

Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування

С. В. Дзядевич

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Розглянуто теоретичні основи кондуктометричного методу вимірювань та можливість його використання для реєстрації перебігу ферментативних процесів, що проілюстровано відповідними даними різних дослідників. Наведено приклади багатьох кондуктометричних перетворювачів, які використовують при створенні біосенсорів, засоби іммобілізації активного матеріалу на їхню поверхню та схеми і методики вимірювань. Описано деякі моделі кондуктометричних ферментних біосенсорів, обговорено їхні переваги і недоліки, а також перспективи подальшого розвитку.

Ключові слова: кондуктометричний біосенсор, імпеданс, провідність, фермент.

Вступ. На сьогодні в усьому світі зростає необхідність охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, перевірки якості харчових продуктів і питної води, кількість клінічних тестів у медичній та ветеринарній діагностиці, які потребують все ширшого використання в практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Серед них велику увагу приділяють приладам нового покоління — біосенсорам [1—3].

Біосенсор перетворює зміну фізико-хімічних властивостей біоматриці в електричний або оптичний сигнал з амплітудою, яка залежить від концентрації певної речовини в розчині. Функціонально прилад складається з двох частин: біоматриці — детектувального шару іммобілізованого біоматеріалу (ферментів [4, 5], антитіл [6, 7], рецепторів [8], органел [9], мікроорганізмів [10, 11]) і перетворювача (потенціометричного [12, 13], імпедіометричного [14, 15], амперометричного [16, 17], кондуктометричного [18, 19], акустичного [20], оптичного [21, 22] чи калориметричного [23, 24]).

У наш час опубліковано низку оглядів [25—

27], монографій [28—30], велику кількість експериментальних робіт, де описано різні типи біосенсорів. Але створенню саме кондуктометричних біосенсорів присвячено незначну частину згаданих праць, до того ж у деяких з них описано застосування даного типу перетворювачів для хроматографії і створення хімічних сенсорів з визначення вологості повітря та концентрацій певних газів [31—33].

Зменшену увагу до кондуктометричних біосенсорів у порівнянні з іншими типами датчиків можна пояснити недостатнім вивченням покладених в основу їхньої роботи принципів, хоча кондуктометричні датчики мають низку значних переваг, а саме: технологічно нескладний електрод порівняння, використання при роботі змінної напруги малої амплітуди, що дозволяє уникнути фарадеївських процесів на електродах, відсутність світлочутливості, малі розміри та притаманність їм високого рівня інтеграції при застосуванні недорогої тонкоплівкової стандартної технології.

Майже всі електрохімічні методи аналізу [12—17] базуються на використанні електродних електрохімічних реакцій (потенціометрія, вольтамперо-

метрія, амперометрія, кулонометрія). На відміну від них кондуктометрія — це метод, при застосуванні якого електродні електрохімічні реакції не проходять зовсім чи є допоміжними і не враховуються. У зв'язку з цим у кондуктометричному методі величезне значення має одна з властивостей розчинів електролітів — провідність, до зміни якої призводить дуже широкий клас ферментативних реакцій.

Як правило, вважається, що оскільки рідини, які аналізують, у більшості своїй мають значну фонову провідність, що легко змінюється під дією різноманітних факторів, то вибірковість і, таким чином, можливість використання кондуктометричного методу реєстрації є малими [34]. Але в разі інтегральних мікробіосенсорів більшої частини цих труднощів можна уникнути, використовуючи диференційну схему вимірювань, яка дозволяє компенсувати зміну фонові провідності, вплив коливань температур та інші фактори [35, 36].

Цей огляд присвячено розгляду теоретичних принципів, що лежать в основі роботи кондуктометричних біосенсорів, наведено приклади різних кондуктометричних перетворювачів, які використовують при створенні біосенсорів, та засоби іммобілізації активного матеріалу на їхню поверхню, описано деякі кондуктометричні ферментні біосенсори, а також обговорено недоліки і перспективи подальшого розвитку кондуктометричних біосенсорів.

Теоретичні основи кондуктометричного методу вимірювань. Кондуктометричний аналіз, як правило, проводять з використанням змінного струму. Тому спочатку треба зупинитися на явищах, які виникають в електролітичній комірниці при проходженні синусоїдального змінного електричного струму та на межі розподілу метал—розчин, розглянути питання електропровідності розчинів і різних експериментальних схем вимірювань.

Електрохімічний імпеданс системи метал—розчин. Перш за все необхідно наголосити на важливості природи поверхневого імпедансу межі розподілу електроліт—метал, тому що саме він головним чином визначає принцип роботи кондуктометричних перетворювачів. Ключем до вивчення подібної системи є уявлення про фізико-хімічні процеси, які в ній проходять, як про еквівалентний електричний ланцюг, де ці процеси замінюються відповідними електронними елементами, а саме — конденсаторами і резисторами.

Розглянемо електродний процес на молекулярному рівні. Уявімо собі стан речовини, яка знаходиться досить далеко від межі розподілу фаз. Всередині гомогенної фази діють сили взаємодії окремих заряджених чи полярних частинок. Сума всіх сил, які діють на ці частинки, дорівнює нулю. У стані рівноваги катіони та аніони електроліту розподіляються рівномірно, як і молекули води. Отже, в цілому виконується правило електронейтральності. Поблизу межі розподілу фаз рівновага різноманітних сил, які діють на частинки, порушується, оскільки з одного боку (наприклад, електродної поверхні) знаходяться іони з зовсім іншими властивостями, ніж значна частина іонів та дипольних молекул електроліту з другого боку поверхні.

Те ж саме справедливо і для електронів та атомів матеріалу електрода. Внаслідок цього саме поблизу міжфазної поверхні сумарний вектор сил, які діють на частинку, не дорівнює нулю. В результаті такої анізотропії на межі розподілу фаз здійснюється відповідна орієнтація чи переорієнтація частинок, які знаходяться на більшій або меншій відстані від цієї межі під впливом згаданих напрямлених сил. У такому змінному силовому полі частинки прагнуть набути стану з найнижчою енергією. Цей процес проходить на відстані декількох іонних радіусів та може спричинити більшу чи меншу дипольну орієнтацію молекул розчинника поблизу поверхні електрода. Орієнтовані диполі на поверхні електрода можна представити як заряджену пластину конденсатора, тобто виникає подвійний електричний шар, подібний до конденсатора. Таким чином, вводиться кількісне поняття — ємність подвійного електричного шару $C_{\text{дв}}$ [37], яка, як правило, складає 10—20 мкФ/см².

