однако, при иммобилизации фермента в смешанные мембраны, значение K_m может увеличиваться вплоть до 10 мМ, то есть возрастать в 30 раз, что говорит о существенном понижении сродства фермента к субстрату. На рис. 63 показана зависимость плотности тока от концентрации лактата при иммобилизации фермента в силоксановую мембрану (левая ветвь), при этом $K_{m1} = 0.24$ мМ и смешанную (правая ветвь), когда $K_{m2} = 9$ мМ. Видно, что диапазон определяемых концентраций лактата при использовании смешанных мембран сдвигается в область высоких значений на два порядка. Эмпирические данные хорошо ложатся на гиперболу, расчет константы происходил исходя из уравнения гиперболы, которое имеет вид:

$$j = \frac{J \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

где K_M – кажущаяся константа Михаэлиса, J – максимальное значение плотности тока, а $[S]$ – концентрация лактата.

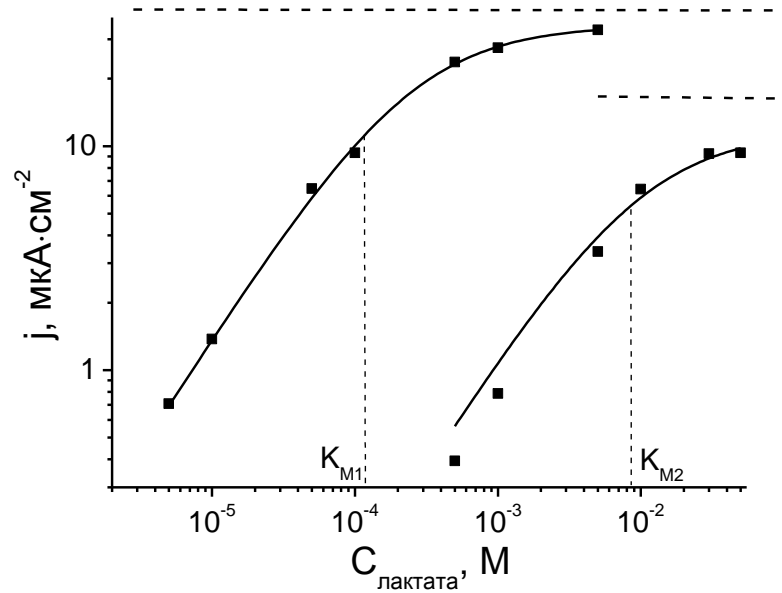


Рис. 63. Сравнительный график, демонстрирующий разницу в значениях кажущейся константы Михаэлиса фермента, при иммобилизации в смешанную (K_{M2}) и силиконовую (K_{M1}) мембрану.

При создании биосенсоров варьировали содержание силиксана и ПФС в иммобилизующей смеси для фермента: силиксана от 0.01 до 5.00 об.%, ПФС от 0.10 до 8.50 об.%. При тестировании биосенсоров было выявлено, что искомый диапазон определяемых концентраций лактата от 0.1 до 50, а в некоторых случаях даже до 80 мМ в batch-режиме, а вместе с тем максимальные значения константы Михаэлиса наблюдается при определенных соотношениях силиксан:ПФС в иммобилизующей смеси (рис. 64). Аналитические характеристики биосенсоров приведены в табл. 8, жирным шрифтом выделены характеристики датчиков, представляющих наибольший интерес за счет достижения максимального сдвига диапазона определяемых концентраций лактата. На рис. 64 приведена диаграмма зависимости кажущейся константы Михаэлиса от содержания силиксана и ПФС в иммобилизующей смеси.

Таблица 8. Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата на основе смешанных мембран γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера в batch-режиме ($n = 5, P = 0.95$)

Содержание силоксана в смеси, %	Содержание ПФС в смеси, %	Линейный диапазон концентраций, М	c_{max} , мМ	S , $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$	K_M , мМ
1	2	3	4	5	6
0.20	0.10	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	13 ± 3	1.4 ± 0.5
0.20	0.30	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	10-50	5 ± 1	2.8 ± 0.6
0.30	0.10	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	5	110 ± 20	0.3 ± 0.1
0.30	0.15	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	10	20 ± 6	1.2 ± 0.4
0.30	0.30	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	66 ± 23	1.5 ± 1.0
0.30	0.40	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	27 ± 9	1.3 ± 0.9
0.40	0.15	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	30 ± 8	0.6 ± 0.3
0.40	0.20	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	50	0.7 ± 0.2	2 ± 1
0.40	0.30	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	4 ± 1	1.6 ± 0.8
0.40	0.40	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	12 ± 5	1.3 ± 0.9
0.40	0.50	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	48 ± 12	0.4 ± 0.2
0.40	0.60	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	11 ± 5	1.5 ± 0.4
0.50	0.25	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	110 ± 26	0.4 ± 0.2
0.50	0.30	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	30	9 ± 5	1.3 ± 0.8
0.50	0.40	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	21 ± 7	0.9 ± 0.4
0.60	0.30	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	27 ± 8	0.8 ± 0.2
0.60	0.40	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	12 ± 4	0.7 ± 0.3
0.60	0.90	$5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	10	3 ± 1	1.3 ± 0.4
0.80	0.40	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	10	61 ± 5	0.6 ± 0.2
0.80	0.50	$5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30	20 ± 12	1.5 ± 1.2
0.90	0.45	$5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	10	4 ± 2	0.9 ± 0.3
0.90	0.60	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	30	10 ± 5	2 ± 1
0.90	0.70	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	18 ± 5	0.7 ± 0.3
0.90	0.80	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	16 ± 5	1.1 ± 0.5

<i>Продолжение таблицы 7</i>					
1	2	3	4	5	6
0.90	0.90	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.2
1.00	0.40	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	52 ± 10	0.4 ± 0.1
1.00	0.50	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	30	13 ± 9	2 ± 1
1.00	0.60	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	38 ± 11	0.6 ± 0.3
1.00	0.70	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	24 ± 9	0.9 ± 0.4
1.00	0.80	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	10 ± 6	0.9 ± 0.3
1.00	0.90	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	10	16 ± 6	1.4 ± 0.6
1.00	1.00	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	17 ± 9	2 ± 1
1.00	1.20	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	1.1 ± 0.5	3 ± 2
1.00	1.50	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	4 ± 2	0.6 ± 0.4
1.00	3.00	-	-	-	-
1.10	0.70	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	8 ± 4	2 ± 1
1.20	0.40	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	2 ± 1	0.4 ± 0.1
1.20	0.70	$5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	10	5 ± 4	1.1 ± 0.5
1.20	1.00	-	-	-	-
1.20	1.20	-	-	-	-
1.40	0.70	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	1.2 ± 0.5	0.4 ± 0.1
1.50	1.50	$5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	10	0.8 ± 0.3	2 ± 1
1.50	2.00	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	1.1 ± 0.9	3 ± 1
1.50	2.50	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	1.8 ± 0.2	4 ± 2
1.50	3.00	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	30	0.6 ± 0.3	4 ± 2
1.50	3.50	-	-	-	-
1.80	0.60	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
1.80	0.90	$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	16 ± 7	0.4 ± 0.1
1.80	1.00	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	17 ± 9	1.1 ± 0.5
1.80	1.20	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	15 ± 6	1.1 ± 0.5
2.00	1.00	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	10	10 ± 6	0.4 ± 0.1
2.00	1.20	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	53 ± 11	0.4 ± 0.1
2.00	1.50	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	5	5 ± 1	1.2 ± 0.6
2.00	3.00	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	50	0.4 ± 0.2	4 ± 2

<i>Продолжение таблицы 7</i>					
1	2	3	4	5	6
2.60	1.50	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	5	3 ± 1	0.7 ± 0.2
2.60	3.00	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	5	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.3
2.6	4.00	-	-	-	-
3.00	5.00	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	50-80	1.2 ± 0.5	10 ± 3
3.00	5.50	-	-	-	-
4.00	6.50	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	1.9 ± 0.4	4 ± 3
5.00	8.50	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	10	2 ± 1	1.7 ± 0.2

Примечания:

«-» отклика не наблюдалось.

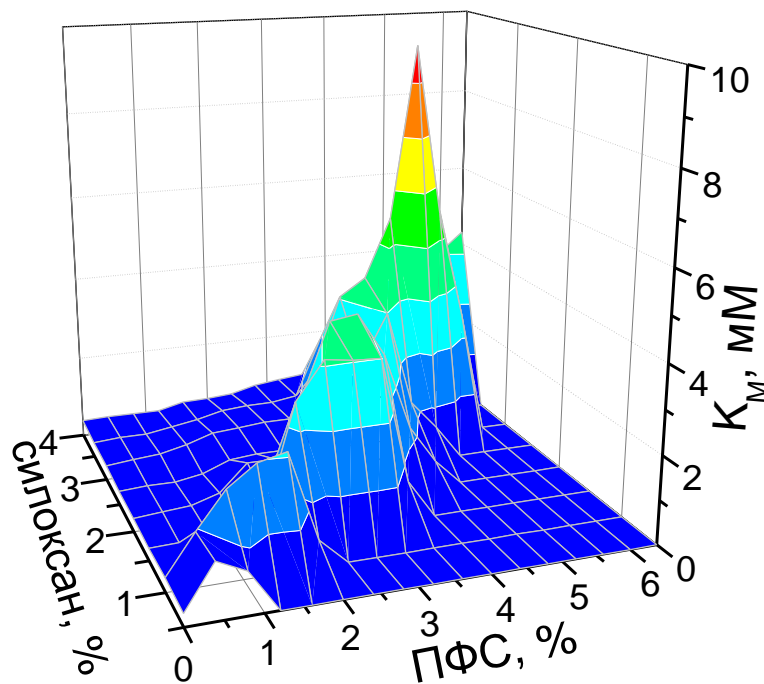


Рис. 64. Трехмерная диаграмма зависимости константы Михаэлиса от содержания силоксана и перфторсульфонируемого полимера в иммобилизующей смеси для лактатоксидазы при создании лактатных биосенсоров.

Зависимость кажущейся константы Михаэлиса от содержания силоксана и ПФС в иммобилизующей смеси представляет собой подобие горного хребта, максимумы наблюдаются при определенных соотношениях силоксан:ПФС, на

начальном участке 2:1, далее 1:1, а ближе к концу 2:3. На рис. 64 синим цветом показаны низкие значения K_m . При высоких содержаниях ПФС и низких – силоксана наблюдается деактивация ЛОД по причине блокирования фермента отрицательным зарядом ПФС. При высоких содержаниях силоксана и низких – ПФС маленькие значения K_m объясняются высоким сродством фермента к субстрату, так как силоксан образует благоприятную электронейтральную среду для фермента. При определенных соотношениях силоксан:ПФС происходит значительное понижение аффинности и увеличение кажущейся константы Михаэлиса в 30 раз по сравнению с электронейтральными силоксановыми мембранами. Абсолютный максимум значения константы наблюдается при использовании смеси 3 % силоксана и 5 % ПФС, кажущаяся константа Михаэлиса фермента в таком случае достигает 10 мМ. Как ожидалось, диапазон определяемых концентраций лактата при использовании биосенсора на основе данной мембраны сдвинут в область высоких значений и составляет в batch-режиме 0.1 - 80 мМ (табл. 8), что полностью покрывает физиологическое содержание лактата в поте.

Таким образом, при иммобилизации лактатоксидазы в смешанные мембраны силоксана и перфторсульфонируемого полимера наблюдается понижение сродства фермента к субстрату и значительное увеличение кажущейся константы Михаэлиса вплоть до 10 мМ и, благодаря этому, сдвиг диапазона определяемых концентраций на два порядка в область высоких значений.

8.7. Аналитические характеристики биосенсора для определения высоких содержаний лактата

Отклик биосенсора на основе смешанной мембраны (3 % силоксана и 5 % ПФС) при определении лактата в batch-режиме представлен на рис. 65, наблюдаются маленькие значения фоновых токов, первая определяемая концентрация четко различима. Видно, что отклик стабилен, значения тока не уменьшаются, а даже немного растут со временем, а также видны требуемые соотношения между исследуемыми концентрациями. Биосенсор тестировали с использованием модельных растворов лактата трехкратно, на основании чего строили градуировочную зависимость, которая приведена на рис. 66.

