

Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных поколений

С. В. Дзядевич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

В обзоре рассмотрены основные электрохимические принципы, лежащие в основе применения амперометрического метода в биоаналитической практике, приведены возможные варианты подключений электродов. Амперометрические биосенсоры классифицированы по трем группам (безмедиаторные, медиаторные и основанные на прямом переносе электронов), которые подробно описаны, приведены их примеры, и указаны преимущества и недостатки.

Введение. Амперометрические биосенсоры — самый распространенный, обширный и успешный в плане коммерциализации класс приборов биомолекулярной электроники. Почему именно амперометрические биосенсоры? Прежде всего, потому, что именно с них началось развитие этой новой области аналитической биотехнологии.

Первые исследования в области биосенсоров, и именно амперометрических датчиков, были инициированы Кларком, опубликовавшим в 1956 году работу по кислородному электроду [1]. Основываясь на этих экспериментах, он вместе с Лионсом сделал доклад на симпозиуме Нью-Йоркской Академии Наук, в котором предложил, как «сделать электрохимический сенсор более разумным», добавив к нему «ферментный преобразователь в форме мембранного сэндвича». Эта концепция была проиллюстрирована экспериментами, в которых глюкозооксидазу помещали на чувствительную поверхность кислородного «электрода Кларка», покрытую полупроницаемой диализной мембраной, и отделяли от измеряемого раствора дополнительной диализной мембраной [2]. В этой же работе Кларк и Лионс впервые ввели понятие «ферментный электрод», ошибочно приписываемое многими авторами Апдайку и Хиксу [3], которые в дальнейшем развили эту идею и применили для создания биосен-

сора гель с захваченным в нее ферментом. Они же первыми детально описали ферментный глюкозный электрод, оказавшийся несколько проще Кларковского и имевший лучшую операционную стабильность. Именно эти первые работы и заложили основы успешного развития и дальнейшей коммерциализации амперометрических биосенсоров.

В общем случае амперометрический метод основан на измерении плотности тока, протекающего в электрохимической ячейке, при постоянном прикладываемом потенциале. Эта плотность тока — функция электрохимически активных частиц раствора, окисление или восстановление которых происходит на поверхности рабочего электрода. Во время электролиза рабочий электрод может быть как анодом, так и катодом в зависимости от природы анализируемого вещества и прикладываемого потенциала. Амперометрический метод детекции очень широко используется в аналитической практике, поскольку при определенных условиях концентрация определяемого субстрата может быть ниже 10^{-8} М, а динамический диапазон — 3—4 порядка.

Амперометрические биосенсоры можно разделить на три основных класса.

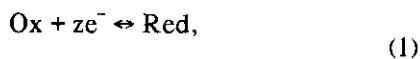
1. Датчики, в основе работы которых лежит измерение концентрации естественных субстратов и продуктов ферментативной реакции (безмедиаторные амперометрические биосенсоры).

2. Сенсоры, использующие медиаторы в качестве переносчиков электронов с активного центра фермента на электрод (медиаторные амперометрические биосенсоры).

3. Амперометрические биосенсоры, основанные на прямом переносе электронов между белком и электродом.

В данном обзоре рассмотрены основные электрохимические принципы, лежащие в основе применения амперометрии в биоаналитической практике, приведены возможные варианты подключений электродов, подробно описаны существующие на данный момент классы амперометрических биосенсоров, их преимущества и недостатки.

Основные электрохимические принципы, лежащие в основе амперометрического метода измерений. Если к электроду прикладывать электрический потенциал, то в электрохимической системе электрод/раствор происходят изменения. Эти изменения имеют как химическую, так и физическую природу и в совокупности называются электродным процессом. Основной стадией такого процесса является непосредственный обмен заряженными частицами между электродом и раствором, когда заряженные электроны движутся через границу раздела электрод/раствор, а именно — процессы окисления и восстановления. Эта стадия называется реакцией переноса заряда (или электрохимической стадией). Вещества, непосредственно участвующие в реакции переноса заряда, называются электроактивными. Обычно они находятся в восстановленной (Red) или в окисленной (Ox) форме и образуют редокс-пару. Саму реакцию обмена можно записать следующим образом:



где ze^- — количество электронов, прошедших через границу раздела электрод/раствор.

Этот процесс подчиняется закону Фарадея, который определяет количественные соотношения между выходом электродной реакции по веществу и зарядом, прошедшим через электрод, и поэтому называется фарадеевским. Электрический ток, связанный с ним, называется также фарадеевским, в отличие от нефарадеевских токов, наблюдающихся при отсутствии переноса заряда через границу раздела электрод/раствор. Такие нефарадеевские токи генерируются изменениями площади электрода, его потенциала и состава раствора в процессе адсорбции и десорбции. Также в результате перераспределения заряженных и полярных частиц на поверхности электрода может генерироваться емкостный заряд, также вызывающий нефарадеевский ток.

В принципе фарадеевский и нефарадеевский токи генерируются только в том случае, когда имеют место электродные реакции. В то же время, если прикладывать потенциал, равный потенциалу окисления или восстановления, то скорость переноса электронов между редокс-частицами и электродом будет очень большой, и фарадеевский ток будет контролироваться скоростью диффузии частиц к электроду. В этом случае говорят о концентрационной поляризации. Возможен случай, когда лимитирующей стадией является стадия переноса заряда, тогда говорят об электрохимической поляризации. Электродные процессы часто классифицируют по этому признаку.

В общем скорость электрохимической реакции на электроде определяется как скорость реакции, деленная на единицу площади электрода, и выражается плотностью тока I , который является алгебраической суммой катодного I_k (восстановление) и анодного I_a (окисление) токов.

$$I = I_k + I_a, \quad (2)$$

где

$$I_k = zFk_k C_{\text{Ox}}; \quad (3)$$

$$I_a = -zFk_a C_{\text{Red}}. \quad (4)$$

В данных выражениях z — заряд; F — константа Фарадея; C_{Ox} и C_{Red} — концентрации частиц Ox и Red; k_k и k_a — коэффициенты скорости, являющиеся функциями потенциала электрода. Расписав эти коэффициенты, получим соотношение между плотностью тока и приложенной к границе раздела электрод/электролит разностью потенциалов, которое называется основным уравнением электрохимической кинетики [4].

$$I = zFk_0 C_{\text{Ox}} \exp[-\alpha zF(E - E_0)/RT] - zFk_0 C_{\text{Red}} \exp[(1 - \alpha)zF(E - E_0)/RT], \quad (5)$$

где k_0 — стандартная константа скорости реакций переноса заряда; α — коэффициент переноса электрона, характеризующий влияние двойного электрического слоя, действующего на прямую реакцию; E_0 — стандартный редокс-потенциал; R — газовая постоянная; T — температура.

Для изучения продуктов электрохимической реакции широко применяется метод циклической вольтамперометрии. Этот метод имеет особенно большое значение на стадии предварительных исследований, поскольку каждая особенность вольтамперных кривых отвечает определенному явлению. Рассмотрим типичную циклическую вольтамперограмму (рис. 1).

В начальной точке A ток мал. Между точками A и B наблюдается очень медленный рост тока,

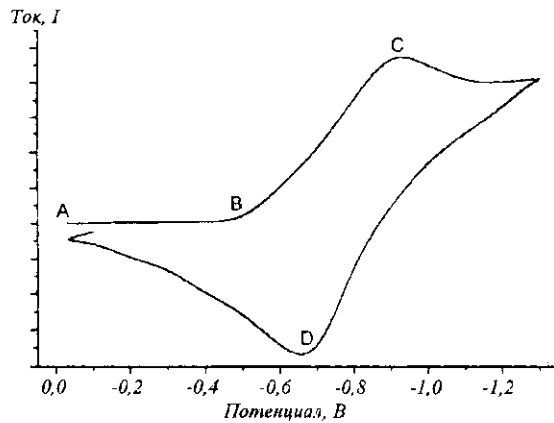


Рис. 1. Типичная циклическая вольтамперограмма восстановления

обусловленный нефарадеевскими взаимодействиями, а именно — адсорбционными и емкостными эффектами. Иногда такой ток называют фоновым. В точке *B* потенциал приближается к потенциалу восстановления *Ox*-частицы. Увеличение потенциала заставляет электроны двигаться с электрода на *Ox*-частицу, тем самым увеличивая скорость ее восстановления и соответственно ток. Восстановленная форма участвует в обратном процессе.