Деякі заряджені частинки здатні перетинати подвійний шар та викликати електрохімічні реакції на поверхні електрода. Такий процес носить назву хімічної поляризації і може бути представлений деяким опором — опором перетину, що позначається R_n [38]. Відповідну формулу для нього знаходять з рівняння Батлера-Волмера, яка при прикладеному сигналі малої амплітуди має вигляд:

$$R_n = \frac{RT}{nFi_0}, \quad (1)$$

де R — газова стала; T — абсолютна температура, К; F — стала Фарадея; n — кількість електронів, які беруть участь в електродній реакції; i_0 — густина струму обміну.

У випадку концентраційної поляризації при включенні струму в приелектродному шарі через дуже короткий проміжок часу концентрація іонів, які розряджуються, різко зменшується за рахунок малої швидкості їхньої доставки внаслідок дифузії з глибини електроліту до поверхні електрода. В результаті струм буде зменшуватися, а електродний потенціал — зростати. Таким чином, між силою струму, яка періодично змінюється, та електродним потенціалом виникає зміщення по фазі, а саме — зміна потенціалу постійно відстає в часі від зміни струму. Тобто в такій системі концентраційна поляризація за рахунок дифузії іонів з межі розподілу в об'єм електроліту робить деякий внесок у поверхневий імпеданс, особливо на низьких частотах [39]. Цей дифузійний чи «варбурговський» імпеданс, $Z_{\text{диф}}$, залежить від частоти і описується рівнянням:

$$Z_{\text{диф}} = \frac{RF}{n^2 F^2} (D\omega)^{-1/2}, \quad (2)$$

де ω — циклічна частота змінного струму; D — коефіцієнт дифузії.

Таким чином, електрохімічний імпеданс системи металевий електрод—розчин можна змоделювати еквівалентною схемою, наведеною на рис. 1, а. Відповідна їй імпедансна крива представлена на рис. 1, б. Якщо вимірювання проводять при частоті більше 10 Гц, то значенням дифузійного імпедансу можна знехтувати, і основний внесок у загальний електрохімічний імпеданс системи роблять опір розчину, ємність подвійного шару і опір перетину.

При перебуванні металевого електрода в розчині протягом значного часу на його поверхні формується непровідний шар оксиду та в системі з'являється додаткова ємність, яку на еквівалентній схемі можна представити конденсатором $C_{\text{оксид}}$ (рис. 2, а). Цей конденсатор додатково послідовно з'єднується з паралельно зв'язаними конденсатором подвійного шару та опором перетину, а також з опором розчину. Імпедансна крива в цьому разі являє собою пряму лінію під деяким кутом до реальної осі (рис. 2, б).

Опір електроліту та імпеданс межі розподілу залежать від природи, складу розчину і частоти змінного струму зовсім по-різному. Тому для фізико-хімічного аналізу можна використовувати вимірювання опору електроліту або імпеданс межі розподілу, або повний електрохімічний імпеданс комірки, а залежно від того, який аналітичний

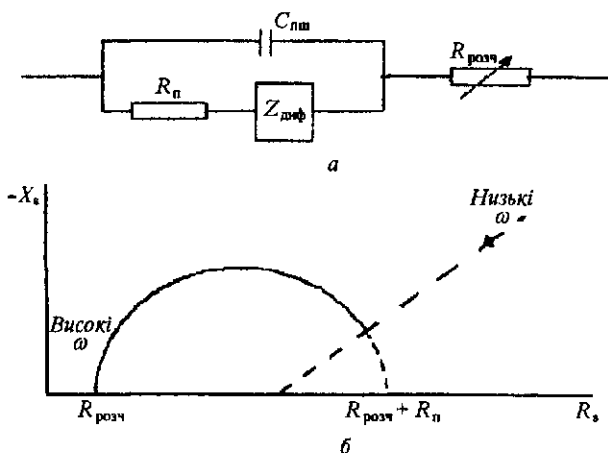


Рис. 1. Класичний еквівалентний ланцюг (а) та відповідна йому імпедансна крива (б) межі розділу метал—електроліт: $C_{\text{плш}}$ — ємність подвійного шару, яка не залежить від частоти змінного струму; R_p — опір перетину, який модулює хімічну поляризацію і також не залежить від частоти змінного струму; $Z_{\text{диф}}$ — дифузійний імпеданс, який модулює концентраційну поляризацію та залежить від частоти змінного струму, $R_{\text{розч}}$ — опір електроліту; ω — циклічна частота змінного струму

сигнал застосовують при проведенні аналізу, розрізняють звичайну кондуктометрію та низько- і високочастотну кондуктометрію.

Електропровідність розчинів. Провідність рідин — це результат дисоціації розчиненої речовини (електроліту) на іони і міграції їх під дією електричного поля. При проходженні електричного струму через електроліти останні розкладаються на атоми чи групи атомів, які представляють собою частинки молекули розчиненої речовини, тобто іони. Отже, провідність електролітів є іонною [40].

При накладанні різниці потенціалів на електроди, коли всередині електроліту утворюється електричне поле, на хаотичний рух іонів накладається упорядкований рух у протилежні напрямки іонів різних знаків: негативно заряджених — до аноду, позитивно заряджених — до катоду (рис. 3). Таким чином, струм в електроліті обумовлений рухом іонів до електродів, на яких вони нейтралізуються та виділяються у вигляді нейтральних атомів (або молекул).

Потік іонів, тобто кількість іонів, які проходять через одиничний переріз розчину електроліту за одиницю часу (p_i), можна визначити за формулою:

$$p_i = c_i v - k_i c_i \text{ grad } \mu_i - z_i v_i c_i F \text{ grad } \psi, \quad (3)$$

де v — швидкість потоку розчину внаслідок природної чи штучної конвенції; c_i — концентрація

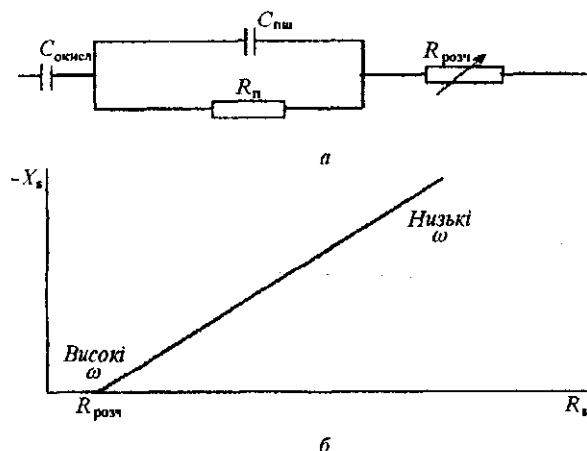


Рис. 2. Еквівалентний ланцюг (а) та відповідна йому імпедансна крива (б) межі розподілу метал—електроліт з додатковою ємністю оксиду (пояснення див. у підпису до рис. 1)

іонів; k_i — коефіцієнт дифузії для них; z_i — зарядове число; v_i — швидкість іонів під дією прикладеного поля; F — стала Фарадея.