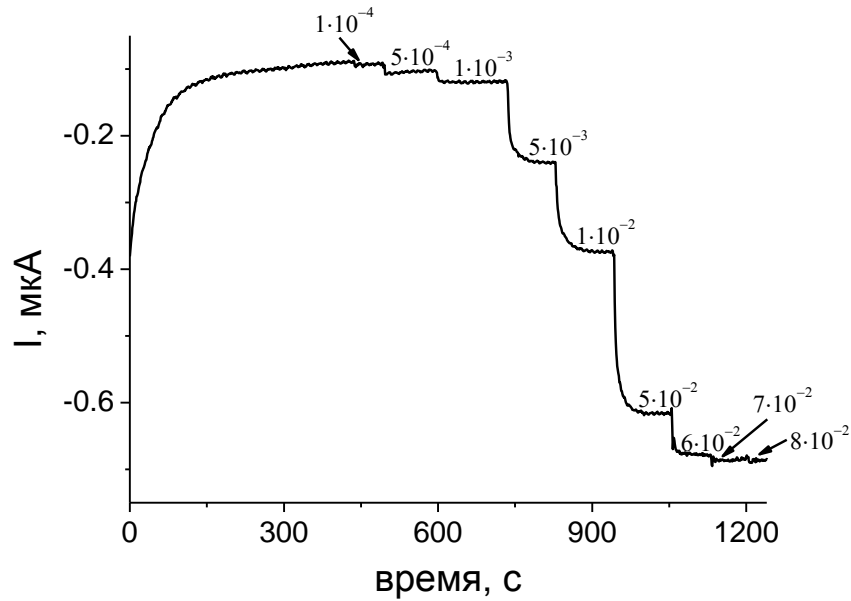


Рис. 65. Отклик биосенсора при определении лактата в batch-режиме при построении градуировочной зависимости. Смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% перфторсульфонируемого полимера. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

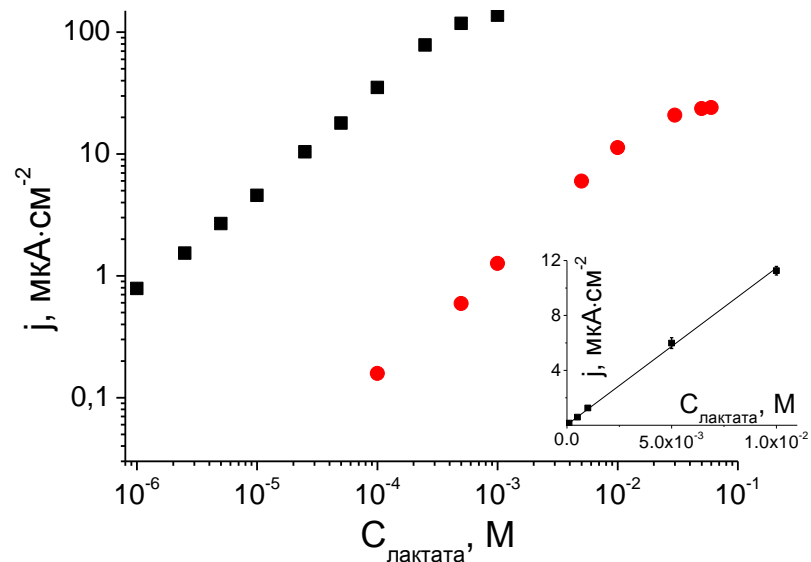


Рис. 66. Градуировочные графики для определения лактата в batch-режиме при постоянном перемешивании. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала: ■ - 1.5% силоксана, ● - 3% силоксана и 5% перфторсульфонируемого полимера ($n = 3$, $P = 0.95$).

На рис. 66 красным цветом приведен градуировочный график разработанного биосенсора на лактат, для примера черным цветом показана градуировочная зависимость лактатного биосенсора с силиконовой мембраной. Видно, что произошел сдвиг диапазона определяемых концентраций лактата на два порядка относительно биосенсора на основе электронейтральных силиконовых мембран. Эмпирические данные представляют собой ветвь гиперболы, на вставке показана начальная часть градуировочной зависимости для биосенсора, с составом иммобилизующей смеси 3% силиксана и 5% ПФС, которая хорошо описывается линейной функцией.

Диапазон определяемых концентраций лактата в batch-режиме составляет почти 3 порядка от $1 \cdot 10^{-4}$ до $8 \cdot 10^{-2}$ М, предел обнаружения - $7 \cdot 10^{-5}$ М лактата, время отклика 60 с. Коэффициент чувствительности биосенсора, измеряемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, равен $1.13 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Стоит заметить, что K_m составляет 10.4 мМ, то есть константа увеличилась в 30 раз за счет использования смешанных мембран для иммобилизации фермента.

Второй субстрат ферментативной реакции – кислород, как известно, концентрация молекулярного кислорода в буферном растворе при нормальных условиях составляет 0.25 мМ, то есть, определение лактата выше данной концентрации затрудняется, тем не менее, в данной работе удалось достигнуть содержания в 80 мМ в batch-режиме. В проточно-инжекционном анализе происходит непрерывное обогащение системы кислородом за счет постоянного прокачивания раствора буфера через ячейку, в системе ПИА диапазон определяемых концентраций шире. Разработанный биосенсор был протестирован в системе ПИА и продемонстрировал диапазон определяемых концентраций лактата почти 5 порядков $1 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-1}$ М, предел обнаружения - $1 \cdot 10^{-5}$ М лактата, коэффициент чувствительности $0.77 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, максимальное время отклика – 2 мин. Как видно на рис. 67, наблюдается ровный стабильный фоновый отклик с маленькими значениями токов. Отчетливо видны требуемые соотношения между исследуемыми концентрациями, что наглядно показано на градуировочном графике на рис. 68.

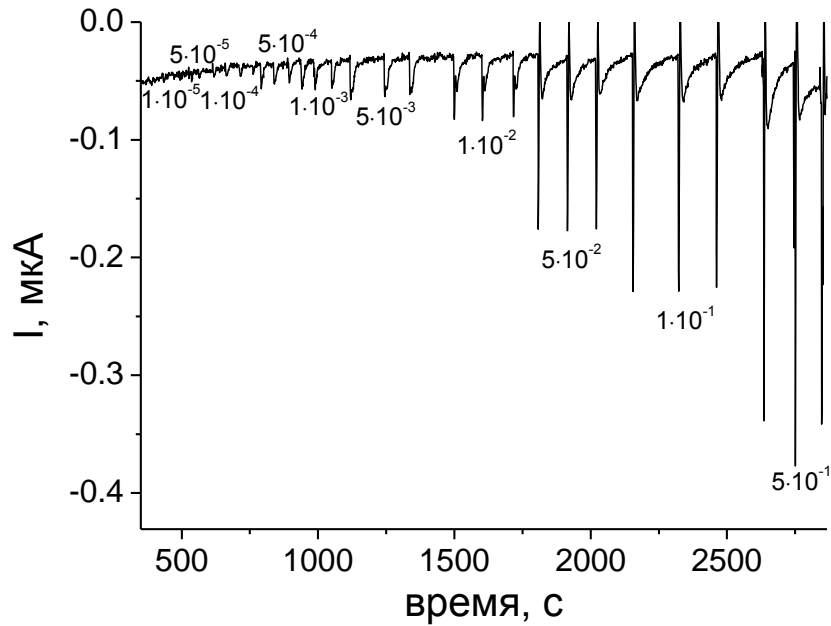


Рис. 67. Отклик биосенсора при определении лактата в системе проточно-инжекционного анализа. Смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% перфторсульфонируемого полимера. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

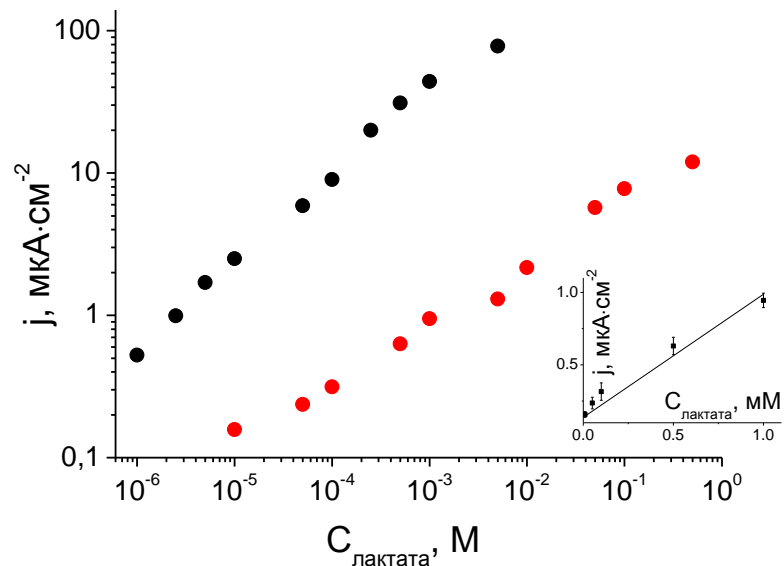


Рис. 68. Градуировочные графики для определения лактата в системе ПИА. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала: ■ - 1.5% силоксана, ● - 3 % силоксана и 5% перфторсульфонируемого полимера ($n = 3$, $P = 0.95$).

Градуировочный график разработанного биосенсора на лактат представлен на рис. 68 красным цветом, черным цветом приведена градуировочная зависимость для биосенсора на основе силиконовой мембраны. На вставке - начальная часть градуировочной зависимости для биосенсора со смешанной мембраной. Видно, что диапазон определяемых концентраций лактата сдвинут в область высоких значений на два порядка и увеличен на один порядок относительно биосенсора на основе силиконовой мембраны.

Для определения операционной стабильности биосенсора были проведены эксперименты в batch-режиме при постоянном перемешивании в растворе 2.5 мМ лактата, что является довольно жесткими условиями, так как продукт восстановления H_2O_2 – гидроксил-ионы – растворяют берлинскую лазурь [200], и чем концентрированнее раствор лактата, тем больше образуется пероксида водорода, и тем быстрее смывается покрытие пленок БЛ. Как видно на рис. 69, первые 3 ч работы биосенсор сохраняет 100% отклика, далее, в течение следующих 5 ч, сенсор теряет около 10% от первоначального сигнала в час. Потеря половины сигнала от первоначальной активности наблюдается только спустя 9 ч непрерывной работы, что представляет собой очень высокую операционную стабильность, даже в сравнении с биосенсорами на основе силиконовых мембран, где наиболее стабильный датчик терял 50% отклика спустя 5 ч работы. Таким образом, стабильность биосенсора улучшена вдвое, что позволяет проводить длительные эксперименты без потери активности. Данный факт заслуживает внимания, так как при создании данного биосенсора удалось добиться значительного понижения аффинности фермента к субстрату, что подразумевает ухудшение аналитических характеристик, однако в нашем случае биосенсор демонстрирует не только расширение диапазона определяемых концентраций лактата, но и повышение операционной стабильности.

Профессиональные высокоинтенсивные физические нагрузки, в процессе которых необходимо измерять лактат, занимают 2 - 3 часа, таким образом, с помощью разработанного биосенсора можно непрерывно мониторировать аналит без какой-либо потери значения отклика.

Также была протестирована стабильность биосенсора при хранении, для этого запечатанные в конверты образцы хранились 3 мес в холодильной камере при

+4°C. Градуировочная зависимость биосенсора для определения лактата в batch-режиме приведена на рис. 70, на вставке показана начальная часть графика, по которой рассчитывался коэффициент чувствительности датчика.

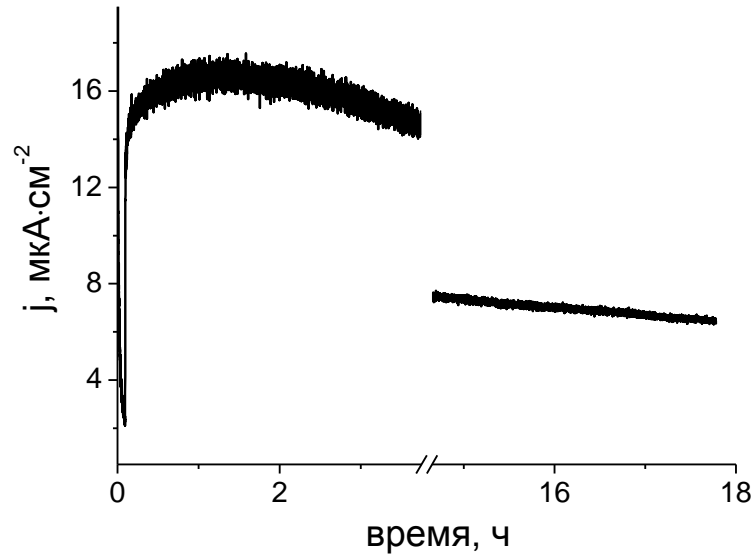


Рис. 69. Операционная стабильность биосенсора при определении лактата в batch-режиме при постоянном перемешивании раствора 2.5 мМ лактата (смесь для иммобилизации содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (pH 6.0), потенциал 0.00 В.