Когда прикладываемый потенциал *E* увеличивается, то увеличивается и I_k , что выражается в росте общего тока (участок *B—C*). Однако этот рост не продолжается до бесконечности, так как в процессе восстановления концентрация катода *Ox*-частиц уменьшается, т. е. на ток накладываются диффузионные ограничения, о чем упоминалось ранее. В результате на вольтамперограмме наблюдается пик восстановления (точка *C*) и дальнейшее уменьшение тока. Соотношение концентраций окисленной и восстановленной форм описывается уравнением Нерста [5].

$$C_{Ox}/C_{Red} = \exp[(E - E_0)zF/RT]. \quad (6)$$

Значение для такого диффузионно-лимитирующего тока выводится из законов Фика. Для нашего случая (обратимая реакция) оно получено Рэндлсом и Шевчиком [4] и имеет вид:

$$I_n = 2,72 \cdot 10^5 z^{3/2} D_{Ox}^{1/2} C_{Ox} V^{1/2}, \quad (7)$$

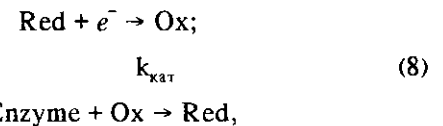
где *V* — скорость развертки потенциала; D_{Ox} — коэффициент диффузии.

Очевидно, что ток в максимуме кривой растет пропорционально концентрации восстанавливаемого вещества *Ox* и корню квадратному из скорости развертки. Это один из главных результатов, используемых в анализе.

Когда в процессе восстановления количество *Ox*-частиц на поверхности электрода начинает уменьшаться, их место занимают *Red*-частицы. При изменении направления прикладываемого к электроду потенциала в обратную сторону наблюдается обратный эффект. В случае достижения значения редокс-потенциала *Red*-частицы начинают переокисляться до *Ox*-частиц. Ток увеличивается в обратном (окислительном) направлении до тех пор, пока не будет достигнут пик окисления. На рис. 1 показаны оба пика, один соответствует восстановлению субстрата (*C*), другой — переокислению продукта обратно в субстрат (*D*).

Кроме этого, в полностью обратимой системе стандартный редокс-потенциал, т. е. потенциал, при котором на поверхности электрода присутствуют обе формы частицы в одинаковых концентрациях, равен потенциалу полуволны $E_{1/2}$, т. е. потенциалу, при котором величина тока равна половине максимального значения тока.

Все вышеизложенное можно применить и к реакциям, в которых участвуют каталитические компоненты, например ферменты. В этом случае реакция протекает следующим образом:



где $k_{\text{кат}}$ — псевдо-константа первого порядка.

В такой системе восстановленная форма частицы может быть регенерирована с помощью фермента. Если значение $k_{\text{кат}}$ мало, то ферментативная реакция не будет иметь значительного эффекта на наклон вольтамперограммы и мы имеем типичную вольтамперометрическую кривую для обратимой реакции. Если же значение $k_{\text{кат}}$ велико, то *Ox*-частицы будут очень быстро восстанавливаться с помощью фермента и мы получим значительные изменения на вольтамперограмме, выражающиеся в наличии плато вместо пика (*C*). Ток в районе плато описывается следующим уравнением [6]:

$$I = \frac{zFC_{Ox}(D_0k_{\text{кат}})^{1/2}}{1 + \exp[zF/RT(E - E_{1/2})]}, \quad (9)$$

где D_0 — коэффициент диффузии электроактивных частиц; C_{Ox} — концентрация *Ox* в объеме раствора.

Значение $k_{\text{кат}}$ может быть определено экспериментально при использовании соотношения между диффузионно-контролируемым током и каталитическим током [7].

Электроды и варианты подключений, используемые в амперометрии. В общем случае амперометрический метод определяется как плотность

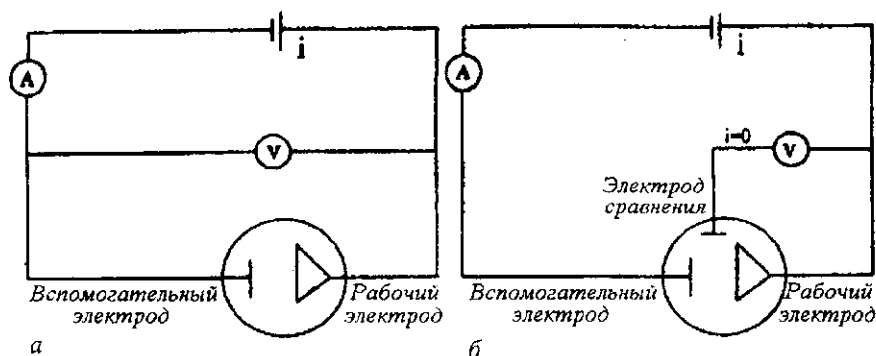


Рис. 2. Схематическое изображение двухэлектродной (а) и трехэлектродной (б) схем подключения для амперометрических измерений

тока (или ток), протекающего через электрохимическую ячейку при постоянном приложенном потенциале. Амперометрический преобразователь и, следовательно, биосенсор чаще всего состоит из трех электродов. Двухэлектродные системы также используются и даже более предпочтительны в прикладном аспекте применения и коммерциализации. Две основные схемы подключения амперометрического биосенсора представлены на рис. 2.

Один электрод — это рабочий электрод, на который наносится биологически чувствительный слой. Когда прикладывается положительный потенциал, то все молекулы, окисляющиеся на поверхности электрода, отдают свои электроны электроду, т. е. осуществляется переход электронов из раствора в электрод. При отсутствии второго электрода из-за стехиометрического разбаланса генерировалась бы большая разность потенциалов. Поэтому функция вспомогательного электрода и состоит в завершении цепи, когда электроны через внешнюю цепь под действием приложенного напряжения могут вернуться назад в раствор. Очевидно, что это приводит к процессу восстановления на вспомогательном электроде, эквивалентному по величине процессу окисления на рабочем электроде. Этот поток электронов и формирует ток амперометрического датчика. Наиболее приемлемыми электродными материалами являются благородные металлы и различные формы углерода. Однако двухэлектродная схема подключения имеет один существенный недостаток. Когда между двумя электродами прикладывается потенциал, то, как было подчеркнуто ранее, ток генерируется сразу на двух границах раздела электрод/раствор. Следовательно, неизвестно, какая часть потенциала теряется на каждой поверхности двух электродов, т. е. мы не знаем точно, какой электрод пары является определяющим в измерениях тока. Этот ток можно определить и как баланс между двумя электрода-

ми. Для решения этой проблемы необходимо, чтобы вспомогательный электрод не лимитировал общего тока, другими словами, чтобы реакция на его поверхности протекала очень быстро. Достигается это при использовании для вспомогательного электрода поверхности значительно большей площади по сравнению с рабочим электродом.

Указанный недостаток исчезает, если мы используем трехэлектродную схему подключения (рис. 2, б). В этом случае третий электрод системы — это электрод сравнения, который должен содержать материал известного химического состава, включающий обе формы редокс-пары. Обычно это $Hg/HgCl_2$ (насыщенный каломельный электрод) или $Ag/AgCl$ (хлор-серебряный электрод). Так как прикладываемый потенциал фиксирован, то электрод сравнения принимает стабильную точку, относительно которой может измерять рабочий электрод. Следовательно, приложенный потенциал контролируется между рабочим электродом и электродом сравнения, а ток измеряется между рабочим и вспомогательными электродами.