Таким чином, у формулі (3) перший доданок відображає внесок конвентивного потоку іонів, концентрація яких дорівнює c_i , другий — внесок їхньої молекулярної дифузії, а третій — міграції іонів під дією прикладеної напруги. Температуру, як правило, приймають заданою та постійною ($T = \text{const}$, $\text{grad } T = 0$) і термодифузії іонів можна не враховувати.

У реальних умовах всі три згаданих процеси частіше за все існують одночасно, накладаючись один на одного. Проте в крайньому випадку можна припустити, що вирізняється лише якийсь один. Так, наприклад, у нерухомому електроліті при однорідному складі розчину двома першими доданками можна знехтувати і враховувати тільки міграцію іонів під дією електричного поля. Тоді

$$p_i = -z_i v_i c_i F \text{ grad } \psi = c_i u_i \text{ grad } \psi, \quad (4)$$

де v_i — швидкість руху іонів; c_i — їхня концентрація; а $u_i = z_i v_i F$ — рухливість, яка є сталою величиною для певного іона в нескінченно розведеному розчині. У табл. 1 наведено значення рухливості деяких іонів при нескінченному розведенні у водних розчинах за температури 25 °С.

Густина струму j , тобто віднесена до одиниці поверхні перерізу системи сила струму, є алгебраїчною сумою добутку потоків іонів на їхні заряди:

$$j = F \sum z_i p_i = F \text{ grad } \psi \sum z_i c_i u_i. \quad (5)$$

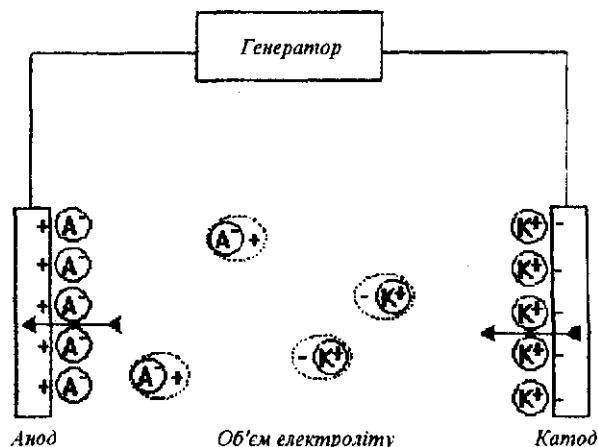


Рис. 3. Вимірювання провідності електроліту та міграція іонів в об'ємі розчину

З іншого боку, згідно із законом Ома,

$$j = S \text{ grad } \psi, \quad (6)$$

де S — провідність, тобто величина, обернена опорю. Тоді, порівнюючи формули (5) і (6), можна записати:

$$S = F \sum z_i c_i u_i. \quad (7)$$

Отже, провідність розчину електроліту залежить від концентрації і рухливості його іонів. Але вона також, як уже зазначалося, обернено пропорційна опорю розчину електроліту. А оскільки відомо, що опір розчину електроліту прямо пропорційний відстані l між зануреними в нього електродами та обернено пропорційний їхній площі A , то

$$S = \chi \frac{A}{L}, \quad (8)$$

де χ — питома провідність.

Підсумовуючи викладене вище, можна зробити висновок, що кондуктометричні вимірювання загалом включають у себе визначення провідності розчину між двома паралельними електродами. Її знаходять за сумарним внеском усіх іонів, які перебувають у досліджуваному зразку. Під час біоспецифічної реакції можуть утворюватися нові іони, може змінюватися концентрація іонів, а також їхня рухливість. Усе це призводить до зміни провідності розчину, що й реєструється кондуктометричним датчиком.

Кондуктометричні схеми вимірювань. Як зазначалося вище, кондуктометричний метод базу-

Таблиця 1

Рухливість іонів у нескінченно розведених водних розчинах за температури 25 °С

Катіон	λ , Ом ⁻¹ /см ²	Аніон	λ , Ом ⁻¹ /см ²
H ⁺	349,8	ОН ⁻	198,3
Co(NH ₃) ₆ ³⁺	102,3	C ₂ O ₄ ²⁻	111,0
NH ₄ ⁺	73,6	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	110,5
K ⁺	73,5	[Fe(CN) ₆] ³⁻	100,9
Pb ²⁺	70,0	[Co(CN) ₆] ³⁻	98,9
La ³⁺	69,7	CrO ₄ ²⁻	85,0
Fe ³⁺	68,0	SO ₄ ⁻	80,0
Ba ²⁺	63,6	I ⁻	78,8
Al ³⁺	63,0	Br ⁻	78,1
Ag ⁺	61,9	CN ⁻	78,0
Ca ²⁺	59,5	Cl ⁻	76,4
Sr ²⁺	59,5	NO ₃ ⁻	71,5
CH ₃ NH ₃ ⁺	58,7	C ₂ O ₄ ²⁻	74,2
Cu ²⁺	56,6	CO ₃ ²⁻	69,3
Zn ²⁺	56,6	ClO ₄ ⁻	67,3
Cd ²⁺	54,0	ClO ₃ ⁻	65,0
Fe ²⁺	53,5	O ₄ ²⁻	57,0
Mn ²⁺	53,5	F ⁻	55,4
Mg ²⁺	53,1	CHOO ⁻	54,6
Co ²⁺	52,8	HCO ₃ ⁻	44,5
(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	51,9	CH ₃ CO ₂ ⁻	40,9
Na ⁺	50,1	HC ₂ O ₄ ⁻	40,2
(CH ₃) ₃ NH ⁺	47,3	H ₂ PO ₄ ⁻	36,0
Li ⁺	38,7	C ₂ H ₅ CO ₂ ⁻	35,8
		C ₃ H ₇ CO ₂ ⁻	32,6
		C ₆ H ₅ CO ₂ ⁻	32,4

ється на вимірюванні провідності розчинів електролітів. Для цього, перш за все, необхідно заміряти активний опір між електродами, зануреними в досліджуваній розчин. Мостову схему для вимірювань електричного опору вперше розроблено Уїтстоном, а Кольрауш застосував її для змінного струму (рис. 4, а). Такий міст складається з чотирьох опорів.

Теорія мостів свідчить про те, що найвища чутливість схеми досягається тоді, коли всі чотири плеча мають приблизно однакові опори. А оскільки, як правило, $R_1 = R_2$, то міст змінного струму можна врівноважити лише в тому разі, якщо окремо будуть врівноважені активні і ємнісні опори. Таким чином, оперуючи магазинами опорів та ємностей, для них підбирають такі значення, щоб

величина нуль-індикатора була мінімальною. Тоді значення опору R_m буде відповідати значенню опору розчину R_x між електродами. Вимірювання опорів розчинів електролітів за допомогою подібного мосту можна проводити з точністю 0,5—1 %.