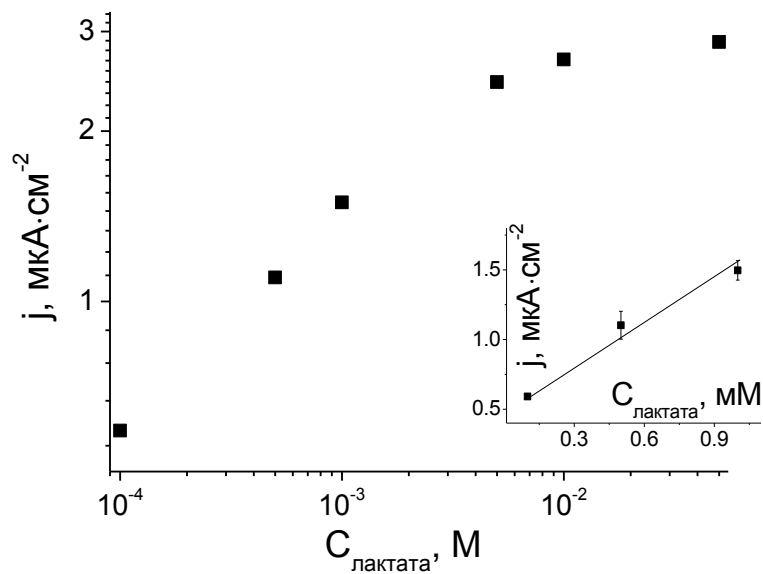


Рис. 70. Градуировочный график для определения лактата в batch-режиме при перемешивании с помощью биосенсора после хранения датчика в течение 3 мес

(смесь для иммобилизации содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В, ($n = 3$, $P = 0.95$).

Коэффициент чувствительности биосенсоров после длительного хранения, рассчитанный как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, составил $1.0 \pm 0.5 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 3$, $P = 0.95$), а диапазон определяемых концентраций лактата в batch-режиме почти три порядка от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-2}$ М. Из чего можно сделать вывод, что даже спустя 3 мес хранения биосенсоры стабильно работают и не теряют чувствительности. Данный факт представляет большой интерес, особенно ввиду того, что фермент лактатоксидаза является одной из наиболее лабильных оксидаз и создание условий для длительного сохранения ее активности является сложной задачей, особенно с учетом того, что было достигнуто значительное понижение сродства фермента к субстрату. Однако в нашем случае сохраняется широкий диапазон определяемых концентраций лактата, высокая чувствительность и длительная операционная стабильность и стабильность при хранении.

Таким образом, путем понижения сродства фермента к субстрату, удалось достичь сдвига диапазона определяемых концентраций лактатного биосенсора в область высоких значений. Создан лактатный биосенсор, характеризующийся диапазоном определяемых концентраций почти 5 порядков, высокой чувствительностью и длительной операционной стабильностью. Первые 3 ч измерений биосенсор стабильно работает и сохраняет первоначальное значение отклика, при хранении биосенсор не теряет чувствительности в течение, по крайней мере, 3 мес. Совокупность всех вышеперечисленных характеристик позволяет использовать созданный биосенсор для анализа неразбавленного пота и создания неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Глава 9. Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии

9.1. Модельная проточная тонкослойная ячейка со встроенным биосенсором для определения лактата

Неинвазивное определение лактата предусматривало создание монитора, фиксируемого на поверхности кожи, проводящего всасывание выделяемого пота и непрерывное определение лактата в нем. Для этого было необходимо создать ячейку со встроенным лактатным биосенсором на высокие (миллимолярные) концентрации лактата. Так как количество выделяемого пота обычно крайне мало, то была поставлена задача разработать систему для анализа малых объемов пробы, для чего на поверхности лактатного биосенсора был сконструирован капилляр.

При первоначальном рассмотрении была создана ячейка, моделирующая неинвазивный монитор, проводящая измерения в системе проточно-инжекционного анализа. Для активации выделения пота у добровольцев в состоянии покоя использовался электрофорез с пилокарпином, при физической нагрузке пот выделялся самопроизвольно. Для сбора пота с целью анализа в модельной ячейке использовался коммерчески доступный потосборник Macroduct, приведенный на рис. 71. Потосборник прикладывали к поверхности кожи (обычно на ноге или руке добровольца в области работающей мышцы) и крепили эластичным жгутом, после чего в течение 20 – 50 мин производилось всасывание пота в капилляр, а затем жидкость извлекали при помощи пипетки.



Рис. 71. Коммерчески доступный потосборник Macroduct.

Потосборник с одной стороны содержит длинный капилляр, а с другой небольшое конусообразное углубление, которое при сборе пота прилегает к поверхности кожи и пот самопроизвольно всасывается в капилляр. Конструкция системы сбора пота Macroduct запатентована в США и в Англии. Потосборник используется для сбора пота у новорожденных при диагностике врожденного заболевания муковисцидоза (кистозного фиброза) по проводимости.

Прототип монитора для анализа пота представлял собой параллелепипед из органического стекла с отверстием для штутсера, переходящим в тонкий капилляр, как видно на рис. 72. Встроенный в модельную ячейку биосенсор представлял собой планарный электрод, модифицированный БЛ с иммобилизованным ферментом ЛОД в смешанную мембрану (смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% ПФС), как обладающий наиболее широким диапазоном определяемых концентраций лактата вплоть до 0.5 М в системе ПИА и длительной операционной стабильностью по итогам § 8.

Биосенсор приклеивали к ячейке таким образом, чтобы незаклеенная поверхность содержала часть вспомогательного электрода, рабочего и электрода сравнения, как показано на рис. 73, оставшуюся липкую часть ячейки герметично заклеивали пластиком, края обрабатывали герметиком и высушивали. После того, как герметик высыхал, систему подключали с одной стороны к перистальтическому насосу, а с другой к потенциостату и проводили измерение, фотография ячейки в процессе работы приведена на рис. 74.

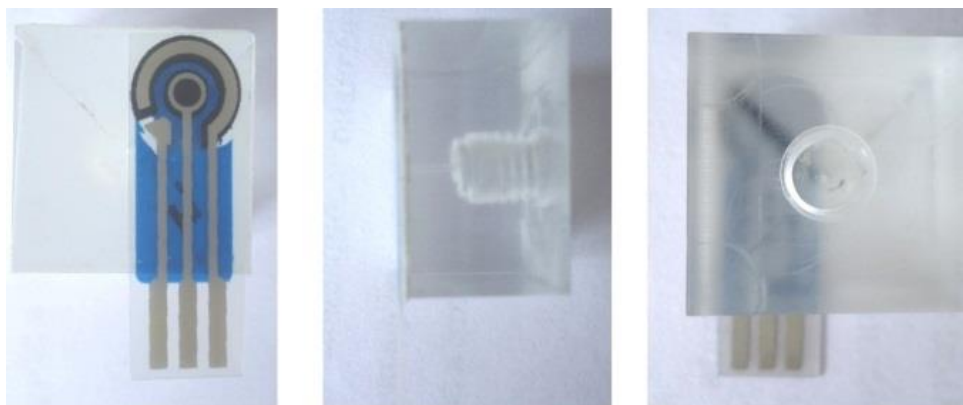


Рис. 72. Фотография модельной тонкослойной ячейки со встроенным биосенсором для определения лактата.

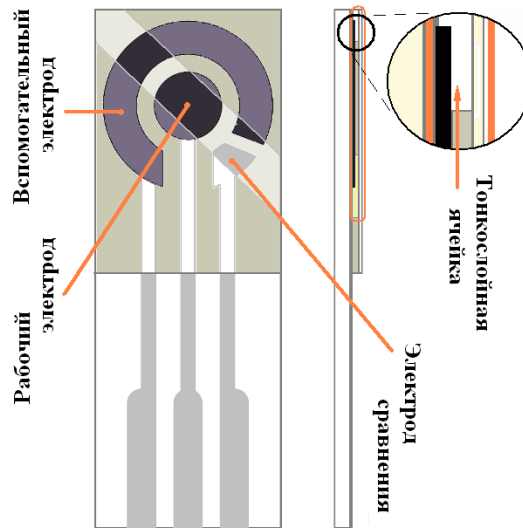


Рис. 73. Схема тонкослойной ячейки.



Рис. 74. Фотография модельной проточной тонкослойной ячейки в процессе измерения.

Для построения градуировочной зависимости через перистальтический насос прокачивали буферный раствор (рН 6.0) и ждали выхода на стационарный уровень. Далее, после установления фонового значения тока, прокачиваемый раствор меняли на лактат $1 \cdot 10^{-4}$ М, приготовленный с использованием буферного раствора (рН 6.0), затем $5 \cdot 10^{-4}$ М и так далее до 0.1 М раствора. Отклик биосенсора приведен на рис. 75, видны маленькие значения фоновых токов, первая определяемая концентрация четко различима. Наблюдается стабильность отклика, значения тока не уменьшаются, а даже немного растут со временем. Отклик биосенсора с

использованием модельных растворов лактата повторяли трехкратно, на основании чего строили градуировочную зависимость. Как видно на градуировочном графике на рис. 76, наблюдаются требуемые соотношения между исследуемыми концентрациями лактата.

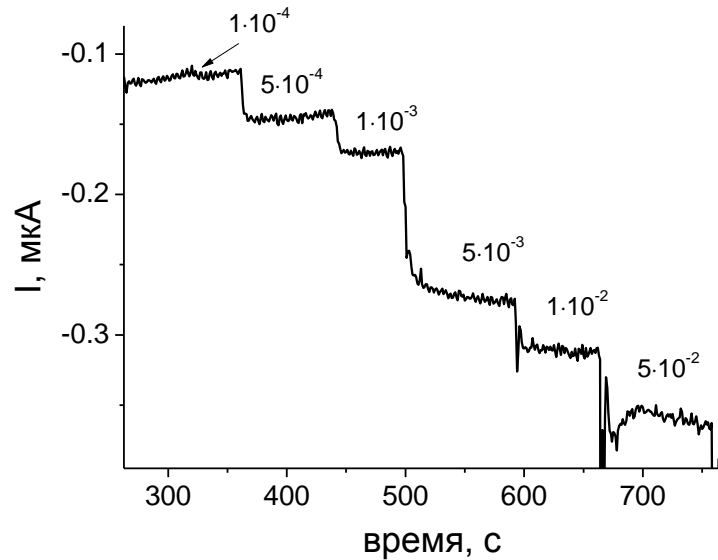


Рис. 75. Отклик биосенсора при определении лактата в модельной проточной ячейке (смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

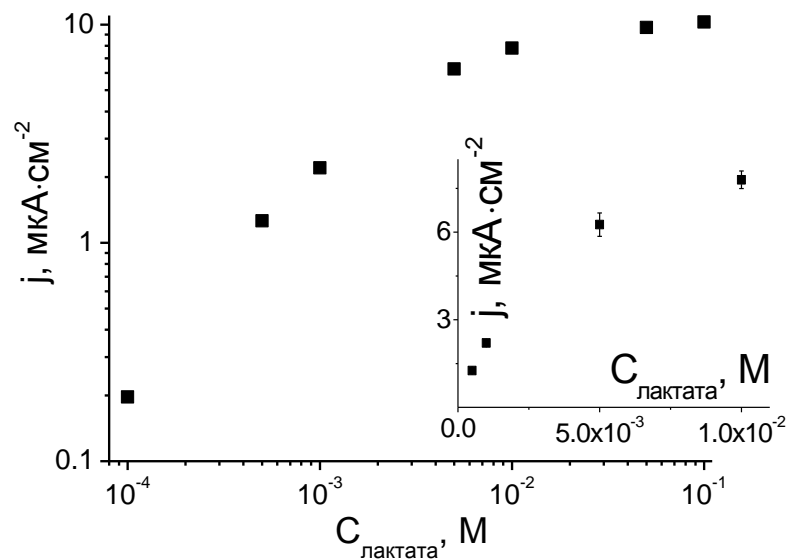


Рис. 76. Градуировочный график для определения лактата в модельной проточной ячейке (смесь для иммобилизации содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В, ($n = 3$, $P = 0.95$).

В модельной проточной ячейке биосенсор продемонстрировал аналитические характеристики, не уступающие стандартной амперометрической ячейке (§ 8.7). Диапазон определяемых концентраций лактата составил $1 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ М, коэффициент чувствительности $0.8 \pm 0.3 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 3$, $P = 0.95$). Прототип монитора для определения лактата в поте довольно прост в использовании, с помощью него были проведены измерения лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке у добровольцев, результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9. Концентрация лактата в отобранных образцах пота ($n = 2$, $P = 0.95$)

Состояние	Образец	C(лактата), mM
В состоянии покоя	1	8 ± 2
	2	16 ± 2
	3	13 ± 3
В процессе физической нагрузки	4	52 ± 5
	5	18 ± 2
	6	38 ± 2

Полученные результаты по концентрации лактата в поте в состоянии покоя и в процессе тренировок полностью согласуются с литературными данными [11, 84-87].

Таким образом, путем интеграции лактатного биосенсора и тонкослойной ячейки, был разработан прототип неинвазивного монитора. Продемонстрирован широкий диапазон определяемых концентраций лактата, достаточный для определения лактата в поте не только в состоянии покоя, но и в процессе физических нагрузок. Прототип апробирован для определения лактата в пробах пота, что позволяет его использовать в качестве базы при создании неинвазивного монитора состояния гипоксии.