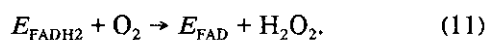
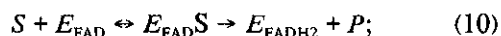
После предварительной калибровки зависимости тока от концентрации определенных электроактивных частиц амперометрический преобразователь с нанесенной биоселективной мембраной можно использовать как биосенсор.

Безмедиаторные амперометрические биосенсоры. Первая группа амперометрических биосенсоров — это датчики, в основе работы которых лежит измерение концентрации естественных субстратов или продуктов ферментативной реакции. В ходе любой реакции образуются продукты и поглощаются субстраты. Если они являются электроактивными частицами, то соответственно их концентрация может быть непосредственно измерена с помощью амперометрического преобразователя. Первый класс ферментов, в основном, катализирующих реакции такого типа, — это различные оксидазы

Таблица 1
Некоторые оксидазы и дегидрогеназы, используемые при создании амперометрических биосенсоров

Фермент	Субстрат	Литературный источник
<i>Оксидазы</i>		
Глюкозооксидаза	Глюкоза	[8—10]
Лактатоксидаза	Лактат	[11, 12]
Холиноксидаза	Холин	[13, 14]
Алкогольоксидаза	Этанол	[15, 16]
	Метанол	[17, 18]
	Формальдегид	[19]
Глутаматоксидаза	Глутамат	[20]
Триптофан-2-монооксигеназа	Триптофан	[21]
Лизиноксидаза	Лизин	[22, 23]
Ксантинооксидаза	Гипоксантин	[24]
<i>Дегидрогеназы</i>		
Альдегиддегидрогеназа	Альдегиды	[27]
Алкогольдегидрогеназа	Этанол	[28—30]
Лактатдегидрогеназа	Лактат	[30—32]
Глутаматдегидрогеназа	Глутамат	[32, 33]
Глюкозодегидрогеназа	Глюкоза	[9]
Глицеролдегидрогеназа	Глицерин	[33]

(табл. 1). Схему, по которой происходят ферментативные реакции с участием оксидаз, можно представить следующим образом:



В основе работы большинства сенсоров подобного типа лежит поглощение кислорода в ходе биокаталитической реакции, измеряемое с помощью катодного восстановления O_2 на электроде при потенциале $-0,7$ В, или биокаталитическая генерация перекиси водорода, которая измеряется с помощью анодного окисления H_2O_2 на электроде при потенциале $+0,65$ В (рис. 3).

Основным элементом амперометрического биосенсора является ферментная мембрана. Существует целый ряд методов иммобилизации ферментов в мембрану, многие из которых подробно описаны [22, 25]. Следующий элемент — это внешняя защитная мембрана, выполняющая несколько важных функций. Во-первых, она является защитным барьером, не позволяющим большим молекулам, таким как белки, проникать внутрь ферментной мембраны. Во-вторых, она не позволяет молекулам фермента покидать ферментную мембрану. Но она также должна быть полностью проницаема для молекул субстрата. К сожалению, эти мембраны часто проницаемы и для разных интерферирующих частиц. Поэтому, как правило, применяют внутреннюю полупроницаемую мембрану, которая непроницаема для интерферирующих частиц. Это общая схема строения такого рода амперометрических биосенсоров. Возможны также варианты, когда используется только одна мембрана, выполняющая функции всех трех вышеперечисленных [26].

Второй класс ферментов, широко используемых в амперометрических сенсорах первой группы, — это дегидрогеназы (табл. 1). Схему, по которой происходят ферментативные реакции с участием дегидрогеназ, можно представить таким образом:

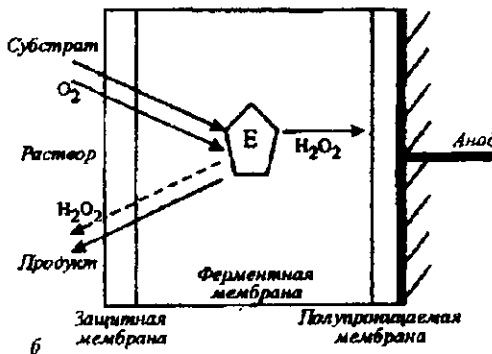
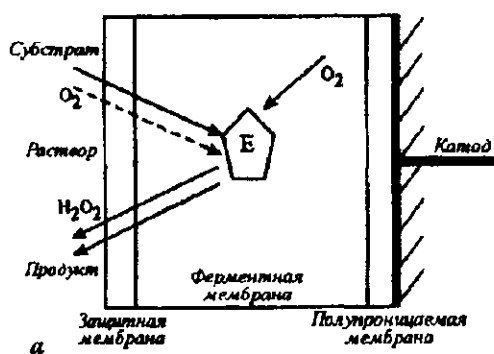
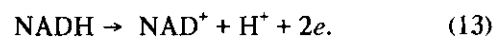
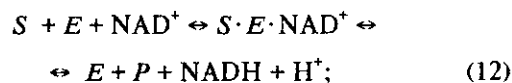


Рис. 3. Общий механизм работы амперометрического биосенсора, базирующегося на определении кислорода (а) и перекиси водорода (б)

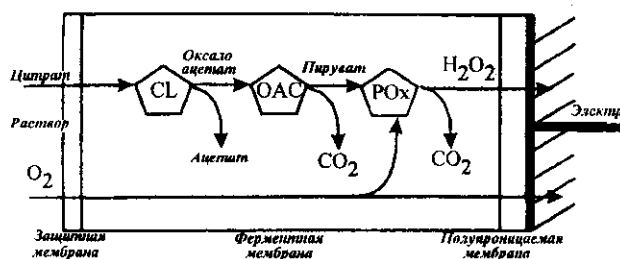


Рис. 4. Принцип работы мультиферментного амперометрического биосенсора для определения цитрата. Здесь *CL* — цитрат-лиаза, *ОАК* — оксалоацетатдекарбоксилаза, *ПОх* — пируватоксидаза

Также могут применять гидролитические ферменты, если в ходе реакции продуцируются электроактивные частицы (например, щелочная фосфатаза [34]).

К этой же группе амперометрических биосенсоров относятся датчики, на поверхность которых коиммуобилизовано одновременно несколько ферментов. В такой системе продукт одной ферментативной реакции является субстратом для другой. Однако конечным продуктом должно быть электроактивное вещество (рис. 4). В табл. 2 приведены примеры таких систем.

Основные недостатки первой группы амперометрических биосенсоров:

- необходимость преподготовки электродов для получения воспроизводимой поверхности и влияние на отклик сенсора геометрии электродов;
- влияние на отклик биосенсора массопереноса частиц через биокаatalитические и полупроницаемые мембраны;
- необходимость постоянной подкалибровки сенсоров из-за фарадеевских процессов на электродах, особенно при долговременном использовании;
- постоянная коррекция данных из-за влияния фонового раствора, вызываемого интерференцией с неспецифическими электроактивными частицами, всегда присутствующими в растворе.

Для устранения первого недостатка применяют полировку поверхности, термическую и химическую обработки, циклическую вольтамперометрию. Все это часто приводит к улучшению воспроизводимости отклика. Однако после долговременной экспозиции в исследуемом растворе электрод по-прежнему часто не дает воспроизводимых результатов. Возможные пути решения этой проблемы — это химическая модификация поверхности [27, 45], использование высокопроводящих органиче-

ских материалов [46, 47] или редокс-полимеров [48]. В частности, проводящие органические соли, полученные из *N*-метилфеназина (NMP) и тетрацианохинодиметана (TCNQ), успешно применяли в сенсорах на основе дегидрогеназ [47, 49], а проводящие органические соли на основе тетрацианохинодиметана (TCNQ) и тетрагидрофульвалена (TTF) использовали как электродный материал в биосенсорах на основе оксидаз [50].