Однак використання мостової схеми потребує постійних додаткових маніпуляцій з магазинами опорів та ємностей, що само по собі не дуже раціонально і погіршує точність вимірювань. На рис. 4, б, показано схему модифікованого мосту Уїтстона. Він точніший і дозволяє безпосередньо реєструвати значення струму, який протікає через досліджувану комірку, не потребуючи додаткових маніпуляцій.

На рис. 4, в, представлено схему вимірювань, у якій використано операційний підсилювач з ви-

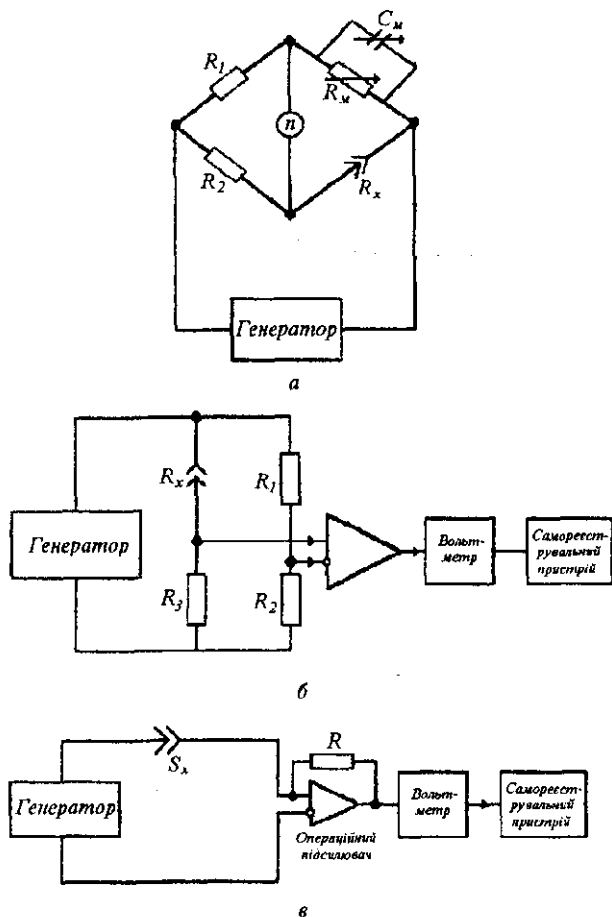


Рис. 4. Схеми кондуктометричних установок: R_x — опір аналізованого розчину; R_m — магазин опорів; C_m — магазин ємностей; R_1, R_2 — певні опори, причому $R_1 = R_2$; n — нуль-індикатор

соким опором. У цьому випадку провідність S_x прямо пропорційна значенню струму на виході операційного підсилювача. Дану схему взято за основу при вимірюваннях з ферментними кондуктометричними біосенсорами в роботі [41].

Також реальним є застосування чотирьохелектродної схеми вимірювань. У цьому разі струм пропускають через одну пару електродів, а падіння напруги вимірюють за допомогою другої пари електродів, що не поляризована струмом та відіграє роль зондів [42].

Наведені схеми вимірювань досить прості і найчастіше використовуються в експериментах. У кожній з них є свої переваги та недоліки, тому вибір потрібно робити залежно від поставлених задач у кожному конкретному випадку.

Перетворювачі для кондуктометричних біосенсорів. Кондуктометричний перетворювач — це мініатюрний двохелектродний пристрій для вимірювань провідності тонкого шару розчину, який знаходиться безпосередньо біля поверхні електродів. Більшість авторів єдині в тому, що найкращою структурою при розробці дизайну кондуктометричних електродів є гребінчаста структура [43—49].

Фізико-хімічні процеси, що протікають в електрохімічній комірці з кондуктометричним гребінчастим перетворювачем, як уже згадувалося, у більшості своїй модулюються еквівалентними схемами, подібними до зображених на рис. 1 і 2 [43—47].

У роботі [43] здійснено теоретичний розрахунок таких ланцюгів. У першому випадку (рис. 1), тобто за відсутності ланцюга ємності оксиду, отримали:

$$R_s = R_{розч} + \frac{R_n}{1 + \omega^2 C_{пуд}^2 R_n^2};$$

$$X_s = - \frac{\omega C_{пуд}^2 R_n^2}{1 + \omega^2 C_{пуд}^2 R_n^2}. \quad (9)$$

В другому випадку (рис. 2), коли з'являється ємність оксиду, одержано:

$$R_s = R_{розч} + \frac{R_n}{1 + \omega^2 C_{пуд}^2 R_n^2};$$

$$X_s = \frac{1 + \omega C_{пуд} R_n^2 (C_{пуд} + C_{оксид})}{C_{оксид} (1 + \omega^2 C_{пуд}^2 R_n^2)}. \quad (10)$$

На рис. 5 наведено імпедансні криві, побудовані відповідно до формул (9) і (10), та демонструється зміна форми кривих при зміні різних параметрів ланцюга. З даних цього рисунку випливає, що зміна всіх компонент ланцюга (за винятком $C_{пуд}$) спричинює зміни форми кривих. Але останні є суттєвими лише для низьких частот змінного струму. У випадку ж високих частот тільки зміна $R_{розч}$ призводить до зсуву імпедансної кривої, тобто до зміни реальної компоненти імпедансу, а саме — провідності.

Для підтвердження правильності запропонованої і розрахованої моделі електрохімічного імпедансу кондуктометричної комірки замість тонкоплівкових перетворювачів до вимірювальної схеми було підключено еквівалентний ланцюг з електронними елементами. Експериментальні імпедансні

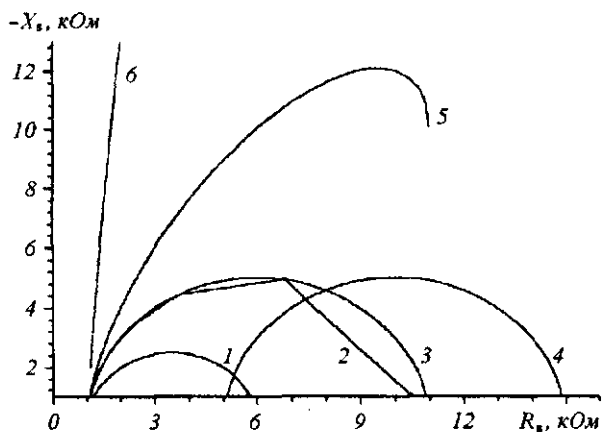


Рис. 5. Теоретично розраховані імпедансні криві для моделі кондуктометричної комірки. Частоту змінювали зі 100 Гц до 200 кГц. Параметри ланцюга: 1 — $R_n = 5$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 5$ нФ; 2 — $R_n = 10$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 50$ нФ; 3 — $R_n = 10$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 5$ нФ, $C_{оксид} = 1000$ мкФ; 4 — $R_n = 10$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 5$ нФ, $C_{оксид} = 1000$ мкФ; 5 — $R_n = 10$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 5$ нФ, $C_{оксид} = 100$ мкФ; 6 — $R_n = 10$ кОм, $R_{розч} = 1$ кОм, $C_{пл} = 5$ нФ, $C_{оксид} = 10$ мкФ

криві, отримані для еквівалентного ланцюга, відповідали імпедансним кривим, одержаним для реальних перетворювачів, що підтверджувало вибір еквівалентної схеми [43, 46].