9.2. Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии

Для разработки неинвазивного монитора состояния гипоксии, проводящего измерения лактата в поте в процессе реального времени, модельная проточная ячейка со встроенным лактатным биосенсором была модифицирована. А именно, в

конструкцию ячейки вместо соединения с системой ПИА было добавлено конусообразное углубление, форма которого была взята с коммерчески доступного потосборника (рис. 71). Сторона ячейки, содержащая конус, была предназначена для непосредственного контакта с поверхностью кожи, всасывания пота и дальнейшего прохождения его по капилляру, как показано на рис. 77. Встроенный в неинвазивный монитор биосенсор представлял собой планарную трехэлектродную структуру с рабочим электродом, модифицированным БЛ с иммобилизованным ферментом ЛОД в смесь, содержащую 3% силоксана и 5% ПФС.

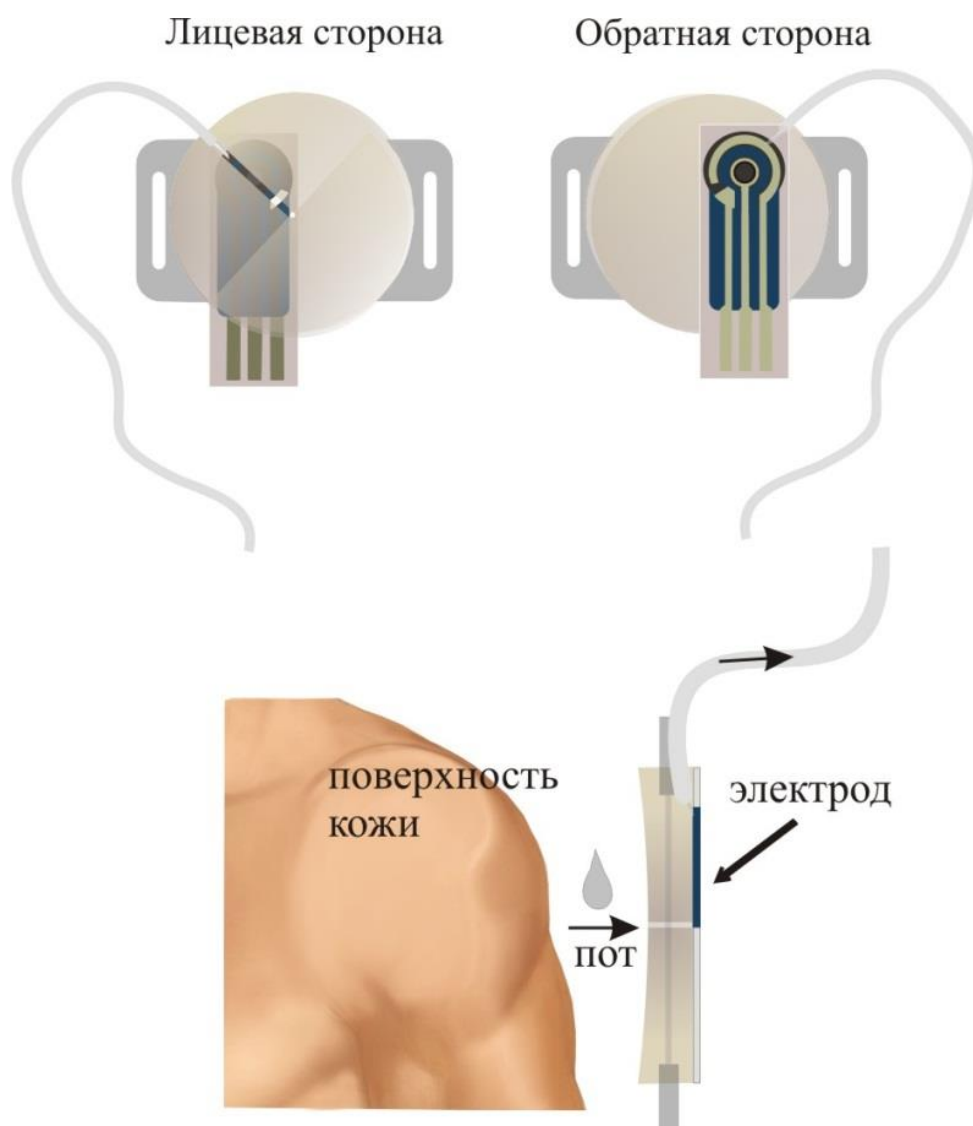


Рис. 77. Схема работы неинвазивного монитора.

Перед измерением пота электрод предварительно градуировали с использованием стандартных растворов лактата. Для выхода на стационарный

уровень в область конусообразного углубления на монитор наносили несколько капель буферного раствора, которые самопроизвольно всасывались и заполняли капилляр, после чего наблюдали фоновые значения токов. Затем наносили растворы лактата, приготовленные с использованием буферного раствора (рН 6.0), иногда требовалось прислонять ячейку к поверхности кожи для лучшего всасывания. Также градуирование проводили вторым способом, для этого после выхода на стационарный уровень для ввода стандартных растворов лактата использовали шприц, очень медленно и аккуратно вводя растворы в капилляр.

На рис. 78 показан отклик биосенсора в системе неинвазивного монитора при построении градуировочной зависимости, наблюдаются маленькие значения фоновых токов, первая определяемая концентрация четко различима и не сливается с базовой линией. Отклик стабилен, значения тока не уменьшаются, а даже немного растут со временем. Отклик биосенсора с использованием модельных растворов лактата воспроизводили трехкратно и, на основании полученных данных, строили градуировочную зависимость (рис. 79).

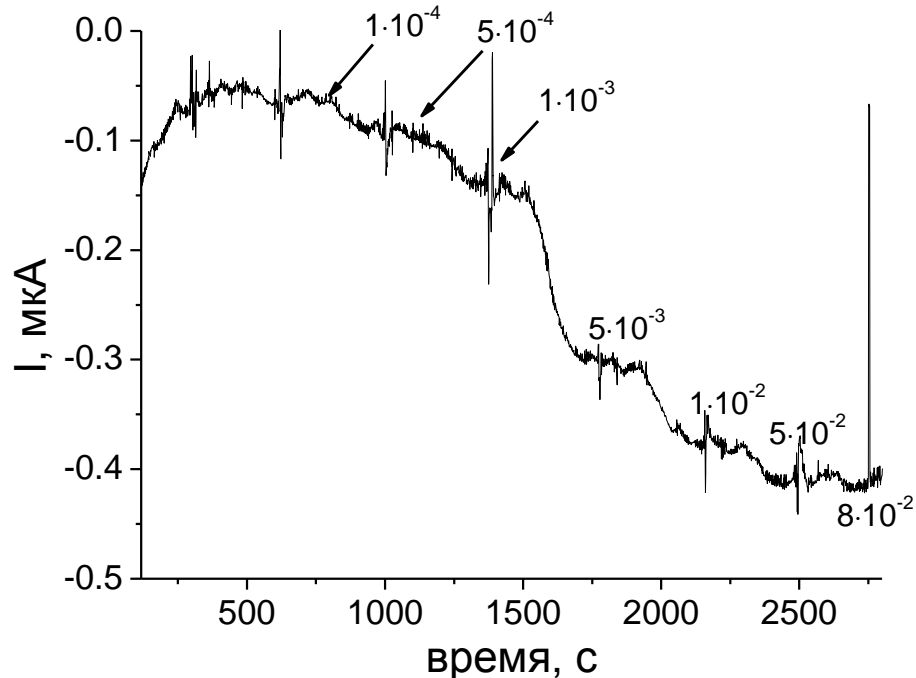


Рис. 78. Отклик биосенсора при определении лактата в системе неинвазивного монитора при построении градуировочной зависимости (смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В.

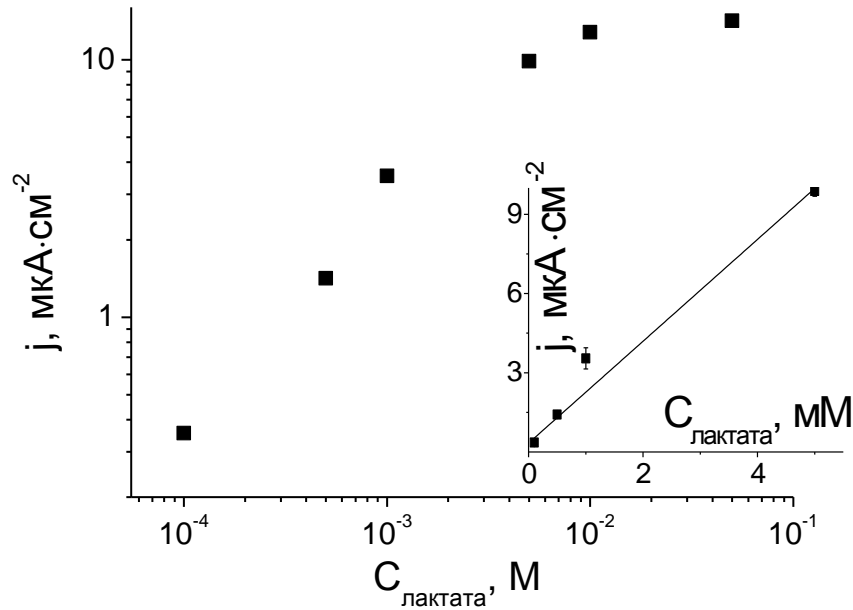


Рис. 79. Градуировочный график для определения лактата в системе неинвазивного монитора (смесь для иммобилизации содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М KH_2PO_4 (рН 6.0), потенциал 0.00 В ($n = 3$, $P = 0.95$).

На градуировочном графике видно, что диапазон определяемых концентраций биосенсора на лактат в системе неинвазивного монитора составил 0.1 – 80 мМ, что полностью покрывает физиологическое содержание лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физических нагрузок. Коэффициент чувствительности биосенсора, определяемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости - $1.6 \pm 0.5 \text{ мА} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ($n = 4$, $P = 0.95$).

После проведения градуировки капилляр промывали избытком воды и сушили в холодильной камере при $+4^\circ\text{C}$.

Таким образом, создан неинвазивный монитор для определения лактата. Диапазон определяемых концентраций лактата полностью покрывает физиологическое содержание аналита в поте, как в состоянии покоя, так и в процессе интенсивных физических нагрузок, а значение чувствительности выше, чем при анализе в batch-режиме и при использовании проточной амперометрической ячейки.

9.3. Непрерывный мониторинг лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки

Для определения лактата в поте в режиме реального времени проводилась активация выделения пота при помощи электрофореза с пилокарпином, если измерения проводились после физической нагрузки, пот выделялся самопроизвольно без использования активации. Стоит отметить, что концентрация лактата в поте может варьироваться в зависимости от скорости потоотделения и типа жидкости. В настоящей работе рассматривались основная и стимулированная потовая жидкость, контроль скорости потоотделения не производился.

Эксперимент начинали с выхода на стационарный уровень, для чего на монитор в область конусообразного отверстия наносили несколько капель буферного раствора (рН 6.0), которые самопроизвольно заполняли капилляр, и ждали выхода на фон, далее монитор прикладывали к месту выделения пота и фиксировали с помощью эластичного жгута. Наблюдался всплеск тока и дальнейший выход на стационарный уровень, соответствующий содержанию лактата в поте, с течением времени уровень сигнала изменялся в большую или меньшую сторону, при уменьшении потока жидкости в капилляре сигнал спадал к минимуму.

Также с помощью монитора регистрировали динамику накопления лактата, в таком случае сухую ячейку прикладывали к месту выделения пота, отклик биосенсора на примере этой системы представлен на рис. 80. Первые несколько секунд наблюдались нулевые значения токов, что объясняется отсутствием раствора в системе. Далее неинвазивный монитор фиксировали на ноге (на заранее активированном месте), при заполнении капилляра потом наблюдается смачивание и поляризация электрода, что объясняет всплеск тока. Менее, чем за минуту система приходит к равновесию и наблюдается выход на стационарный уровень, в течение следующих 180 с наблюдаются значения токов, соответствующие содержанию лактата в поте в состоянии покоя. Далее, в районе 300 – 500 с наблюдаются значения токов, соответствующие содержанию лактата в поте в условиях небольшой физической активности.