Важным моментом также является подбор геометрии электродов, особенно при миниатюризации сенсоров [51].

Массоперенос частиц в ходе реакции включает в себя следующие процессы: диффузия субстрата к поверхности мембраны, диффузия субстрата через мембрану к активному центру фермента, генерация перекиси водорода или поглощение кислорода и их диффузия к поверхности электрода.

На практике часто используют интенсивное перемешивание, что уменьшает толщину диффузионного слоя и соответственно его влияние на величину отклика. Но влияние мембран остается и его надо всегда учитывать при анализе откликов, а искусственно изменяя диффузионные коэффициенты для субстратов, можно регулировать диапазон работы сенсора, время отклика и его чувствительность [52].

Однако основными проблемами использования амперометрических сенсоров первого типа являются необходимость постоянной подкалибровки и коррекции сигнала и учет электроактивных интерферирующих частиц, таких как аскорбиновая кислота, мочева кислота, глутатион и других. Для

Таблица 2
Примеры мультиферментных систем, используемых в амперометрических биосенсорах

Субстрат	Ферментная система	Литературный источник
Цитрат	Цитратлиаза—оксалоацетатдекарбоксилаза—пируватоксидаза	[35, 36]
Сахароза	Инвертаза—глюкозооксидаза	[37]
Мальтоза	Амилоглюкозидаза—глюкозооксидаза	[38, 39]
Лактоза	β -Галактозидаза—глюкозооксидаза	[40, 41]
Ацетилхолин	Ацетилхолинэстераза—холиноксидаза	[42]
Фосфат	Щелочная фосфатаза—глюкозооксидаза	[43]
Лецитин	Фосфолипаза—холиноксидаза	[44]

решения этих проблем проще всего применять дифференциальный режим измерений [26, 53], когда учитывается разность сигналов между ферментным электродом и идентичным ему электродом, не содержащим фермента. Также можно использовать различные заряженные диализные мембраны [34, 54]. Самые распространенные для этой цели материалы — ацетат-целлюлоза и поликарбонатные или поливинилхлоридные пленки. Именно использование этих диализных мембран позволило улучшить стабильность сенсоров и работать в реальных биологических жидкостях в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*.

Медиаторные амперометрические биосенсоры. Вторая группа амперометрических биосенсоров включает в себя датчики, использующие в качестве переносчиков электронов альтернативные окисляющие агенты — медиаторы. Это позволяет работать с более низкими потенциалами, тем самым уменьшая влияние кислорода на отклик (случай оксидаз) и в какой-то мере решая вопрос влияния различных интерферирующих частиц. В табл. 3 приведены некоторые важные редокс-потенциалы, применяемые в амперометрических измерениях.

Принцип работы медиаторного амперометрического сенсора показан на рис. 5.

В общем случае медиатор — это низкомолекулярная частица, переносящая электрон между редокс-центром фермента и рабочим электродом. В этом случае реакции (11) и (13) принимают вид:



Все медиаторы можно разделить на две группы: «натуральные» и «искусственные» электронные переносчики (табл. 4). Самые известные и распространенные «искусственные» медиаторы — феррицианид и ферроцен.

В табл. 5 приведены примеры медиаторных амперометрических биосенсоров.

Медиаторы можно добавлять в измеряемый раствор или иммобилизовать на поверхность электрода. Первый вариант, конечно же, проще, однако он нетехнологичен. К тому же, например, органические красители, такие как метиленовый синий, фталоцианин или фиолетовый, являются токсичными, нестабильными в восстановлении, pH-зависимыми и часто просто самоокисляются. Оптимальный вариант, который к тому же более технологичный, — это иммобилизованные медиаторы.

Одним из недостатков, сдерживающих развитие биосенсоров на основе иммобилизованных медиаторов, является низкая стабильность таких

датчиков. Для решения этой проблемы применяли различные методы. В простейшем случае порошок медиатора смешивали с углеродной пастой (смесь жидкого парафина с порошком графита) и таким образом изготавливали карбоновый электрод, на который уже затем адсорбировался фермент [67]. В данном варианте также использовали диализную мембрану, которая предохраняла компоненты от вымывания в раствор. В других случаях медиаторы просто адсорбировали на поверхность электрода. Например, в работе [68] каплю раствора диметилферроцена в толуоле наносили на поверхность электрода и уже после испарения толуола иммобилизовали глюкозооксидазу. Но в таком варианте на характеристики сенсора начинает оказывать влияние растворимость медиатора. Когда сенсор погружают в водный раствор, нерастворимый медиатор остается на поверхности. Однако при прикладывании потенциала образуются ионы феррицианида, которые очень хорошо растворимы в водных растворах и сразу же вымываются, тем самым уменьшая количество медиатора на поверхности электрода и соответственно отклик сенсора.

Для преодоления этого недостатка были разработаны и исследованы проводящие полимеры, модифицированные медиаторами [69]. В этой работе полипирольную пленку из раствора ацетонитрила наносили на поверхность золотого электрода, а затем к ней ковалентно пришивали ферроценкарбонилхлорид и глюкозооксидазу. Полученный таким образом электрод был стабилен в присутствии раствора глюкозы на протяжении 5 дней.

Таблица 3
Редокс-потенциалы для некоторых реакций при pH 7

Реакция	E, В	Реакция	E, В
Ацетат—ацетальдегид	-0,6	Оксалоацетат—L-малат	-0,17
Ацетон—пропан-2-ол	-0,43	Фумарат—сукцинат	0,03
$\text{H}^+ - \text{H}_2$	-0,42	Дегидроаскорбат—аскорбат	0,06
Ксантин—гипоксантин	-0,37	Убихинон—восстановленный убихинон	0,10
$\text{NAD}^+ - \text{NADH}$	-0,32	Ферроцен	0,17
Окисленный—восстановленный глутатион	-0,23	$\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}_2$	0,31
Цистин—цистеин	-0,22	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} - [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	0,45
Ацетальдегид—этанол	-0,20	$\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$	0,53
Пируват—L-малат	-0,19	$\text{O}_2 - \text{H}_2$	0,82

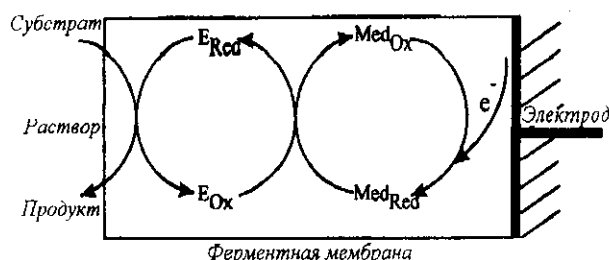


Рис. 5. Принцип работы амперометрического медиаторного биосенсора. Здесь E_{Red} , E_{Ox} — восстановленная и окисленная формы фермента, Med_{Red} , Med_{Ox} — восстановленная и окисленная формы медиатора

Еще одним способом решения проблемы вымывания медиатора из мембраны является введение медиатора и фермента в коллоидную графитовую эмульсию, сверху которой фиксируется катионная мембрана [70]. Таким образом, положительно заряженные ионы феррициниума удерживаются на поверхности электрода. Электрод прост в изготовлении, имеет быстрое время отклика и достаточно широкий диапазон определения глюкозы, при хранении на протяжении 6 месяцев в сухом виде остаточная активность фермента была до 70 %.

При выборе медиаторов всегда необходимо учитывать следующие факторы:

- прикладываемый потенциал должен быть меньше потенциала восстановления кислорода;
- восстановленный медиатор не должен реагировать с кислородом;
- электронный перенос между восстановленным медиатором и ферментом должен быть очень быстрым;
- медиатор не должен зависеть от pH;
- медиатор должен быть нетоксичным.