Під час ферментативної реакції, як уже зазначалося, змінюється провідність розчину в приселектродній області, яку можна виміряти за допомогою кондуктометричного перетворювача. Це можна змоделювати, змінюючи фонову провідність за рахунок варіювання концентрації КСІ у розчині та температури [43, 45, 46, 48, 49]. Показано, що зміна фонові провідності розчину головним чином впливає на високочастотну частину адмітансу. Таким чином, внаслідок роботи на високій частоті досягається краща чутливість датчика. До того ж за таких умов експерименту основний внесок до сигналу робить реальна компонента адмітансу, тобто провідність, що їй потрібно для кондуктометричних біосенсорів. Подібним чином впливала на адмітанс і зміна температури розчину.

У повідомленні [46] також показано, що при роботі на частотах більше 10 кГц електрохімічний імпеданс системи визначається головним чином об'ємними властивостями контактуючих фаз. Це дозволяє використовувати кондуктометричні перетворювачі для створення ферментних біосенсорів і знехтувати поверхневими ефектами на електродах та їхньою деградацією при зберіганні.

Наступним важливим чинником успіху розробки кондуктометричних гребінчастих перетворювачів є матеріал електродів. При розробці використовували різноманітні матеріали: платину [41, 47—54], золото [19, 41, 43, 46, 50, 55, 56], алюміній [43, 46, 57], нікель [43, 46, 57], мідь [43, 46, 53], титан [41, 43, 46], хром [43, 46], Ta_2O_5 [44, 45], срібло [54] і вуглець [66]. Взагалі усі перераховані матеріали можна застосовувати, особливо якщо роботу виконують при змінному струмі високої частоти. Але кращі характеристики демонстрували електроди з благородних металів. Також показано, що при роботі з біологічними рідинами не бажано використання електродів з титану, хрому і алюмінію, тому що вони мають низьку чутливість до зміни іонної сили розчину та швидко досягають насичення за провідністю.

Стосовно характеристичних розмірів електродів, то власні дослідження і результати, представлені в роботах [48, 50], показали, що мініатюризація перетворювачів не потребує технологічно складного збільшення кількості пальців на електроді за рахунок зменшення їхніх розмірів, як це вважалося раніше. Навпаки, це спричинює падіння чутливості датчика. Мініатюризацію треба здійснювати, рівномірно зменшуючи як робочу поверхню електрода, так і характеристичні розмір. З іншого боку, недоцільно виготовляти електроди з великими пальцями (хоча чутливість датчика при цьому може зростати), оскільки тут визначальною стає товщина біологічно чутливої мембрани. Основну роль при виборі розмірів сенсора відіграє співвідношення між товщиною мембрани, характеристичними розмірами електродів та їхньою активною площею.

При виготовленні кондуктометричних перетворювачів, в основному, використовують технології мікроелектроніки, а саме — фотолітографію, вакуумне напилення. Про їхні переваги детально йшлося в огляді [25]. Крім того, деякі автори при виготовленні перетворювачів застосовували товстоплівкову друковану технологію [54, 58], кращі властивості якої описано в огляді [26]. Але всі дослідники єдині в одному: виготовлення кондуктометричних перетворювачів значно простіше за таке усіх інших типів електрохімічних датчиків.

Кондуктометричний метод у ферментному каталізі. Класичний кондуктометричний метод вимірювань можна використовувати у ферментативному каталізі для визначення концентрацій певних

речовин і активності ферментів. Селективність тут досягається завдяки саме ферментам, які каталізують лише певні реакції. У цьому разі мова йде не про біосенсори, а про використання згаданого методу для потреб ензимології.

Одну з перших робіт подібного плану опубліковано у 1961 році. В ній показано можливість визначення вмісту сечовини у розчині [59] методом, який базувався на відмінності в електричній провідності розчинів сечовини і карбонату амонію, що утворюється в ході реакції гідролізу сечовини під дією уреаз. В роботі використано мостову схему вимірювань. Показано також, що активність уреаз зменшується, якщо в розчині присутні іони важких металів: Ag, Hg та ін. Такі електроліти, як NaCl і KCl, не впливають на активність уреаз, але їхня висока концентрація може призвести до помилок, особливо за незначного вмісту сечовини. При низьких концентраціях електроліту, коли не використовується буферний розчин, під час гідролізу сечовини рН середовища поступово змінюється від 7 до 9. Але така зміна рН викликає лише незначне зменшення активності уреаз, тоді як провідність розчину під час реакції змінюється значно. Діапазон концентрації сечовини, яку можна визначати, знаходився в межах 0,1 мкМ—2 мМ, оптимальне значення рН для активності уреаз — рН 7. У роботі також порівняно кондуктометричний метод аналізу з іншими і показано, що перший спосіб є дуже точним, швидким і досить простим. До того ж при його застосуванні точність визначення не залежить від забарвлення розчинів на відміну від оптичних методів.

У 1965 році з'явилася робота, у якій кондуктометричний метод використано для вивчення кінетики ферментативного гідролізу сечовини, а також для визначення активності уреаз [60]. Дослідження виконували у диференційному режимі вимірювань. Система складалася з двох пар платинових платівок, кожна з яких знаходилася у своїй вимірювальній комірці. Фермент містився лише в одній з них, а різницю сигналів досліджували від обох комірок. Таким чином, унеможлилювалися всі похибки, які пов'язані з коливаннями різноманітних зовнішніх факторів (температура, розведення та ін.). Діапазон визначення сечовини складав 1—75 мМ, а активності уреаз — 0,04—2,5 од. акт/мл.

У даній роботі класичний фотометричний метод порівнювали з кондуктометричним, внаслідок

чого показано, що останній містить у собі всі можливості класичного методу, але є швидшим і більш точним.