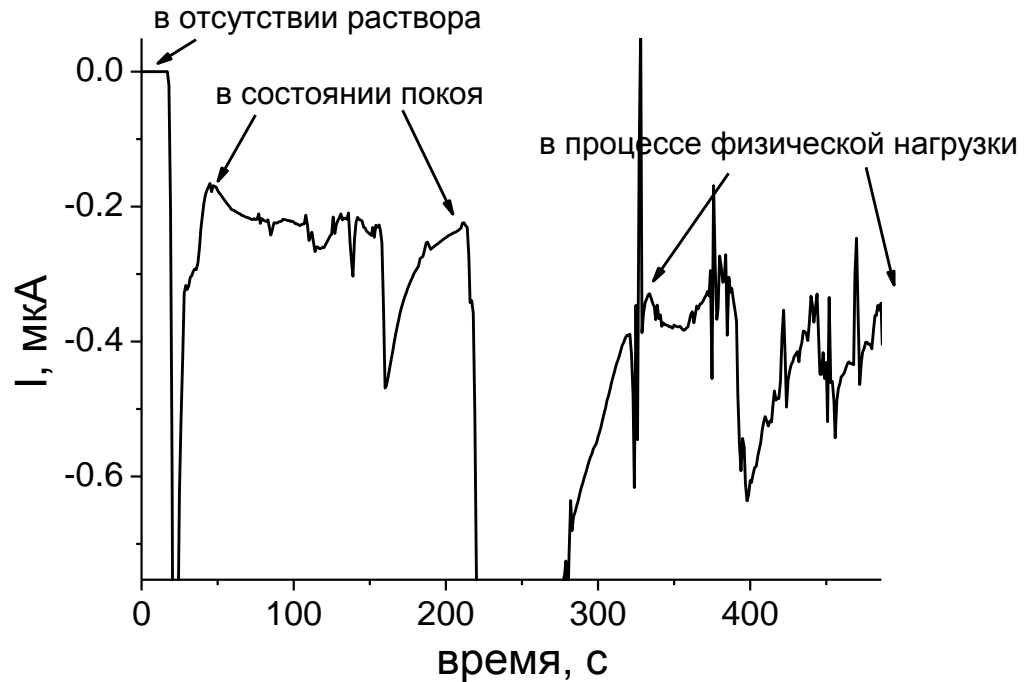


Рис. 80. Отклик биосенсора при определении лактата в поте в системе неинвазивного монитора (смесь для иммобилизации ЛОД содержала 3% силоксана и 5% ПФС).

В неинвазивном мониторе предусмотрен капилляр для выведения жидкости из системы (рис. 77), посредством которого пот собирали в пробирку Эппендорфа и, в дальнейшем, использовали для анализа альтернативным методом в системе проточно-инжекционного анализа с разбавлением образца в 100 раз. В качестве альтернативного метода выступал полуавтоматический проточно-инжекционный анализатор на лактат, прошедший испытание на определение лактата в крови и других биологических жидкостях с сертифицированным автоматическим анализатором HumaStar 300 ($R > 0.99$).

Результаты по содержанию лактата в поте, полученные с помощью неинвазивного монитора состояния гипоксии и с использованием альтернативного метода, представлены в табл. 10, корреляция результатов наглядно продемонстрирована на рис. 81.

Таблица 10. Концентрации лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке, полученные с использованием неинвазивного монитора и альтернативного метода ($n = 3$, $P = 0.95$)

Состояние	Доброволец	С(лактата), мМ неинвазивный монитор	С(лактата), мМ альтернативный метод
В состоянии покоя	1	10 ± 5	16 ± 2
	2	12 ± 4	14 ± 1
	3	13 ± 4	17 ± 2
	4	8 ± 4	12 ± 2
В процессе физической нагрузки	1	18 ± 4	22 ± 3
	2	46 ± 8	53 ± 4
	3	49 ± 8	55 ± 4
	4	35 ± 8	46 ± 3

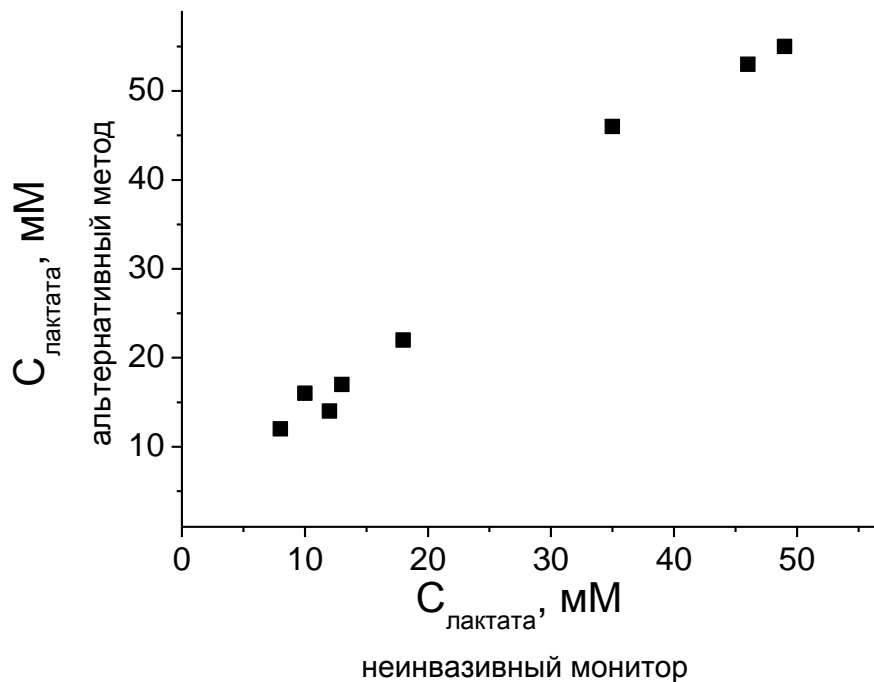


Рис. 81. Корреляция по содержанию лактата в поте, измеренному с помощью неинвазивного монитора непосредственно с мышцы руки/ноги и с использованием альтернативного метода в системе ПИА с разбавлением образца в 100 раз, $R = 0.9930$.

Как видно на рис. 81, наблюдается высокая корреляция результатов, полученных при помощи неинвазивного монитора и с использованием альтернативного метода, $R=0.9930$. Также на графике можно заметить два облака данных, соответствующие содержанию лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке, результаты полностью согласуются с литературными данными [11, 84-87].

Таким образом, создан неинвазивный монитор состояния гипоксии, проводящий непрерывное определение лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке. Показана высокая корреляция результатов по содержанию лактата в поте, полученных с использованием монитора и при помощи альтернативного метода. Создание монитора состояния гипоксии открывает обширные перспективы развития неинвазивной диагностики, в том числе в области спортивной медицины.

ВЫВОДЫ

1. Метод сканирующей электрохимической микроскопии адаптирован для скрининга ферментсодержащих мембран. Для этого разработан высокостабильный микросенсор для определения пероксида водорода на основе микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью и применен в качестве зонда электрохимического микроскопа. Таким образом, определен оптимальный состав смеси для иммобилизации лактатоксидазы, обеспечивающий наивысшую активность и стабильность включенного в мембрану фермента.
2. Создан высокочувствительный и высокостабильный биосенсор для определения лактата на основе планарных электродов, модифицированных берлинской лазурью, и фермента лактатоксидазы, иммобилизованной в мембрану γ -аминопропилсилоксана. Диапазон определяемых концентраций лактата составляет $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М, коэффициент чувствительности достигает $0.33 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$. Чувствительность биосенсора повышается в четыре раза, операционная стабильность - в два раза по сравнению с лучшим лактатным датчиком. Биосенсор сохраняет 80% исходного значения коэффициента чувствительности при хранении при $+4^\circ\text{C}$ в течение 18 мес.
3. Предложен метод инженерии лактатоксидазы при иммобилизации. Для расширения диапазона определяемых содержаний лактата в область высоких концентраций, необходимых для анализа неразбавленного пота, предложено использовать отрицательно заряженный перфторсульфонированный полимер (аналог нафиона) в качестве компонента мембраны. За счет экранирования субстрат-связывающего участка фермента полимером достигается понижение сродства лактатоксидазы к субстрату. Это иллюстрируется повышением кажущейся константы Михаэлиса в 30 раз по сравнению с константой, наблюдаемой в случае электронейтральных силоксановых мембран.
4. Разработан лактатный биосенсор, работающий в области высоких (миллимолярных) концентраций лактата при иммобилизации фермента в смешанные мембраны из γ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонированного полимера. Диапазон определяемых концентраций

лактата сдвигается в область высоких значений на два порядка и составляет в периодическом режиме 0.1 – 80 мМ. После трех часов непрерывных измерений сигнал биосенсора остается на первоначальном уровне, а при хранении в течение 3 мес при +4°C обеспечивается исходное значение чувствительности.

5. Путем интеграции биосенсора на высокие концентрации и потосборника создан неинвазивный монитор состояния гипоксии, работающий на основе непрерывного мониторинга лактата в поте. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте как в состоянии покоя, так и в процессе физической нагрузки, полученных при апробации монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода, коэффициент корреляции составил 0.9930.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dringen R., Gebhardt R., Hamprecht B. Glycogen in astrocytes - possible function as lactate supply for neighboring cells // *Brain Res.* 1993. Т. 623, № 2. С. 208-214.
2. Lee J. A., Tsai Y. C., Chen H. Y., Wang C. C., Chen S. M., Fukushima T., Imai K. Fluorimetric determination of D-lactate in urine of normal and diabetic rats by column-switching high-performance liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2005. Т. 534, № 2. С. 185-191.
3. Smutok O., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. A novel L-lactate-selective biosensor based on flavocytochrome b(2) from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Biosens. Bioelectron.* 2005. Т. 20, № 7. С. 1285-1290.
4. Lamb G. D., Stephenson D. G. Point: Counterpoint: Lactic acid accumulation is an advantage/disadvantage during muscle activity // *J. Appl. Phys.* 2006. Т. 100, № 4. С. 1410-1412.
5. Фэйхи Т. Так ли страшна молочная кислота? // *Musc. Develop.* 2000. Т. 2. С. 1-5.
6. Goodwin M. L., Harris J. E., Hernández A., Gladden L. B. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians // *J. Diab. Sci Technol.* 2007. Т. 1, № 4. С. 558-569.
7. Brooks G. A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research // *Med. Sci Sports Ex.* 1985. Т. 17, № 1. С. 22-34.
8. Cooke N. T., Wilson S. H., Freedman S. Blood lactate and respiratory muscle fatigue in patients with chronic airways obstruction // *Thorax.* 1983. Т. 38, № 3. С. 184-187.
9. Karlsson J., Åström H., Holmgren A., Kaijser C., Orinius E. Angina pectoris and blood lactate concentration during graded exercise // *Int. J. Sports Med.* 1984. Т. 5, № 06. С. 348-351.
10. Owles W. H. Alterations in the lactic acid content of the blood as a result of light exercise, and associated changes in the CO₂-combining power of the blood and in the alveolar CO₂ pressure // *J. Physiol.* 1930. Т. 69, № 2. С. 214-237.
11. Sakharov D. A. S. M. U., Vagin M. Yu., Yashina E. I. , Karyakin A. A. , and Tonevitsky A. G. Relationship between lactate concentrations in active muscle sweat and whole blood. // *Bull. Experim. Biol. Med.* 2010. Т. 150, № 1. С. 83-85.
12. Meakins J., Long C. N. H. Oxygen consumption, oxygen debt and lactic acid in circulatory failure // *J. Clin. Investig.* 1927. Т. 4, № 2. С. 273-280.
13. Rackow E. C., Weil M. H. Physiology of blood flow and oxygen utilization by peripheral tissue in circulatory shock // *Clin. Chem.* 1990. Т. 36, № 8. С. 1544-1546.
14. G. G. Die Milchsäure des Blutes und ihre Ursprungsstätten // *Arch. Physiol.* 1866. Т. 10. С. 400–414.
15. Berlinerblau M. Über das Vorkommen der Milchsäure im Blute und ihre Entstehung im Organismus // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1887. Т. 23, № 5. С. 333-346.

16. Barker S. B., Summerson W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material // *J. Biol. Chem.* 1941. T. 138, № 2. C. 535-554.
17. Bleiberg B., Steinberg J. J., Katz S. D., Wexler J., LeJemtel T. Determination of plasma lactic acid concentration and specific activity using high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci Applic.* 1991. T. 568, № 2. C. 301-308.
18. Hallström Å., Carlsson A., Hillered L., Unerstedt U. Simultaneous determination of lactate, pyruvate, and ascorbate in microdialysis samples from rat brain, blood, fat, and muscle using high-performance liquid chromatography // *J. Pharmacol. Methods.* 1989. T. 22, № 2. C. 113-124.
19. Graham G. D., Blamire A. M., Howseman A. M., Rothman D. L., Fayad P. B., Brass L. M., Petroff O. A., Shulman R. G., Prichard J. W. Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral lactate and other metabolites in stroke patients // *Stroke.* 1992. T. 23, № 3. C. 333-340.
20. McShane M. J., Cote G. L. Near-infrared spectroscopy for determination of glucose, lactate, and ammonia in cell culture media // *Appl. Spectrosc.* 1998. T. 52, № 8. C. 1073-1078.
21. Vavrusova M M. M., Skibsted LH. Aqueous solubility of calcium L-lactate, calcium D-gluconate, and calcium D-lactobionate: importance of complex formation for solubility increase by hydroxycarboxylate mixtures // *J. Agricult. Food Chem.* 2013. T. 61, № 34. C. 8207-8214.
22. Edwards H. T. A simplified estimation of lactate in normal human blood // *J. Bio Chem.* 1938. T. 125, № 2. C. 571-583.
23. Gutmann I., Wahlefeld A. W. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD // *Methods Enzym. Anal.* 1974. T. 3. C. 1464-1468.
24. Noll F. L-(+)-Lactate // *Methods Enzym. Anal.* 1984. T. 6. C. 582-588.
25. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1962. T. 102, № 1. C. 29-45.
26. Карякин А., Уласова Е., Вагин М., Карякина Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики // *Сенсор.* 2002. Т. 24. С. 1-16.
27. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on prussian-blue modified electrodes // *Anal. Lett.* 1994. T. 27, № 15. C. 2861-2869.
28. www.analytica.ru.
29. www.ld.ru.
30. Gamero M., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2010. T. 25, № 9. C. 2038-2044.
31. Yang Q., Atanasov P., Wilkins E. Needle-type lactate biosensor // *Biosens. Bioelectron.* 1999. T. 14, № 2. C. 203-210.