Если удовлетворить всем этим требованиям, то можно надеяться на получение амперометрического биосенсора с аналитическими характеристиками, позволяющими работать в реальных условиях на протяжении длительного времени.

Амперометрические сенсоры, основанные на прямом переносе электронов. В основе работы амперометрических биосенсоров третьей группы лежит прямой перенос электронов между ферментом и электродом. Этот феномен также часто называют биоэлектрокатализом. Основные свойства, характеризующие амперометрические биосенсоры, основанные на прямом переносе электронов, и отделяющие их от остальных амперометрических

сенсоров, связаны с каталитической природой процесса в целом и с тем, что перенос электрона с электрода на молекулу субстрата и наоборот осуществляется непосредственно через активный центр фермента в отсутствие каких-либо переносчиков.

Согласно теории электронного переноса [71, 72], константа скорости прямого электрохимического взаимодействия между донором и акцептором определяется разностью потенциалов между редокс-центром фермента и электродом, энергией преобразования при переносе электронов и наиболее сильно — расстоянием между активным сайтом фермента и поверхностью электрода. Пептидное окружение пространственно отделяет редокс-сайт фермента от поверхности электрода и практически изолирует активный центр от электрического контакта с поверхностью электрода. Поэтому и необходимо установление электрического контакта между редокс-белком и электродом, для чего применяют медиаторы в качестве переносчиков электронов [55—66], а также различные модифицированные поверхности электродов [27, 45—50]. Эти способы подробно рассматривались выше при описании медиаторных и безмедиаторных амперометрических биосенсоров. Однако некоторые авторы иногда ошибочно причисляют эти сенсоры к классу амперометрических биосенсоров на основе прямого переноса электронов. В случае же биоэлектроката-

Таблица 4
Некоторые «натуральные» и «искусственные» медиаторы и их редокс-потенциалы при pH 7

«Натуральные» медиаторы	Е, В	«Искусственные» медиаторы	Е, В
Цитохром a_3	+0,29	Феррицианид (гексацианоферрат (III))	+0,45
Цитохром c_3	+0,24	2,6-Дихлорфенол	+0,24
Убихинон	+0,10	Индофенол	+0,24
Цитохром b	+0,08	Ферроцен	+0,17
Витамин K_2	-0,03	Феназин метасульфат	+0,07
Рубредоксин	-0,05	Метиленовый синий	+0,04
Флавопротеины	-0,03 ÷ +0,2	Фталоцианин	-0,02
FAD-FADH ₂	-0,23	Феносафранин	-0,23
FMN-FMNH ₂	-0,23	Бензил фиолетовый	-0,36
NAD ⁺ -NADH	-0,32	Метил фиолетовый	-0,46
NAPD ⁺ -NADPH	-0,32		
Ферродоксин	-0,43		

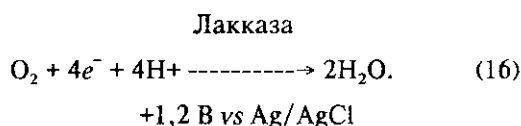
Таблица 5
Примеры медиаторных амперометрических биосенсоров

Субстрат	Фермент	Медиатор	Источник
Глюкоза	Глюкозооксидаза	Ферроцен	[55—57]
Фруктоза	D-фруктозодегидрогеназа	Феррицианид	[58, 59]
Лактат	Лактатоксидаза	Ферроцен	[60, 61]
Глутамат	L-Глутаматоксидаза	Ферроцен	[62, 63]
Лизин	Лизиндегидрогеназа	Феррицианид	[64]
Этанол	Алкогольдегидрогеназа	Феррицианид	[65]
Морфин	Морфиндегидрогеназа	Феназинметасульфат	[66]

лиза электрон сам является косубстратом реакции, и ферментативная и электродная реакции не могут проходить независимо друг от друга.

Прямой электронный перенос между цитохромом *c* и электродом впервые был продемонстрирован на электроде из оксида индия, допированном оловом [73], и золотом электроде, модифицированном 4-4' бипиридином [74] с помощью циклической вольтамперометрии. В то же время было показано, что цитохром *c*₃ из *Desulfovibrio vulgaris* способен обмениваться электронами с ртутным электродом [75]. С этого момента публикуется ряд работ по прямому переносу электронов между цитохромом *c* и другими редокс-белками и различными как модифицированными, так и немодифицированными электродами. Эти работы подробно рассмотрены в обзорах Армстронга [76, 77]. Однако с точки зрения создания биосенсоров более интересен прямой электронный перенос между редокс-ферментами и электродом.

Тарасевич и соавт. впервые проанализировали безмедиаторный биоэлектродный катализ грибковой лакказы (голубая медь-содержащая оксидаза) [78]. Они получили восстановление кислорода на сажем углеводном электроде с иммобилизованной лакказой при потенциале +1,2 В относительно хлор-серебряного электрода при pH 5,0:

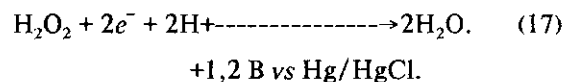


Позднее этот феномен был исследован более

детально с обсуждением возможного механизма биоэлектродного катализа реакции, который оказался достаточно сложным [79, 80]. Ли с соавт. также получили каталитический ток восстановления кислорода в воде на лакказном графитовом электроде [81]. Биоэлектродный катализ был подобным, но не полностью идентичным с работой Тарасевича и соавт. Потенциал каталитического восстановления кислорода был +0,74 В относительно каломельного электрода при pH 4,7, что, конечно же, отличается от значения +1,2 В, полученного ранее [78—80], и эта разница может быть связана с различиями в электродных материалах.

Электрохимическое восстановление пероксидазы хрена впервые изучено Ярополовым и соавт. на сажем углеводном электроде при потенциале менее +1,2 В относительно каломельного электрода [82]:

Пероксидаза



С этого момента биоэлектродный катализ пероксидазы и его применение при создании биосенсоров для определения перекиси водорода было исследовано большим числом авторов с использованием различных электродных материалов (золото, платина, пиролизный графит, углеродная паста, сажем или активированный углерод) [83—86]. В работе [87] уделено особое внимание важности пероксидазно-каталитического восстановления перекиси, образующейся в реакциях с оксидазами, для разработки амперометрических сенсоров. На рис. 6 представлена схема прямого восстановления пероксидазы на активированном углеводном электроде [88]. Такие электроды демонстрировали великокопные электрокаталитические характеристики и высокую плотность тока в присутствии перекиси при низком потенциале без каких-либо дополнительных электрохимических или физических преобразований поверхности. Прямой электронный перенос между электродом и пероксидазой, выражающийся в электроферментативном восстановлении перекиси водорода, происходил при потенциале +480 мВ относительно хлор-серебряного электрода сравнения.

В работах [89—91] также показана возможность прямого переноса электронов для цитохром *c*-пероксидазы.

Для получения электрического контакта между редокс-центром фермента и поверхностью электрода предложена химическая модификация ре-

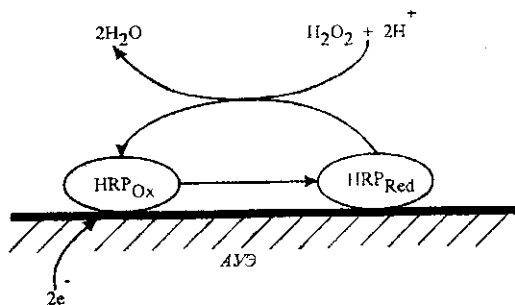


Рис. 6. Схема прямого восстановления пероксидазы на активированном углеродном электроде. *HRP* — пероксидаза хрена, АУЭ — активированный углеродный электрод

докс-белков с помощью редокс-связанных компонентов [92, 93]. Авторы изменили структуру глюкозооксидазы, ковалентно связав 12 ферроцен-карбокисильных кислотных групп с аминогруппами фермента, благодаря чему расстояние электронного переноса сокращается, поскольку группы действуют как электронные ретрансляторы между FAD/FADH₂ редокс-центрами фермента и электродом.