Ще в одній роботі цього ж часу виявлено, що зміна провідності в ході ферментативної реакції може слугувати універсальною характеристикою глибини хімічних перетворень субстратів [61]. Навіть якщо провідність продуктів реакції дуже мало відрізняється від такої субстратів, то зміна в'язкості розчину і ступеня гідратації молекул та іонів під час перетворення субстратів (особливо за наявності у розчині інших носіїв електричного струму) спричинює помітну зміну провідності досліджуваної суміші.

Щоб експериментально перевірити можливість кондуктометрії, автори обрали реакції, які зумовлюють різні механізми зміни провідності розчинів. Важливо було встановити характер зміни провідності як у разі явної зміни іонного складу розчину, так і тоді, коли за перебігу реакції змінюються лише в'язкість розчину і ступінь гідратації молекул. Тому досліджували ферментативний гідроліз ацетилхоліну і крохмалю, а також ферментативну деполімеризацію гіалуронату.

У першому випадку гідроліз ацетилхоліну супроводжується розривом складноєфірного зв'язку з утворенням вільної оцтової кислоти, яка дисоціює на протон і CH_3COO^- . Протон не бере участі в загальному механізмі провідності, оскільки реакція проходить у фосфатному буфері, рН 7,8, але поява в розчині аніонів CH_3COO^- під час гідролізу призводить до зростання провідності розчину. В другому випадку до розчину крохмалю додавали профільтровану слину людини, яка спричинює зменшення в'язкості розчину при підвищенні ступеня гідролізу крохмалю, що збільшує провідність розчину у ході реакції. При використанні гіалуронідази зростання провідності було викликане зменшенням в'язкості розчину внаслідок деполімеризації молекул гіалуронату.

Авторами показано, що кондуктометричний метод є досконалішим, забезпечує більшу точність та меншу трудомісткість у порівнянні з загальновідомими методами біохімічного аналізу. За допомогою лише одного приладу та одного методу без будь-яких модифікацій було знято кінетичні криві трьох зовсім різних за своїм характером ферментативних процесів, тоді як при класичному ферментативному аналізі потрібно було б три різні установки, які працюють за різними принципами.

Таблиця 2
Фактори, які призводять до зміни провідності

№ п/п	Джерело зміни провідності	Приклади ферментів
1	Генерація іонних груп	Амідази
2	Розділення різних зарядів	Дегідрогенази і декарбоксилази
3	Міграція протонів	Естерази
4	Зміна ступеня асоціації іонних частинок	Кінази
5	Зміни в розмірах заряджених груп	Фосфатази і сульфатази

У своїй наступній роботі автори модифікували власну кондуктометричну установку і використали диференційний режим вимірювань для вивчення активності колагенази, трипсину, лактатдегідрогенази та псевдохолінестерази [62].

Але всі згадані вище роботи носять дещо фрагментарний характер, незважаючи на те, що в них показано принципову можливість використання кондуктометричного методу для реєстрації перебігу ферментативних процесів.

На початку 80-х років на прикладі комплексного вивчення уреазу було проведено детальний аналіз можливостей і обмежень кондуктометричного методу вимірювань [63]. Першу частину роботи присвячено вивченню впливу на провідність досліджуваного розчину рН середовища, концентрації в ньому сечовини, уреазу і солі без проходження ферментативної реакції. Показано, що зміна концентрації складових частин розчину не призводить до значної зміни його провідності, тому таку зміну надалі можна не враховувати. При цьому графік залежності провідності від рН має дзвоноподібну форму з максимумом при рН 8,0 для трисового буфера та при рН 6,0 — для цитратного.

У другій частині роботи вивчали вплив зазначених умов середовища на гідроліз сечовини. Показано, що рН 7,2 — це оптимум для уреазу в цитратному буфері. Але при такому значенні рН швидкість реакції значно залежить від іонної сили розчину і зменшується при її підвищенні на відміну від реакції з рН 6,5, де вона залишається майже незмінною. Визначено константу Міхаеліса, яка відповідає 2,5 мМ сечовині в 4,5 мМ цитратному буфері, рН 6,5. Також отримано лінійну залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації уреазу в розчині. Досить вдало наведено приклад успішного використання кондуктометричного методу для вивчення ферментативної актив-

ності уреазу, показано дуже високу чутливість методу та збіг кінетичних параметрів, визначених за допомогою класичних і електрохімічних методів.

У роботах [64, 65] використано шестиканальний кондуктометр, за допомогою якого вивчено цілу низку різних ферментів. Базуючись на проведених дослідженнях, виокремлено п'ять факторів, які кожен окремо чи в комбінації між собою спричинюють зміну провідності, що дає змогу використовувати кондуктометричний метод для реєстрації перебігу ферментативних реакцій (табл. 2). В багатьох реакціях виявляються одночасно декілька факторів, а саме: фактори 3 і 5 — для реакцій з фосфорилазою, фактори 1, 3—5 — для реакцій з апіразою. Найбільше впливають на зміну провідності і дозволяють використовувати кондуктометрію в ензимології фактори 1 і 2. Зменшення розмірів заряджених частинок не призводить до значної зміни провідності (субстрату фосфатазу). У реакціях, де має місце міграція протонів, необхідно додатково враховувати той факт, що на зміну провідності впливає тип буфера.

Аніонний буфер зменшує провідність, а катіонний — підвищує за рахунок протонування, тобто з'являється додаткова можливість обирати буфер для варіацій зміни провідності, яка має місце внаслідок дії інших факторів. Це було продемонстровано збільшеною зміною провідності, яку спостерігали в трисовому або імідазольному буфері при реакціях з ліпазами, а також незначною зміною провідності для цих ферментів у фосфатному буфері.

Цими ж авторами показано, що кондуктометричний метод можна також використати для всіх реакцій, які продукують зміни рН і визначаються, як правило, рН-титруванням. Чутливість таких методів можна порівнювати, але кондуктометрія має певні переваги. Перш за все, така установка

дешевша та простіша у використанні. Крім того, на відміну від кондуктометрії титрометрію можна проводити лише в одному напрямку зміни рН, і вона потребує складніших маніпуляцій при роботі.

Кондуктометричний метод було застосовано і для вивчення піроглутамілпептидази, при цьому отримано константи Міхаеліса, які відповідали 0,34 і 0,47 мМ для похідних аланіну і тирозину відповідно [66].

Але незважаючи на численні переваги, кондуктометричні методи мають ряд обмежень. Відношення сигналу до рівня шумів не повинно бути нижчим за 2 %. В цьому разі певну роль відіграє також концентрація буфера та інших інгредієнтів, які можна додавати до реакційної суміші. Присутність нереакційнодатних іонів у розчині зменшує чутливість методу. Але буфери з низькою іонною силою можна використовувати для визначення низьких концентрацій субстратів до тих пір, поки буде виконуватися співвідношення сигнал/шум. Одним з недоліків кондуктометрії є також малоспецифічність, його застосування не дає змоги відрізнити одну реакцію від іншої, що може призводити до артефактів. Похибки досить часто спричинює також емність подвійного шару та поляризація електродів під час реакції. Однак усі ці дослідження стали основою для подальшого удосконалення кондуктометричних біосенсорів.