32. Suman S., Singhal R., Sharma A. L., Malhotra B. D., Pundir C. S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase // *Sens. Actuators B*. 2005. T. 107, № 2. C. 768-772.
33. Wang K., Xu J.-J., Chen H.-Y. Biocomposite of cobalt phthalocyanine and lactate oxidase for lactate biosensing with MnO₂ nanoparticles as an eliminator of ascorbic acid interference // *Sens. Actuators B*. 2006. T. 114, № 2. C. 1052-1058.
34. Hart A. L., Matthews C., Collier W. A. Estimation of lactate in meat extracts by screen-printed sensors // *Anal. Chim. Acta*. 1999. T. 386, № 1. C. 7-12.
35. Ghamouss F., Ledru S., Ruillé N., Lantier F., Boujtita M. Bulk-modified modified screen-printing carbon electrodes with both lactate oxidase (LOD) and horseradish peroxidase (HRP) for the determination of L-lactate in flow injection analysis mode // *Anal. Chim. Acta*. 2006. T. 570, № 2. C. 158-164.
36. Parra A., Casero E., Vázquez L., Pariente F., Lorenzo E. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces // *Anal. Chim. Acta*. 2006. T. 555, № 2. C. 308-315.
37. Garjonyte R., Yigzaw Y., Meskys R., Malinauskas A., Gorton L. Prussian Blue-and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid // *Sens. Actuators B*. 2001. T. 79, № 1. C. 33-38.
38. Romero M. R., Garay F., Baruzzi A. M. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes // *Sens. Actuators B*. 2008. T. 131, № 2. C. 590-595.
39. Gomes S. P., Odložilíková M., Gabriela Almeida M., Araújo A. N., Couto C. M. C. M., Montenegro M. Application of lactate amperometric sol-gel biosensor to sequential injection determination of L-lactate // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. T. 43, № 4. C. 1376-1381.
40. Shinbo T., Sugiura M., Kamo N. Potentiometric enzyme electrode for lactate // *Anal. Chem.* 1979. T. 51, № 1. C. 100-104.
41. Casero E., Alonso C., Petit-Domínguez M. D., Vázquez L., Parra-Alfambra A. M., Merino P., Álvarez-García S., de Andrés A., Suárez E., Pariente F. Lactate biosensor based on a bionanocomposite composed of titanium oxide nanoparticles, photocatalytically reduced graphene, and lactate oxidase // *Microchim. Acta*. 2014. T. 181, № 1-2. C. 79-87.
42. Lamas-Ardisana P. J., Loaiza O. A., Añorga L., Jubete E., Borghei M., Ruiz V., Ochoteco E., Cabañero G., Grande H. J. Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly (diallyldimethylammonium chloride) films // *Biosens. Bioelectron.* 2014. T. 56. C. 345-351.
43. Loaiza O. A., Lamas-Ardisana P. J., Añorga L., Jubete E., Ruiz V., Borghei M., Cabañero G., Grande H. J. Graphitized carbon nanofiber-Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. Detection of lactate in wines and ciders // *Bioelectrochem.* 2015. T. 101. C. 58-65.

44. Lin Z.-C., Chou J.-C., Sun T.-P., Hsiung S.-K. Development of the potentiometric lactate biosensor based on SnO₂/ITO glass electrode // *Sens. Lett.* 2008. T. 6, № 6. C. 855-859.
45. Ibupoto Z. H., Shah S. M. U. A., Khun K., Willander M. Electrochemical L-lactic acid sensor based on immobilized ZnO nanorods with lactate oxidase // *Sens.* 2012. T. 12, № 3. C. 2456-2466.
46. Shimomura T., Sumiya T., Ono M., Ito T., Hanaoka T.-a. Amperometric L-lactate biosensor based on screen-printed carbon electrode containing cobalt phthalocyanine, coated with lactate oxidase-mesoporous silica conjugate layer // *Anal. Chim. Acta.* 2012. T. 714. C. 114-120.
47. Goran J. M., Lyon J. L., Stevenson K. J. Amperometric detection of l-lactate using nitrogen-doped carbon nanotubes modified with lactate oxidase // *Anal. Chem.* 2011. T. 83, № 21. C. 8123-8129.
48. Sato N., Okuma H. Amperometric simultaneous sensing system for D-glucose and L-lactate based on enzyme-modified bilayer electrodes // *Anal. Chim. Acta.* 2006. T. 565, № 2. C. 250-254.
49. Patel N. G., Erlenkötter A., Cammann K., Chemnitius G. C. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis // *Sens. Actuators B.* 2000. T. 67, № 1. C. 134-141.
50. Yashina E. I., Borisova A. V., Karyakina E. E., Shchegolikhina O. I., Vagin M. Y., Sakharov D. A., Tonevitsky A. G., Karyakin A. A. Sol-Gel Immobilization of Lactate Oxidase from Organic Solvent: Toward the Advanced Lactate Biosensor // *Anal. Chem.* 2010. T. 82, № 5. C. 1601-1604.
51. Salazar P., Martín M., O'Neill R. D., Roche R., González-Mora J. L. Biosensors based on Prussian blue modified carbon fibers electrodes for monitoring lactate in the extracellular space of brain tissue // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012. T. 7, № 7. C. 5910-5926.
52. Agüí L., Eguilaz M., Peña-Farfal C., Yáñez-Sedeño P., Pingarron J. e. M. Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on an Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode // *Electroanalysis.* 2009. T. 21, № 3-5. C. 386-391.
53. Sprules S. D., Hart J. P., Pittson R., Wring S. A. Evaluation of a new disposable screen-printed sensor strip for the measurement of NADH and its modification to produce a lactate biosensor employing microliter volumes // *Electroanalysis.* 1996. T. 8, № 6. C. 539-543.
54. Jena B. K., Raj C. R. Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Gold Nanoparticles // *Electroanalysis.* 2007. T. 19, № 7-8. C. 816-822.
55. Yu Y., Yang Y., Gu H., Zhou T., Shi G. Size-tunable Pt nanoparticles assembled on functionalized ordered mesoporous carbon for the simultaneous and on-line detection of glucose and L-lactate in brain microdialysate // *Biosens. Bioelectron.* 2013. T. 41. C. 511-518.
56. He X.-R., Yu J.-H., Ge S.-G., Zhang X.-M., Lin Q., Zhu H., Feng S., Yuan L., Huang J.-D. Amperometric L-lactate biosensor based on sol-gel film and multi-walled carbon

- nanotubes/platinum nanoparticles enhancement // *Chin. J. Anal. Chem.* 2010. T. 38, № 1. C. 57-61.
57. Pereira A. C., Kisner A., Tarley C. R. T., Kubota L. T. Development of a carbon paste electrode for lactate detection based on Meldola's Blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide and lactate oxidase // *Electroanalysis*. 2011. T. 23, № 6. C. 1470-1477.
58. Shakir I., Shahid M., Yang H. W., Cherevko S., Chung C.-H., Kang D. J. α -MoO₃ nanowire-based amperometric biosensor for L-lactate detection // *J. Solid State Electrochem.* 2012. T. 16, № 6. C. 2197-2201.
59. Wang Y. T., Yu L., Wang J., Lou L., Du W. J., Zhu Z. Q., Peng H., Zhu J. Z. A novel L-lactate sensor based on enzyme electrode modified with ZnO nanoparticles and multiwall carbon nanotubes // *J. Electroanal. Chem.* 2011. T. 661, № 1. C. 8-12.
60. Spohn U., Narasaiah D., Gorton L. The influence of the carbon paste composition on the performance of an amperometric bienzyme sensor for L-lactate // *Electroanalysis*. 1996. T. 8, № 6. C. 507-514.
61. Pérez S., Fàbregas E. Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples // *Analyst*. 2012. T. 137, № 16. C. 3854-3861.
62. Rassaei L., Olthuis W., Tsujimura S., Sudhölter E. J. R., van den Berg A. Lactate biosensors: current status and outlook // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. T. 406, № 1. C. 123-137.
63. Salazar P., Martín M., O'Neill R. D., Roche R., González-Mora J. L. Surfactant-promoted Prussian Blue-modified carbon electrodes: Enhancement of electro-deposition step, stabilization, electrochemical properties and application to lactate microbiosensors for the neurosciences // *Colloids Surf., B*. 2012. T. 92. C. 180-189.
64. Schmitt R. E., Molitor H. R., Wu T. S. Voltammetric method for the determination of lactic acid using a carbon paste electrode modified with cobalt phthalocyanine // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012. T. 7, № 11. C. 10835-10841.
65. Kulys J., Wang L., Maksimoviene A. L-Lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste // *Anal. Chim. Acta*. 1993. T. 274, № 1. C. 53-58.
66. Pereira A. C., Aguiar M. R., Kisner A., Macedo D. V., Kubota L. T. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube // *Sens. Actuators, B*. 2007. T. 124, № 1. C. 269-276.
67. Parra A., Casero E., Vázquez L., Jin J., Pariente F., Lorenzo E. Microscopic and voltammetric characterization of bioanalytical platforms based on lactate oxidase // *Langmuir*. 2006. T. 22, № 12. C. 5443-5450.
68. Serban S., El Murr N. Redox-flexible NADH oxidase biosensor: A platform for various dehydrogenase bioassays and biosensors // *Electrochim. Acta*. 2006. T. 51, № 24. C. 5143-5149.
69. Mao L., Yamamoto K. Amperometric on-line sensor for continuous measurement of hypoxanthine based on osmium-polyvinylpyridine gel polymer and xanthine oxidase bienzyme modified glassy carbon electrode // *Anal. Chim. Acta*. 2000. T. 415, № 1. C. 143-150.

70. Douglas C. G. Oliber-Sharpey Lectures On the coordination of the respiration and circulation with variations in bodily // *The Lancet*. 1927. T. 210, № 5422. C. 213-218.
71. Hollmann W. Zur Frage der Dauerleistungsfähigkeit // *Fortschr. Med.* 1961. T. 79. C. 439-453.
72. Wasserman K., McIlroy M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise // *Am. J. Cardiol.* 1964. T. 14, № 6. C. 844-852.
73. MacLean D. A., Bangsbo J., Saltin B. Muscle interstitial glucose and lactate levels during dynamic exercise in humans determined by microdialysis // *J. Appl. Phys.* 1999. T. 87, № 4. C. 1483-1490.
74. Claver J. B., Mirón M. C. V., Capitán-Vallvey L. F. Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva // *Analyst*. 2009. T. 134, № 7. C. 1423-1432.
75. Schabmueller C. G. J., Loppow D., Piechotta G., Schütze B., Albers J., Hintsche R. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva // *Biosens. Bioelectron.* 2006. T. 21, № 9. C. 1770-1776.
76. Malon R. S. P., Chua K. Y., Wicaksono D. H. B., Córcoles E. P. Cotton fabric-based electrochemical device for lactate measurement in saliva // *Analyst*. 2014. T. 139, № 12. C. 3009-3016.
77. Schmid K., Dittmer D. S. Blood and Other Body Fluids, Federation of American Societies of Experimental Biology, Washington, D // *Book Blood and Other Body Fluids*, Fed. of Amer. Societies of Experimental Biology, Washington, D / EditorC, 1961. C 285-298.
78. Tenovuo J. O. Human saliva: CRC press. 1989. C. 118-125.
79. Marek E. M., Volke J., Hawener I., Platen P., Mückenhoff K., Marek W. Measurements of lactate in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young and healthy subjects // *J. Breath Res.* 2010. T. 4, № 1. C. 1 - 8.
80. Marek E., Mückenhoff K., Streckert H. J., Becher G., Marek W. Measurements of L-lactate and H₂O₂ in exhaled breath condensate at rest and mild to moderate exercise in young and healthy subjects // *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2008. T. 62, № 9. C. 541-547.
81. Van Haeringen N. Survey of ophthalmology // *J. Clin. Biochem. Tears*. 1981. T. 26, № 2. C. 84-96.
82. Van Haeringen N. J., Glasius E. Collection method dependant concentrations of some metabolites in human tear fluid, with special reference to glucose in hyperglycaemic conditions // *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmol.* 1977. T. 202, № 1. C. 1-7.
83. Faridnia M. H., Palleschi G., Lubrano G. J., Guilbault G. G. Amperometric biosensor for determination of lactate in sweat // *Anal. Chim. Acta*. 1993. T. 278, № 1. C. 35-40.
84. Mitsubayashi K., Suzuki M., Tamiya E., Karube I. Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition // *Anal. Chim. Acta*. 1994. T. 289, № 1. C. 27-34.
85. Alzeer A. H., Al Otair H. A. K. Sweat chloride concentration in patients with heat stroke // *J. of Taibah Univ. Med. Sci.* 2014. T. 9, № 1. C. 50-53.