Еще одним дополнительным способом электрически связать редокс-центр фермента с электродом является его иммобилизация в редокс-полимерную матрицу [94, 95]. Таким способом иммобилизовали глюкозооксидазу в ферроцен-модифицированный полимер или в осмий(II)-полипиридин-замещенный полимер, что приводило к биоэлектрокатализу глюкозы [95]. Подобным же образом иммобилизовали нитрат-редуктазу в N,N'-бипиридин-модифицированный политиофен [96].

Электрохимическая активация редокс-ферментов и последующий прямой перенос электронов между ферментом и электродом особенно важны при разработке амперометрических биосенсоров. Такие сенсоры обладают следующими важными преимуществами:

1) высокая чувствительность благодаря высокой плотности тока, которая может позволить миниатюризацию электродов;

2) значительное уменьшение неспецифических интерферирующих откликов благодаря эффективной электрической активации редокс-фермента, способной привести к созданию высокоселективных чувствительных биосенсоров.

Закключение. Таким образом, в представленном обзоре рассмотрены основные принципы и вопросы, касающиеся амперометрических биосенсоров, и подробно описаны все их группы, разработанные на данный момент. Разделение на три группы неслучайно. Кроме основных принципов,

лежащих в основе такого разделения, — это еще и три различные генерации приборов.

В основе первой генерации амперометрических биосенсоров лежит электроактивность субстратов и продуктов ферментативной реакции. Главные их недостатки — это высокий прикладываемый к электродам потенциал и интерференция с неспецифическими электроактивными частицами. Однако на основе именно этих сенсоров в 1975 г. фирмой «Yellow Spring Instruments» (США) был выпущен первый коммерческий вариант биосенсора [97].

Вторая генерация амперометрических биосенсоров основана на использовании медиаторов как переносчиков электронов. С их помощью удалось уменьшить прикладываемый потенциал и интерференцию с неспецифическими электроактивными частицами. Однако, во-первых, медиаторы необходимо было связать с электродом, что усложняло технологию, и, во-вторых, иногда возникала проблема их участия в других интерферирующих реакциях. Несмотря на это, именно к данной группе сенсоров относится большинство коммерческих вариантов биосенсоров, в том числе самый известный глюкозный сенсор фирмы «MediSense» (США) [98].

В основе третьей генерации амперометрических биосенсоров лежит прямой перенос электронов между ферментом и электродом. Кроме того, они обладают высокой селективностью, чувствительностью и полным отсутствием интерферирующих частиц и взаимодействий. Особенно привлекательным свойством этих систем является возможность модуляции необходимых характеристик аналитических приборов, применяя, с одной стороны, модификацию белков с помощью генной или химической инженерии [92, 93], а, с другой, — новые технологии создания чувствительной поверхности [96, 99].

Более подробно о коммерческих вариантах амперометрических биосенсоров, об использовании новейших технологий микроэлектроники и биотехнологии при их конструировании, различных методах иммобилизации, а также областях их применения будет описано в следующем обзоре.

Часть этой работы выполнена благодаря финансовой поддержке фонда INTAS (проект № 00-0751).

S. V. Dzyadevych

Amperometric biosensors. Key work principles and features of transducers of different generations

Summary

The key electrochemical principles connected with application of

amperometric method in bioanalytical practice were considered, and the possible measuring electrode circuits were shown. Amperometric biosensors were classified on three groups such as unmediated, mediated and based on direct transfer of electrons, which were described in detail, and their advantages and disadvantages were shown.

С. В. Дзядевич

Амперометричні біосенсори. Основні принципи роботи та особливості датчиків різних генерацій

Резюме

В огляді розглянуто основні електрохімічні принципи, які лежать в основі застосування амперометричного методу визначення в біоаналітичній практиці, представлено можливі варіанти підключення електродів. Амперометричні біосенсори класифіковано на три групи (безмедіаторні, медіаторні та на основі прямого переносу електронів), які докладно описано, наведено їхні приклади та вказано на переваги та недоліки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark L. C., Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions // *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs.*—1956.—2.—P. 41—48.
2. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // *Ann. New York Acad. Sci.*—1962.—102.—P. 29—45.
3. Updike S. J., Hicks G. P. The enzyme electrode // *Nature.*—1967.—214.—P. 986—988.
4. Корыта И., Дворжак И., Богачкова В. *Электрохимия.*—М.: Мир, 1977.—472 с.
5. Hall E. *Biosensors.*—Cambridge: Open Univ. press, 1991.
6. White S. F., Turner A. P. F. Mediated amperometric biosensors // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment* / Ed. E. Kress-Rogers.—New York: CRC press, 1997.—P. 227—244.
7. Davis G. Electrochemical techniques for the development of amperometric biosensors // *Biosensors.*—1985—1.—P. 161—168.
8. Warsinke A. Biosensors for food analysis // *Frontiers in Biosensors II. Practical Applications* / Eds F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz.—Basel: Birkhauser, 1997.—P. 121.
9. Tran Minh C. *Biosensors.*—London: Chapman & Hall, 1993.
10. Pfeiffer D. Commercial biosensors for medical application // *Frontiers in Biosensors II. Practical Applications* / Eds F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz.—Basel: Birkhauser, 1997.—P. 149—160.
11. Bardeletti G., Sechaud F., Coilet P. R. A reliable L-lactate electrode with a new membrane for enzyme immobilization for amperometric assay of lactate // *Anal. Chim. Acta.*—1986.—187.—P. 47—54.
12. Mizutani F., Yamanaka T., Tanabe Y., Tsuda K. An enzyme electrode for L-lactate with chemically amplified electrode // *Anal. Chim. Acta.*—1985.—177.—P. 153—166.
13. Matsumoto K., Seijo H., Karube I., Suzuki S. Amperometric determination of choline with use of immobilized choline oxidase // *Biotech. and Bioeng.*—1980.—22.—P. 1071—1086.
14. Xin Q., Wightman R. M. Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator // *Anal. Chim. Acta.*—1997.—341.—P. 43—51.
15. Verduyn C., Van Dijken J. P., Scheffers W. A. A simple, sensitive, and accurate alcohol electrode // *Biotech. and Bioeng.*—1983.—25.—P. 1049—1055.
16. Boujtita M., Hart J. P., Pittson R. Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer // *Biosensors and Bioelectronics.*—2000.—15.—P. 257—263.
17. Clark L. C., Jr. A family of polarographic enzyme electrodes and the measurement of alcohol // *Biotech. and Bioeng.*—1972.—3.—P. 377—394.
18. Belghit H., Romette J. L., Thomas D. An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol // *Biotech. and Bioeng.*—1987.—30.—P. 1001—1005.
19. Korpan Y. I., Dzyadevich S. V., Arkhipova V. N., Gonchar M. V., Gibson T. D., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Soldatkin A. P. Enzyme-based electrochemical sensors for formaldehyde detection // *Sensors and Materials.*—2000.—12, N 2.—P. 79—86.
20. Wollenberger U., Scheller F., Bohmer A., Passarge M., Muller H. G. A specific enzyme electrode for L-glutamate—development and application // *Biosensors.*—1989.—4.—P. 381—391.
21. Simonian A. L., Rainina E. I., Wild J., Fitzpatrick P. F. A biosensor for L-tryptophan determination based on recombinant *Pseudomonas savastanoi* tryptophan-2-monooxygenase // *Anal. Lett.*—1995.—28.—P. 1751—1761.
22. Saurina J., Hernandez-Cassou S., Alegret S., Fabregas E. Amperometric determination of lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites // *Biosensors and Bioelectronics.*—1999.—14.—P. 211—220.
23. Vrbova E., Marek M., Ralys E. Biosensor for determination of L-lysine // *Anal. Chim. Acta.*—1992.—279.—P. 131—136.
24. Niu J., Yang L. J. Renewable-surface graphite-ceramic enzyme sensors for the determination of hypoxanthine in fish meat // *Anal. Commun.*—1999.—36.—P. 81—83.
25. Egginis B. R. *Biosensors: an introduction.*—Chichester-Stuttgart: John Wiley and Sons and Teubner, 1996.—P. 31—51.
26. Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Россохатый В. К., Шрам Н. Ф., Шульга А. А., Стриха В. И. Амперометрический ферментный биосенсор с мембраной глюкозооксидаза-полианилин // *Укр. биохим. журн.*—1994.—66, № 3.—С. 54—60.
27. Lorenzo E., Pariente F., Hernandez L., Tobalina F., Darder M., Wu G., Maskus M., Abruna H. D. Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes // *Biosensors and Bioelectronics.*—1998.—13.—P. 319—332.
28. Albery W. J., Bartlett P. N., Cass A. E. G., Sim K. W. Amperometric enzyme electrodes. Part IV. An enzyme electrode for ethanol // *J. Electroanal. Chem.*—1987.—218.—P. 127—134.
29. Miyamoto S., Murakami T., Saito A., Kimura J. Development of an amperometric alcohol sensor based on immobilized alcohol-dehydrogenase and entrapped NAD^+ // *Biosensors and Bioelectronics.*—1991.—6.—P. 563—567.
30. Blaedel W. J., Engstrom R. C. Reagentless enzyme electrode for ethanol, lactate, and malate // *Anal. Chem.*—1980.—52.—P. 1691—1697.
31. Jaraba P., Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M. NADH amperometric sensor based on poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fiber microelectrodes: application to the enzymatic determination of L-lactate // *Electrochim. Acta.*—1998.—43.—P. 3555—3565.
32. Bartlett P. N., Whitaker R. G. Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes // *Biosensors.*—1987/1988.—3.—P. 359—379.
33. Albery W. J., Bartlett P. N., Cass A. E. G. Amperometric