Імобілізація біологічного матеріалу на поверхню кондуктометричних перетворювачів. Важливою частиною створення будь-якого біосенсора є вибір способу імобілізації біологічного матеріалу на поверхню перетворювача, для чого придатні всі принципи і методи, які зазвичай використовують при розробці біосенсорів і досить детально описані раніше [25—27].

При створенні кондуктометричних біосенсорів фермент найчастіше включали до плівки альбумінового гелю за допомогою глутарового альдегіду [19, 41, 53, 54, 67—70]. Наприклад, у роботі [41] уреазу було імобілізовано шляхом нанесення на поверхню електродів суміші (10 мкл), яка містила фермент (100 мг/мл), сироватковий альбумін бика (100 мг/мл) та 2,5 %-й розчин глутарового альдегіду. Гель фермент—альбумін формували протягом 9—10 хв при температурі 20 °С, товщина отриманої плівки складала близько 1,5 мм. У роботах [67—70] ферменти глюкозооксидазу, уреазу, ацетил- і бутирилхолінестеразу імобілізували в насичених парах глутарового альдегіду. В цьому

випадку краплю суміші (0,1 мкл), що містила фермент (50 мг/мл), сироватковий альбумін бика (50 мг/мл) та 10 %-й гліцерин наносили на чутливу поверхню перетворювача, який протягом 0,5 год перебував у насичених парах глутарового альдегіду.

Уреазу також ковалентно зв'язували з колагеновою мембраною [53]. Колагенову плівку обробляли 0,2 М розчином НСІ у метанолі протягом 48 год за кімнатної температури. Плівку тричі відмивали в дистильованій воді, потім переносили в 2 %-й водний розчин моногідрату гідразину на 4 год. Плівку знову відмивали та вносили у свіжоприготовлений розчин 0,2 М NaNO₂ і 0,2 М НСІ на 5 хв. Далі її додавали до розчину, який містив 25 мг ферменту в 10 мл буферного розчину. Таким чином отримували ферментативно активну мембрану.

Ще один метод імобілізації ферменту — це його електрохімічне осадження в присутності полімеру [54, 71]. Фермент вводили до полімерної матриці-носія шляхом простого захвату під час полімеризації. Фермент-поліпірольну плівку синтезували на поверхні золотих гребінчастих електродів за потенціостатичного режиму в 0,1 М насиченому N₂-фосфатному буферному розчині (рН 7), який містить 0,1 М тетраетиламоній-тетрафторборат, 0,1 М пірол і 4 мг/мл уреазу, для сенсора з визначення сечовини та в 0,1 М насиченому N₂-фосфатному буферному розчині (рН 7,0), що містить 10 мМ перхлорат калію, 0,1 М пірол та 2 мг/мл глюкозооксидази, для сенсора з визначення глюкози [71]. Процес електрохімічної полімеризації технологічно зручний: дозволяє вибирати і підтримувати розміри, форму та товщину мембрани, забезпечує контроль за процесом осадження, дає можливість виготовляти різні мікробіосенсиори і мультисенсиори в одному технологічному циклі.

У роботі [49] автори для імобілізації уреазу використовували золь-гель метод. Краплю суміші (5 мкл), яка містила уреазу (50 мг/мл у 5 мМ імідазоль-НСІ буфері), змішану в пропорції 1:1 з золь-гель розчином (5 мл тетраметилортосилікату, 1 мл води і 50 мкл НСІ), наносили на чутливу поверхню перетворювача для полімеризації. Час полімеризації складав від 1 до 3 хв залежно від співвідношення тетраметилортосилікату і води.

Зрозуміло, що наведено лише кілька методів імобілізації ферментів на поверхню перетворювачів, використовується ж їх значно більше. Оби-

раючи конкретний метод іммобілізації ферменту, необхідно враховувати такі загальні принципи: фермент повинен бути стабільним при проходженні реакції; бажано, щоб реагенти, які утворюють поперечні зшивки, взаємодіяли з хімічними групами, відсутніми в активному центрі, а якщо це не виконується, то згаданий реагент повинен бути якомога більших розмірів, щоб не проникати до активного центра; активний центр ферменту завжди слід захищати якимось чином; процедура відмивання незв'язаного ферменту не повинна негативно впливати на іммобілізований фермент; потрібно враховувати механічні властивості носія.

Якщо перераховані фактори присутні, то метод іммобілізації вибрано вдало.

Кондуктометричні ферментні біосенсори. Перший кондуктометричний біосенсор для визначення сечовини описано в роботі [41]. Прилад являв собою кремнійову основу з шаром окисненого кремнію, на яку за допомогою методу фотолітографії було напилено пару золотих гребінчастих та змієподібних електродів. Експерименти здійснювали як у лабораторних, так і в клінічних дослідженнях. Відгук біосенсора на сечовину знаходився в діапазоні 0,1—10 мМ у 5 мМ імідазольному буфері, рН 7,5. Значення K_m для іммобілізованого ферменту було вищим, ніж для ферменту в розчині, що автори пояснювали дифузійним лімітуванням. Результати лабораторних досліджень за допомогою біосенсора порівнювали із загальноприйнятими клінічними експериментами, внаслідок чого показано добре співвідношення між ними (коєфіцієнт кореляції більше 0,99).

Подібний кондуктометричний біосенсор було використано також як мультисенсор [19]. На поверхню однієї пари електродів датчика в шарі гелю іммобілізували уреазу, другої пари — L-аспарагіназу, а на поверхню третьої пари електродів — триферментну систему уреазу—креатиназу—креатиніназу. Такий мультисенсор використовували для визначення сечовини, L-аспарагіну та креатиніну відповідно. Сенсор тестували як з кожним субстратом окремо, так і в мультирежимі. Отримано кінетичні та калібровочні криві.

У табл. 3 наведено дані з розробки різних кондуктометричних ферментних біосенсорів, одержані в різні роки. З цієї таблиці видно, що найчастіше кондуктометричні перетворювачі використовували при створенні біосенсорів для визначення сечовини.

В роботі [71] описано кондуктометричний біосенсор для визначення вмісту сечовини у складі мультисенсору поряд із амперометричним, призначеним для визначення концентрації глюкози. Прилад характеризувався високою селективністю і простотою у використанні. Його було застосовано для клінічних досліджень.