86. Cai X., Yan J., Chu H., Wu M., Tu Y. An exercise degree monitoring biosensor based on electrochemiluminescent detection of lactate in sweat // *Sens. Actuators, B*. 2010. T. 143, № 2. C. 655-659.
87. Green J. M., Pritchett R. C., Crews T. R., McLester J. R., Tucker D. C. Sweat lactate response between males with high and low aerobic fitness // *Eur. J. Appl. Phys.* 2004. T. 91, № 1. C. 1-6.
88. Hirst N. A., Hazelwood L. D., Jayne D. G., Millner P. A. An amperometric lactate biosensor using H₂O₂ reduction via a Prussian Blue impregnated poly(ethyleneimine) surface on screen printed carbon electrodes to detect anastomotic leak and sepsis // *Sens. Actuators, B*. 2013. T. 186. C. 674-680.
89. Yashina E. I., Borisova A. V., Karyakina E. E., Shchegolikhina O. I., Vagin M. Y., Sakharov D. A., Tonevitsky A. G., Karyakin A. A. Sol-gel immobilization of lactate oxidase from organic solvent: toward the advanced lactate biosensor // *Anal. Chem.* 2010. T. 82, № 5. C. 1601-1604.
90. Nesakumar N., Sethuraman S., Krishnan U. M., Rayappan J. B. B. Fabrication of lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized on cerium oxide nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* 2013. T. 410, № 10. C. 158-164.
91. Nesakumar N., Thandavan K., Sethuraman S., Krishnan U. M., Rayappan J. B. B. An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods // *J. Colloid Interface Sci.* 2014. T. 414, № 11. C. 90-96.
92. Jia W. Z., Bandodkar A. J., Valdes-Ramirez G., Windmiller J. R., Yang Z. J., Ramirez J., Chan G., Wang J. Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration // *Anal. Chem.* 2013. T. 85, № 14. C. 6553-6560.
93. Dutkiewicz E. P., Lin J.-D., Tseng T.-W., Wang Y.-S., Urban P. L. Hydrogel Micropatches for sampling and profiling skin metabolites // *Anal. Chem.* 2014. T. 79, № 14. C. 653-660.
94. Karyakin A. A. Prussian Blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications // *Electroanalysis*. 2001. T. 13, № 10. C. 813-819.
95. Turner A. *Biosensors: fundamentals and applications*. 1987. C. 245-251.
96. Wang J. *Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics* // *Biosens. Bioelectron.* 2006. T. 21, № 10. C. 1887-1892.
97. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Д. *Биосенсоры: основы и приложения* // М.: Мир. 1992. C. 212-218.
98. Hansson K. M., Vikinge T. P., Rånby M., Tengvall P., Lundström I., Johansen K., Lindahl T. L. Surface plasmon resonance (SPR) analysis of coagulation in whole blood with application in prothrombin time assay // *Biosens. Bioelectron.* 1999. T. 14, № 8. C. 671-682.
99. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on Prussian Blue modified electrodes // *Anal. Lett.* 1994. T. 27, № 15. C. 2861-2869.

100. Walsh D. A., Fernández J. L., Bard A. J. Rapid screening of bimetallic electrocatalysts for oxygen reduction in acidic media by scanning electrochemical microscopy // *J. Electrochem. Soc.* 2006. T. 153, № 6. C. 99-103.
101. Ferapontova E. E., Shleev S., Ruzgas T., Stoica L., Christenson A., Tkac J., Yaropolov A. I., Gorton L., Palacek E., Scheller F. W. Electrochemistry of nucleic acids and proteins // *Electrochem. Sens. Genom. Proteom.* 2005. C. 517-598.
102. Zhang Y., Wilson G. S. Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors // *J. Electroanal. Chem.* 1993. T. 345, № 1-2. C. 253-271.
103. Karyakin A. A., Karyakina E. E. Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors // *Sens. Actuators, B.* 1999. T. 57, № 1-3. C. 268-273.
104. Е.Е. Карякина, Карякин А. А. Электрохимические биосенсоры на основе проводящих полимеров и электроактивных поликристаллов. / Биохим. методы анализа. М.: «Наука». 2010. С. 93-138.
105. Evans S. A. G., Elliott J.M., Andrews L.M., Bartlett P.N., Doyle P.J., Denuault G. Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes // *Anal. Chem.* 2002. T. 74. C. 1322-1326.
106. Kulys J., Schmid R.D. Mediatorless peroxidase electrode and preparation of bienzyme sensors // *Bioelectrochem. Bioenerget.* 1990. T. 24. C. 305-315.
107. Karyakin A. A., Karyakina, E.E. Electroanalytical applications Prussian Blue and its analogs // *Russ. Chem. Bull., International Edition.* 2001. T. 50. C. 1-7.
108. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. Prussian blue-based first-generation biosensor. A sensitive amperometric electrode for glucose // *Anal. Chem.* 1995. T. 67, № 14. C. 2419-2423.
109. Lin M. S., Shih W. C. Chromium hexacyanoferrate based glucose biosensor // *Anal. Chim. Acta.* 1999. T. 381, № 2. C. 183-189.
110. Itaya K., Uchida I., Neff V. D. Electrochemistry of polynuclear transition metal cyanides: Prussian blue and its analogues // *Acc. Chem. Res.* 1986. T. 19. №. 6. C. 162-168.
111. Neff V.D. Electrochemical oxidation and reduction of thin films of Prussian Blue // *J. Electrochem. Soc.* 1978. T. 128. C. 886-887.
112. Itaya K., Ataka T., Toshima S. Spectroelectrochemistry and electrochemical preparation method of Prussian blue modified electrodes // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. T. 104, № 18. C. 4767-4772.
113. Ibers J. A., Davidson N. On the Interaction between Hexacyanatoferate (III) Ions and (a) Hexacyanatoferate (II) or (b) Iron (III) Ions 1a, 2 // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. T. 73, № 1. C. 476-478.
114. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis // *Talanta.* 1996. T. 43, № 9. C. 1597-1606.

115. Itaya K., Shoji N., Uchida I. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian blue modified electrodes // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. Т. 106, № 12. С. 3423-3429.
116. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L. The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow // *J. Electroanal. Chem.* 1998. Т. 456, № 1–2. С. 97-104.
117. Crumbliss A. L., Lugg P. S., Morosoff N. Alkali metal cation effects in a Prussian blue surface modified electrode // *Inorg. Chem.* 1984. Т. 23, № 26. С. 4701-4708.
118. Варфоломеев С. Д. Химическая энзимология. М.: Изд. центр "Академия". 2005. С. 115-140.
119. Jaffari S. A., Turner A. P. F. Novel hexacyanoferrate (III) modified graphite disc electrodes and their application in enzyme electrodes—Part I // *Biosens. Bioelectron.* 1997. Т. 12, № 1. С. 1-9.
120. Zhang Y., Wilson G. S. Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt+ Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors // *J. Electroanal. Chem.* 1993. Т. 345, № 1. С. 253-271.
121. Milardović S., Kruhac I., Iveković D., Rumenjak V., Tkalčec M., Grabarić B. S. Glucose determination in blood samples using flow injection analysis and an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized on hexacyanoferrate modified nickel electrode // *Anal. Chim. Acta.* 1997. Т. 350, № 1. С. 91-96.
122. Milardović S., Grabarić Z., Tkalčec M., Rumenjak V. Determination of oxalate in urine, using an amperometric biosensor with oxalate oxidase immobilized on the surface of a chromium hexacyanoferrate-modified graphite electrode // *J. of AOAC Intern.* 2000. Т. 83, № 5. С. 1212-1217.
123. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L. Amperometric biosensor for glutamate using Prussian Blue-based “Artificial Peroxidase” as a transducer for hydrogen peroxide // *Anal. Chem.* 2000. Т. 72, № 7. С. 1720-1723.
124. Бидей С., Броделиус П., Кабрал И. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы. 1988. С. 96-105.
125. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification // *Pure and Appl. Chem.* 1999. Т. 71, № 12. С. 2333-2348.
126. Cui G., Kim S., Paeng K. Disposable amperometric sensor screen printed on a nitrocellulose strip: a glucose biosensor employing lead oxide as an interference-removing agent // *Anal. Chem.* 2000. Т. 72. С. 1925-1929.
127. Turner A., Karube I., Wilson G. Biosensors. Fundamentals and applications // Oxford Univ. Press, Oxford. 1987. С. 200-215.
128. Pandey P., Upadhyay S., Pathak H. A. New glucose biosensor based on sandwich configuration of organically modified sol-gel glass // *Electroanal.* 1998. Т. 11. С. 59-64.
129. Fu G., Yue X., Dai Z. Glucose biosensor based on covalent immobilization of enzyme in sol-gel composite film combined with Prussian blue/carbon nanotubes hybrid // *Biosens. Bioelectron.* 2011. Т. 26, № 9. С. 3973-3976.

130. Dong S., Kuwana T. Cobalt-porphyrin-Nafion film on carbon microarray electrode to monitor oxygen for enzyme analysis for glucose // *Electroanal.* 1991. T. 3. C. 485-491.
131. Quinto M., Losito I., Palmisano F., Zambonin C. G. Disposable interference-free glucose sensor based on electropolymerized poly(pyrrole) permselective film // *Anal. Chim. Acta.* 2000. T. 420. C. 9-17.
132. Quinto M., Losito I., Palmisano F., Zambonin C. G. Disposable interference-free glucose biosensor based on an electropolymerised poly (pyrrole) permselective film // *Anal. Chim. Acta.* 2000. T. 420, № 1. C. 9-17.
133. Sullivan P. A., Soon C. Y., Schreurs W. J., Cutfield J. F., Shepherd M. G. Structure of L-lactate oxidase from mycobacterium-smegmatis // *Biochem. J.* 1977. T. 165, № 2. C. 375-389..
134. Li S. J., Umena Y., Yorita K., Matsuoka T., Kita A., Fukui K., Morimoto Y. Crystallographic study on the interaction of l-lactate oxidase with pyruvate at 1.9 Å resolution // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007. T. 358, № 4. C. 1002-1007.
135. Umena Y., Yorita K., Matsuoka T., Kita A., Fukui K., Morimoto Y. The crystal structure of l-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006. T. 350, № 2. C. 249-256.
136. Yorita K., Misaki H., Matsumoto M., Massey V. Function of two arginine residues of l-lactate oxidase // *Intern. Cong. Ser.* 2002. T. 1233. C. 69-75.
137. Rahman M. M., Shiddiky M. J. A., Rahman M. A., Shim Y.-B. A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film // *Anal. Biochem.* 2009. T. 384, № 1. C. 159-165.
138. Al-Jawadi E., Pöller S., Haddad R., Schuhmann W. NADH oxidation using modified electrodes based on lactate and glucose dehydrogenase entrapped between an electrocatalyst film and redox catalyst-modified polymers // *Microchim. Acta.* 2012. T. 177, № 3-4. C. 405-410.
139. Tsuchiya M., Matsuhisa H., Hasebe Y. Selective amperometric response to hydrogen peroxide at a protein-incorporated sol-gel hybrid film-modified platinum electrode // *Buns. Kagaku/Japan Analyst.* 2012. T. 61, № 5. C. 1-5.
140. Zanini V. P., de Mishima B. L., Labbé P., Solís V. An L-Lactate amperometric enzyme electrode based on L-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode. Application to dairy products and red wine // *Electroanalysis.* 2010. T. 22, № 9. C. 946-954.
141. Zanini V. P., de Mishima B. L., Solís V. An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite–chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples // *Sens. Actuators B.* 2011. T. 155, № 1. C. 75-80.
142. Palmisano F., Rizzi R., Centonze D., Zambonin P. G. Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric

- biosensor based on electropolymerized thin films // *Biosens. Bioelectron.* 2000. T. 15, № 9. C. 531-539.
143. Palmisano F., De Benedetto G. E., Zambonin C. G. Lactate amperometric biosensor based on an electrosynthesized bilayer film with covalently immobilized enzyme // *Analyst.* 1997. T. 122, № 4. C. 365-369.
144. Ito N., Miyamoto S., Kimura J., Karube I. The detection of lactate using the repeated application of stepped potentials to a micro-planar gold electrode // *Biosens. Bioelectron.* 1996. T. 11, № 1. C. 119-126.
145. Minagawa H., Nakayama N., Matsumoto T., Ito N. Development of long life lactate sensor using thermostable mutant lactate oxidase // *Biosens. Bioelectron.* 1998. T. 13, № 3. C. 313-318.
146. Ito N., Miyamoto S., Kimura J., Karube I. The detection of lactate using the repeated application of stepped potentials to a micro-planar gold electrode // *Biosens. Bioelectron.* 1996. T. 11, № 1-2. C. 119-126.
147. Minagawa H., Nakayama N., Matsumoto T., Ito N. Development of long life lactate sensor using thermostable mutant lactate oxidase // *Biosens. Bioelectron.* 1998. T. 13, № 3-4. C. 313-318.
148. Hart A. L., Turner A. P. F., Hopcroft D. On the use of screen- and ink-jet printing to produce amperometric enzyme electrodes for lactate // *Biosens. Bioelectron.* 1996. T. 11, № 3. C. 263-270.
149. Hart A. L., Cox H., Janssen D. Stabilization of lactate oxidase in screen-printed enzyme electrodes // *Biosens. Bioelectron.* 1996. T. 11, № 8. C. 833-837.
150. Guiseppi-Elie A., Brahim S., Slaughter G., Ward K. R. Design of a subcutaneous implantable biochip for monitoring of glucose and lactate // *Sens. J., IEEE.* 2005. T. 5, № 3. C. 345-355.
151. Hirano K., Yamato H., Kunimoto K., Ohwa M. Novel electron transfer mediators, indoaniline derivatives for amperometric lactate sensor // *Sens. Actuators B.* 2002. T. 86, № 1. C. 88-93.
152. Gomes S. P., Odložilíková M., Gabriela Almeida M., Araújo A. N., Couto C. M. C. M., Montenegro M. C. B. S. M. Application of lactate amperometric sol-gel biosensor to sequential injection determination of l-lactate // *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 2007. T. 43, № 4. C. 1376-1381.
153. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L., Bobrova O. A., Lukachova L. V., Gladilin A. K., Levashov A. V. Improvement of electrochemical biosensors using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent // *Anal. Chem.* 1996. T. 68, № 24. C. 4335-4341.
154. Karyakin A. A., Kotel'nikova E. A., Lukachova L. V., Karyakina E. E., Wang J. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: improvement of first-generation biosensors // *Anal. Chem.* 2002. T. 74, № 7. C. 1597-1603.
155. Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M. Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes // *Mater. Lett.* 1990. T. 10, № 1. C. 1-5.

156. Pandey P. C., Upadhyay S., Pathak H. C. A New glucose biosensor based on sandwich configuration of organically modified sol-gel glass // *Electroanalysis*. 1999. T. 11, № 1. С. 59-64.
157. Collinson M. M. Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials // *TrAC Trends in Anal. Chem.* 2002. T. 21, № 1. С. 31-39.
158. Lev O., Wu Z., Bharathi S., Glezer V., Modestov A., Gun J., Rabinovich L., Sampath S. Sol-gel materials in electrochemistry // *Chem. Mater.* 1997. T. 9, № 11. С. 2354-2375.
159. Walcarius A. Electrochemical applications of silica-based organic-inorganic hybrid materials // *Chem. Mater.* 2001. T. 13, № 10. С. 3351-3372.
160. Tripathi V. S., Kandimalla V. B., Ju H. Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules // *Sens. Actuators B*. 2006. T. 114, № 2. С. 1071-1082.
161. Wang B., Li B., Deng Q., Dong S. Amperometric glucose biosensor based on sol-gel organic-inorganic hybrid material // *Anal. Chem.* 1998. T. 70, № 15. С. 3170-3174.
162. Электрохимия полимеров. / Тарасевич М. Р.: Наука. 1990. С. 97-112.
163. Schwake A., Ross B., Cammann K. Chrono amperometric determination of hydrogen peroxide in swimming pool water using an ultramicroelectrode array // *Sens. Actuators B*. 1998. T. 46, № 3. С. 242-248.
164. Тимонов А. М. Твердые полимерные электролиты: структура, свойства и применение // *Сорос. Образов. Журн.* 2000. T. 6, № 8. С. 69-75.
165. Rubinstein I., Bard A. J. Polymer films on electrodes. 4. Nafion-coated electrodes and electrogenerated chemiluminescence of surface-attached tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (2+) // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. T. 102, № 21. С. 6641-6642.
166. Olah G. A., Prakash G. K. S., Arvanaghi M. Stable carbocations. 232. Significant mesomeric nitrenium ion character of the cyanodiphenylmethyl cation. The first long-lived cyanocarbenium ion // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. T. 102, № 21. С. 6640-6641.
167. Wang J., Dempsey E., Ozsoz M., Smyth M. R. Amperometric enzyme electrode for theophylline // *Analyst*. 1991. T. 116, № 10. С. 997-999.
168. Chen C.-Y., Tamiya E., Ishihara K., Kosugi Y., Su Y.-C., Nakabayashi N., Karube I. A biocompatible needle-type glucose sensor based on platinum-electroplated carbon electrode // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992. T. 36, № 3. С. 211-226.
169. Yao T. Enzyme electrode for the successive detection of hypoxanthine and inosine // *Anal. Chim. Acta*. 1993. T. 281, № 2. С. 323-326.
170. Turner R. F. B., Harrison D. J., Rajotte R. V., Baltes H. P. A biocompatible enzyme electrode for continuous in vivo glucose monitoring in whole blood // *Sens. Actuators B*. 1990. T. 1, № 1. С. 561-564.
171. Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy // *Phys. review lett.* 1982. T. 49, № 1. С. 57-62.
172. Bard A. J., Fan F. R. F., Kwak J., Lev O. Scanning electrochemical microscopy - introduction and principles // *Anal. Chem.* 1989. T. 61, № 2. С. 132-138.

173. Engstrom R. C., Weber M., Wunder D. J., Burgess R., Winquist S. Measurements within the diffusion layer using a microelectrode probe // *Anal. Chem.* 1986. T. 58, № 4. C. 844-848.
174. Liu H. Y., Fan F. R. F., Lin C. W., Bard A. J. Scanning electrochemical and tunneling ultramicroelectrode microscope for high-resolution examination of electrode surfaces in solution // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. T. 108, № 13. C. 3838-3839.
175. Bard A. J., Fan F.-R. F., Pierce D. T., Unwin P. R., Wipf D. O., Zhou F. Chemical imaging of surfaces with the scanning electrochemical microscope // *Science*. 1991. T. 254, № 5028. C. 68-74.
176. Barker A. L., Gonsalves M., Macpherson J. V., Slevin C. J., Unwin P. R. Scanning electrochemical microscopy: beyond the solid/liquid interface // *Anal. Chim. Acta.* 1999. T. 385, № 1. C. 223-240.
177. Hussien E. M., Erichsen T., Schuhmann W., Maciejewska M. SECM visualization of the spatial variability of enzyme-polymer spots. 3. Enzymatic feedback mode // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. T. 391, № 5. C. 1773-1782.
178. Wittstock G., Hesse R., Schuhmann W. Patterned self-assembled alkanethiolate monolayers on gold. Patterning and imaging by means of scanning electrochemical microscopy // *Electroanalysis*. 1997. T. 9, № 10. C. 746-750.
179. Yasukawa T., Kaya T., Matsue T. Characterization and imaging of single cells with scanning electrochemical microscopy // *Electroanalysis*. 2000. T. 12, № 9. C. 653-659.
180. Shiku H., Shiraishi T., Aoyagi S., Utsumi Y., Matsudaira M., Abe H., Hoshi H., Kasai S., Ohya H., Matsue T. Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy // *Anal. Chim. Acta.* 2004. T. 522, № 1. C. 51-58.
181. Laforge F. O., Velmurugan J., Wang Y., Mirkin M. V. Nanoscale imaging of surface topography and reactivity with the scanning electrochemical microscope // *Anal. Chem.* 2009. T. 81, № 8. C. 3143-3150.
182. Sun P., Mirkin M. V. Kinetics of electron-transfer reactions at nanoelectrodes // *Anal. Chem.* 2006. T. 78, № 18. C. 6526-6534.
183. Fushimi K., Okawa T., Azumi K., Seo M. Heterogeneous growth of anodic oxide film on a polycrystalline titanium electrode observed with a scanning electrochemical microscope // *J. Electrochem. Soc.* 2000. T. 147, № 2. C. 524-529.
184. Fushimi K., Seo M. Trial for evaluation of heterogeneity of passive film on iron by a scanning electrochemical microscope // *Zairyo-to-Kankyo*. 1997. T. 46, № 12. C. 797-803.
185. Lee Y., Amemiya S., Bard A. J. Scanning electrochemical microscopy. Theory and characterization of ring electrodes // *Anal. Chem.* 2001. T. 73, № 10. C. 2261-2267
186. Kwak J., Bard A. J. Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode // *Anal. Chem.* 1989. T. 61, № 11. C. 1221-1227.
187. Slevin C. J., Macpherson J. V., Unwin P. R. Measurement of local reactivity at liquid/solid, liquid/liquid, and liquid/gas interfaces with the scanning electrochemical

- microscope: Principles, theory, and applications of the double potential step chronoamperometric mode // *J. Phys. Chem. B.* 1997. T. 101, № 50. C. 10851-10859.
188. Cornut R., Lefrou C. New analytical approximation of feedback approach curves with a microdisk SECM tip and irreversible kinetic reaction at the substrate // *J. Electroanal. Chem.* 2008. T. 621, № 2. C. 178-184.
189. Bard A. J., Mirkin M. V., Unwin P. R., Wipf D. O. Scanning electrochemical microscopy. Theory and experiment of the feedback mode with finite heterogeneous electron-transfer kinetics and arbitrary substrate size // *J. Phys. Chem.* 1992. T. 96, № 4. C. 1861-1868.
190. Wei C., Bard A. J., Mirkin M. V. Scanning electrochemical microscopy. 31. Application of SECM to the study of charge transfer processes at the liquid/liquid interface // *J. Phys. Chem.* 1995. T. 99, № 43. C. 16033-16042.
191. Amphlett J. L., Denuault G. Scanning electrochemical microscopy (SECM): An investigation of the effects of tip geometry on amperometric tip response // *J. Phys. Chem. B.* 1998. T. 102, № 49. C. 9946-9951.
192. Cortés-Salazar F., Träuble M., Li F., Busnel J.-M., Gassner A.-L., Hojeij M., Wittstock G., Girault H. H. Soft stylus probes for scanning electrochemical microscopy // *Anal. Chem.* 2009. T. 81, № 16. C. 6889-6896.
193. Cortés-Salazar F., Lesch A., Momotenko D., Busnel J.-M., Wittstock G., Girault H. H. Fountain pen for scanning electrochemical microscopy // *Anal. Methods.* 2010. T. 2, № 7. C. 817-823.
194. Sitnikova N. A., Borisova A. V., Komkova M. A., Karyakin A. A. Superstable advanced hydrogen peroxide transducer based on transition metal hexacyanoferrates // *Anal. Chem.* 2011. T. 83, № 6. C. 2359-2363.
195. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L. Amperometric biosensor for glutamate using Prussian Blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide // *Anal. Chem.* 2000. T. 72, № 7. C. 1720-1723.
196. Karyakin A. A., Kuritsyna E. A., Karyakina E. E., Sukhanov V. L. Diffusion controlled analytical performances of hydrogen peroxide sensors: Towards the sensor with the largest dynamic range // *Electrochim. Acta.* 2009. T. 54, № 22. C. 5048-5052.
197. Voronin O. G., Hartmann A., Steinbach C., Karyakin A. A., Khokhlov A. R., Kranz C. Prussian Blue-modified ultramicroelectrodes for mapping hydrogen peroxide in scanning electrochemical microscopy (SECM) // *Electrochem. Commun.* 2012. T. 23. C. 102-105.
198. Karyakin A. A., Kotel'nikova E. A., Lukachova L. V., Karyakina E. E., Wang J. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: Improvement of first-generation biosensors // *Anal. Chem.* 2002. T. 74, № 7. C. 1597-1603.
199. Орлов А. В., Киселева С. Г., Юрченко О. Ю., Карпачева Г. П. Особенности окислительной полимеризации анилина в присутствии дополнительно внесенного субстрата // *Высокомолек. соед. А.* 2000. T. 42. C. 2023-2032.

200. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes // *Electrochem. Commun.* 1999. T. 1. C. 78-82.
201. Ricci F., Amine A., Palleschi G. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability // *Biosen. Bioelectron.* 2003. T. 18. C. 165-174.
202. Hopkins R. H., Roberts R. H. The kinetics of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeast. II. The relative rates of fermentation of glucose and fructose // *Biochem. J.* 1935. T. 29. C. 931-936.
203. Illanes A., Wilson L., Tomasello G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. T. 27, № 3-5. C. 270-278.
204. Jurado E., Camacho F., Luzón G., Vicaria J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. T. 31, № 3. C. 300-309.
205. Ladero M., Santos A., García J. L., Carrascosa A. V., Pessela B. C. C., García-Ochoa F. Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis* // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. T. 30, № 3. C. 392-405.
206. De Maio A., El-Masry M. M., Portaccio M., Diano N., Di Martino S., Mattei A., Bencivenga U., Mita D. G. Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes: Part 1. Isothermal conditions // *J. Mol. Catal. B.* 2003. T. 21, № 4-6. C. 239-252.
207. Samoshina N. M., Samoshin V. V. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidases // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. T. 36, № 2-3. C. 239-251.