- enzyme electrodes // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*—1987.—316.—P. 107—119.
34. *Wilson G. S., Thevenot D. R.* Unmediated amperometric enzyme electrodes // *Biosensors. A practical approach* / Ed. A. E. G. Cass.—Oxford: Oxford Univ. press, 1990.—P. 1—17.
 35. *Gajovic N., Warsinke A., Scheller F. W.* A novel multienzyme electrodes for the determination of citrate // *J. Chem. Tech. Biotechnol.*—1995.—63.—P. 337—344.
 36. *Matsumoto K., Tsukatani T., Okajima Y.* Amperometric flow-injection determination of citric acid in food using free citrate lyase and coimmobilized oxalacetate decarboxylase and pyruvate oxidase // *Electroanalysis.*—1995.—7.—P. 527—530.
 37. *Scheller F., Karsten C.* A combination of invertase reactor and glucose-oxidase electrode for successive determination of glucose and sucrose // *Anal. Chim. Acta.*—1983.—155.—P. 29—36.
 38. *Filipak M., Fludra K., Gosciminska E.* Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode // *Biosensors and Bioelectronics.*—1996.—11.—P. 355—364.
 39. *Varadi M., Adanyi N., Nagy G., Rezessy-Szabo J.* Studying the bienzyme reaction with amperometric detection for measuring maltose // *Biosensors and Bioelectronics.*—1993.—8.—P. 339—345.
 40. *Pfeiffer D., Ralis E.V., Makower A., Scheller F.* Amperometric bienzyme based biosensor for the detection of lactose. Characterization and application // *J. Chem. Tech. Biotechnol.*—1990.—49.—P. 255—265.
 41. *Xu Y., Guilbault G. G., Kuan S. S.* Fast responding lactose enzyme electrode // *Enzyme Microbiol. Technol.*—1990.—12.—P. 104—108.
 42. *Larsson N., Ruzgas T., Gorton L., Kokaia M., Kissinger P., Csoregi E.* Design and development of an amperometric biosensor for acetylcholine determination in brain microdialysates // *Electrochim. Acta.*—1998.—43.—P. 3541—3554.
 43. *Guilbault G. G., Nanjo M.* A phosphate selective electrode based on immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase // *Anal. Chim. Acta.*—1975.—78.—P. 69—80.
 44. *Campanella L., Pacifici F., Sammartino M. P., Tomassetti M.* A new organic phase bienzymatic electrode for lecithin analysis in food products // *Bioelectrochem. Bioenerg.*—1988.—47.—P. 27—38.
 45. *Albery W. J., Hillman A. R.* Transport and kinetics in modified electrodes // *J. Electroanal. Chem.*—1984.—170.—P. 27—49.
 46. *Qing-Shan Li, Bang-Ce Ye, Bai-Xiang Liu, Jian-Jiang Zhong.* Improvement of the performance of H₂O₂ oxidation at low working potential by incorporating TTF-TCNQ into a platinum wire electrode for glucose determination // *Biosensors and Bioelectronics.*—1999.—14.—P. 327—334.
 47. *Albery W. J., Craston D. H.* Amperometric enzyme electrodes: Theory and experiment // *Biosensors. Fundamentals and Applications* / Eds A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson.—Oxford: Oxford Univ. press, 1987.—P. 180—210.
 48. *Cosnier S.* Biomolecule immobilization on electrode surface by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review // *Biosensors and Bioelectronics.*—1999.—14.—P. 443—456.
 49. *Albery W. J., Bartlett P. N.* An organic conductor electrode for the oxidation of NADH // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*—1984.—P. 234—236.
 50. *Albery W. J., Bartlett P. N., Bycroft M., Craston D. H., Driscoll B. J.* Amperometric enzyme electrodes. 3. A conducting salt electrode for the oxidation of four different flavoenzymes // *J. Electroanal. Chem.*—1987.—218.—P. 119—126.
 51. *Albareda-Sirvent M., Mercoci A., Alegret S.* Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review // *Sensors and Actuators B.*—2000.—69.—P. 153—163.
 52. *Eddowes M.* Theoretical methods for analysing biosensor performance // *Biosensors. A practical approach* / Ed. A. E. G. Cass.—Oxford: Oxford Univ. press, 1990.—P. 211—263.
 53. *Thevenot D. R., Sternberg R., Coulet P. R., Laurent J., Gautheron D.* Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose // *Anal. Chem.*—1979.—51.—P. 96—100.
 54. *Reddy S. M., Vadgama P. M.* Membranes to improve amperometric sensor characteristics // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment* / Ed. E. Kress-Rogers.—New York: CRC press, 1997.—P. 111—135.
 55. *Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose // *Anal. Chem.*—1984.—56.—P. 667—571.
 56. *Spinas G. A., Andre U. R., Heinzinger T., Berger W.* Evaluation des Pen-Meters zur Blutzuckerbestimmung bei ambulanten Diabetikern // *Schweiz. Med. Wochenschr.*—1990.—120.—S. 125.
 57. *Bradley J., Schmid R. D.* Optimisation of a biosensor for *in situ* fermentation monitoring of glucose concentration // *Biosensors and Bioelectronics.*—1991.—6.—P. 669—674.
 58. *Stredansky M., Pizzariello A., Stredanska S., Miertus S.* Determination of D-fructose in foodstuffs by an improved amperometric biosensor based on a solid binding matrix // *Anal. Commun.*—1999.—36.—P. 57—61.
 59. *Xie X., Kuan S. S., Guilbault G. G.* A simplified fructose biosensor // *Biosensors and Bioelectronics.*—1991.—6.—P. 49—54.
 60. *White S. F., Higgins I. J., D'Costa E., Bradley J., Schmid R. D.* Amperometric detection of lactate: a comparison between mediated and platinised carbon electrodes // *Biosensors: Fundamental technologies and application* / Eds F. Scheller, R. D. Schmid.—Weinheim: VCH Publishers, 1992.—P. 403—421.
 61. *Kulys J., Schuhmann W., Schmidt H.-L.* Carbon paste electrodes with incorporated lactate oxidase and mediators // *Anal. Lett.*—1992.—26.—P. 1011—1024.
 62. *Hale P. D., Hung S.-L., Okamoto Y., Skotheim T. A.* Glutamate biosensors based on electrical communication between L-glutamate oxidase and a flexible redox polymer // *Anal. Lett.*—1991.—24.—P. 345—356.
 63. *Vahjen W., Bradley J., Bilitewski U., Schmid R.D.* Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate // *Anal. Lett.*—1991.—24.—P. 1445—1452.
 64. *Dempsey E., Wang J., Wollenberger U., Ozsoz M.* A lysine dehydrogenase-based electrode for biosensing of L-lysine // *Biosensors and Bioelectronics.*—1992.—7.—P. 323—327.
 65. *Yon Hin B. F. Y., Lowe C. R.* Catalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide at hexacyanoferrate-modified nickel electrodes // *Anal. Chem.*—1987.—59.—P. 2111—2115.
 66. *Holt P. J., Gray Stephens L. D., Bruce N. C., Lowe C. R.* An amperometric opiate assay // *Biosensors and Bioelectronics.*—1995.—10.—P. 517—526.
 67. *Pat. USA 3,838,033.* Enzyme electrode / W. Mindt, P. Racine, P. Schlapfer // *Publ.* 1974.
 68. *Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. G., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D., Turner A. P. F.* Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric

- determination of glucose // *Anal. Chem.*—1984.—56.—P. 667—671.
69. Dicks J. M., Hattori S., Karube I., Turner A. P. F., Yokozawa T. Ferrocene modified polypyrrole with immobilised glucose oxidase and its application in amperometric glucose microsen- sors // *Ann. Biol. Clin.*—1987.—47.—P. 607—613.
 70. Rosen-Margalit I., Rishpon J. Novel approaches for the use of mediators in enzyme electrodes // *Biosensors and Bioelec- tronics.*—1993.—8.—P. 315—323.
 71. Marcus R. A., Sutin N. Electron transfer in inorganic, organic and biological systems // *Adv. Chem.*—1991.—228—P. 1— 13.
 72. Marcus R. A., Sutin N. Electron transfer in chemistry and biology // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—811.—P. 265— 322.
 73. Yeh P., Kuwana T. Reversible electrode reaction of cytochrome c // *Chem. Lett.*—1977.—P. 1145—1148.
 74. Eddows M. J., Hill H. A. O. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*—1977.—P. 770—772.
 75. Niki K., Yagi I., Inokuchi H., Kimura K. Electrochemical behavior of cytochrome c₃ of *Desulfovibrio vulgaris*, strain Miyazaki, on the mercury electrode // *J. Amer. Chem. Soc.*—1979.—101.—P. 3335—3340.
 76. Armstrong F. A., Hill H. A. O., Walton N. J. Direct electrochemistry of redox proteins // *Acc. Chem. Res.*— 1988.—21.—P. 407—413.
 77. Armstrong F. A. Dynamic electrochemistry of iron-sulfur proteins // *Adv. Inorg. Chem.*—1992.—38.—P. 117—163.
 78. Tarasevich M. R., Yaropolov A. I., Bogdanovskaya V. A., Varfolomeev S. D. Electron catalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase // *Bioelectrochem. Bioenerg.*—1979.— 6.—P. 393—403.
 79. Berezin I. V., Varfolomeev S. D. Principles of bioelec- trocatalysis // *Enzym. Eng.*—1980.—5.—P. 95—100.
 80. Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Биоэлектрокатализ: ускорение электродных реакций с ферментами // *Успехи в физической химии / Под ред. Я. М. Колотыркина.*— Москва: Мир, 1982.—С. 60—95.
 81. Lee Chi-Woo, Gray H. B., Anson F. C., Malmstron B. G. Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase // *J. Electroanal. Chem.*—1984.— 172.—P. 289—300.
 82. Ярополов А. И., Маловик Б., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Биоэлектрокатализ. Прямой электронный перенос из активного центра пероксидазы на электрод // *Докл. Ака- демии Наук СССР.*—1979.—249.—С. 1399—1402.
 83. Jonsson G., Gorton L. An electrochemical sensor for hydrogen peroxide based on peroxidase adsorbed on a spectrographic graphite electrode // *Electroanalysis.*—1989.—1.—P. 465— 468.
 84. Wollenberg U., Bogdanovskaya V., Bobrin S., Scheller F., Tarasevich M. Enzyme electrodes using bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide // *Anal. Lett.*—1990.—23.— P. 1795—1808.
 85. Zhao J., Henkens R. W., Stonehuerner J., O'Daly J. P., Crumbliss A. L. Direct electron transfer at horseradish pero- xidase-modified colloidal gold electrodes // *J. Electroanal. Chem.*—1992.—327.—P. 109—119.
 86. Ho W. O., Athey D., McNeil C. J., Hager H. J., Evans G. P., Mullen W. H. Mediatorless horseradish peroxidase enzyme electrodes based on activated carbon: potential application to specific binding assay // *J. Electroanal. Chem.*—1993.— 351.—P. 185—197.
 87. Ruzgas T., Gorton L., Emneus J., Marko-Verga G. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite elec- trode // *J. Electroanal. Chem.*—1995.—391.—P. 41—49.
 88. McNeil C. J., Athey D., Ho W. O. Direct electron transfer bioelectronic interfaces: application to clinical analysis // *Biosensors and Bioelectronics.*—1995.—10.—P. 75—83.
 89. Armstrong F. A., Lannon A. M. Fast interfacial electron transfer between cytochrome c peroxidase and graphite elec- trodes promoted by aminoglycosides: novel electroenzymatic catalysis of H₂O₂ reaction // *J. Amer. Chem. Soc.*—1987.— 109.—P. 7211—7212.
 90. Paddock R. M., Bowden E. F. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide via direct electron transfer from pyrolytic graphite electrodes to irreversibly adsorbed cytochrome c peroxidase // *J. Electroanal. Chem.*—1989.—260.—P. 487— 494.
 91. Scott D. L., Paddock R. M., Bowden E. F. The electrocatalytic enzyme function on adsorbed cytochrome c peroxidase on pyrolytic graphite // *J. Electroanal. Chem.*—1992.—341.— P. 307—321.
 92. Degani Y., Heller A. Direct electrochemical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 1. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme // *J. Phys. Chem.*—1987.—91.—P. 1285—1289.
 93. Heller A. Electrical wiring of redox enzymes // *Acc. Chem. Res.*—1990.—23.—P. 128—134.
 94. Gregg B. A., Heller A. Crosslinked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor application // *Anal. Chem.*—1990.—62.—P. 258—263.
 95. Heller A. Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes // *J. Phys. Chem.*—1992.—96.—P. 3579—3587.
 96. Katz E., Heleg-Shabtai V., Willner B., Willner I., Buckmann A. Electrical contact of redox enzymes with electrodes: novel approaches for amperometric biosensors // *Bioelectrochem. Bioenerg.*—1997.—42.—P. 95—104.
 97. Schmid R. D., Karube I. *Biosensors and Bioelectronics // Biotechnology / Eds H. J. Rehm, G. Reed.*—Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1988.—Vol. 6b.—P. 317—365.
 98. *MediSense Inc. Blood Glucose Sensor Electrodes // Product Information.*—New York, 1990.
 99. Riklin A., Katz E., Willner I., Stocker A., Buckmann A. F. Improving enzyme electrode contacts by redox modification of cofactors // *Nature.*—1995.—376.—P. 672—675.

УДК 577.15; 573.6

Надійшла до редакції 26.10.2000