Міккельсеном і співавт. охарактеризовано кондуктометричні біосенсори для визначення сечовини і D-амінокислот [53]. Біосенсори виготовляли з використанням ферментів уреазу і оксидази D-амінокислот. Мінімальна концентрація сечовини, яку можна було визначити, складала 5 мкМ, лінійний динамічний діапазон — три порядки. Досліджено вплив буферної ємності розчину на величину відгуку. При розробці сенсора для аналізу D-амінокислот фермент коіммобілізували з каталазою, оскільки продукований в ході ферментативної реакції пероксид водню пригнічує оксидазу D-амінокислот. Також порівнювали мідний і платиновий електроди та різні типи буферних розчинів, внаслідок чого показано доцільність використання платинових електродів та гліцинового буфера. Визначено рН-оптимум сенсора для D-амінокислот та його селективність відносно різноманітних амінокислот. Такий сенсор демонстрував стабільні результати протягом 33 днів.

Два типи кондуктометричних товстоплівкових біосенсорів для визначення сечовини описано в роботі [54]. Перший тип сенсоров виготовлено шляхом друкування двох гребінчастих електродів на основі Al_2O_3 з використанням платинової пасти, другий — за технологією «green tape». Останній являв собою чотири паралельних срібно-паладійових електроди. Уреазу іммобілізували ковалентним зв'язуванням в альбуміновому гелі. Час відгуку в обох випадках складав близько 10 хв. Динамічний діапазон для першого біосенсора складав 0,1—50 мМ сечовини з областю лінійності 0,1—4 мМ, для другого — 10 мкМ⁻⁵ мМ сечовини з областю лінійності 10—350 мкМ. Показано можливість використання такого типу приладів у медичному аналізі.

Кондуктометричний біосенсор на основі інгібіторного аналізу для визначення фосфорорганічних пестицидів вперше описано в роботі [70]. Як чутливий елемент використовували ферменти ацетил- і бутирилхолінестеразу. Досліджено чутливість біосенсора до ряду пестицидів (дізопропілфторфосфат, параоксон-етил, параоксон-метил,

Таблиця 3
Дані з розробки різних кондуктометричних біосенсорів

Речовина	Фермент	Літературне джерело
Сечовина	Уреаза	[19, 41, 49, 50, 53, 54, 67—69, 71, 72, 75, 77—82, 84, 85, 89, 94]
Креатинін	Уреаза-креатиназа-креатиніназа	[19]
	Креатинін-деміназа	[58]
L-аспарагін	L-аспарагіназа	[19]
Глюкоза	Глюкозооксидаза	[51, 58, 67—69, 72, 83, 85—87, 89, 90, 94]
Перекис водню	Пероксидаза	[56]
D-амінокислоти	Оксидаза D-амінокислот	[53]
Фосфорорганічні пестициди	Ацетилхолінестераза	[70, 73, 85, 89, 91, 93—96, 98]
	Бутирилхолінестераза	
Ацетилхолін	Ацетилхолінестераза	[72, 73, 85, 89, 91, 94]
Бутирилхолін	Бутирилхолінестераза	[72, 73, 85, 89, 91, 94]
Іони важких металів	Уреаза	[74, 89, 91, 93, 94, 98]
Пеніцилін	Пеніциліназа	[75, 89, 94]
Уринова кислота	Уриказа	[77]
Загальний білок	Трипсин	[88, 89, 94]
Формальдегід	Алкогольоксидаза	[89, 92, 94]
4-Хлорофенол	Тирозиназа	[97, 98]
Триазинові гербициди	Тирозиназа	[97, 98]
Карбаматні пестициди	Ацетилхолінестераза	[98]

трихлорфон), наведено мінімально визначені концентрації інгібіторів, які склали $5 \cdot 10^{-11}$ М для діізопропілфторфосфату, 10^{-8} М для параоксон-етилену та $5 \cdot 10^{-7}$ М для параоксон-метилу і трихлорфону. Авторами вивчено залежність величини відгуку біосенсора від часу інкубації датчика в розчині пестицидів, показано можливість відновлення активності ферменту в мембрані, використовуючи реактиватор піридин-2-альдоксим-метіодид, зроблено висновок про можливість використання описаних біосенсорів для аналізу фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах.

Вірогідність використання кондуктометричного уреазного біосенсора для визначення іонів важких металів продемонстровано в роботі [74]. В ній наведено ряд чутливості важких металів до уреазу, який має вигляд: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$, показано можливість реактивації ферменту після пригнічення ЕДТА.

У роботі [75] здійснено порівняльний аналіз робочих характеристик ферментних біосенсорів для визначення пеніциліну на основі кондуктометрич-

них планарних електродів і рН-чутливих польових транзисторів. Показано, що аналітичні характеристики обох датчиків подібні, вони мають короткий час відгуку та високу операційну стабільність, але з технологічної точки зору планарні кондуктометричні електроди є простішими та дешевшими при виготовленні. Це робить їх більш перспективними для виробництва і використання на практиці. Також продемонстровано можливість підбору необхідного динамічного діапазону роботи датчиків за рахунок зміни буферної ємності середовища.

Авторами [95, 96] показано застосування кондуктометричних біосенсорів для аналізу загальної токсичності розчину при дослідженні фотодеградації паратіон-метилу. Отримані результати порівняно з такими, що одержані традиційним високочутливим методом вискоефективної рідинної хроматографії та за допомогою приладу з визначення токсичності «Люмістокс» (Німеччина). Виявлено, що токсичність розчину різко збільшується з початком процесу фотодеградації пестициду. Розчин також залишається токсичним і тоді, коли

паратіон-метил повністю розклався. Але автори не протиставляють біосенсорний метод іншим, а лише мають на увазі використання його як додаткового швидкого методу для раннього скринінгу великої кількості зразків.

Висновки. Таким чином, всебічно розглянуто та проаналізовано застосування кондуктометричного методу вимірювань для реєстрації перебігу ферментативних процесів як при використанні стандартних кондуктометрів, так і за допомогою кондуктометричних ферментних біосенсорів. Даний метод універсальний, забезпечує більшу точність та меншу трудомісткість порівняно з загальновідомими методами біохімічного аналізу.

Кондуктометричні біосенсори також демонструють низку переваг у порівнянні з іншими типами датчиків. Це, перш за все, використання при їхньому виготовленні недорогої тонкоплівкової стандартної технології, яка разом із застосуванням оптимізованої методики іммобілізації біологічного матеріалу дозволяє значно зменшити як собівартість подібних пристроїв, так і вартість аналізу в цілому. Для інтегральних мікробіосенсорів дуже легко забезпечити диференційний режим вимірювань, що дозволяє компенсувати зовнішні впливи на систему і значно підвищити точність вимірювань. Наведені дані вказують на перспективність розробки таких приладів. Але оскільки цей напрямок у розвитку біосенсорів ще досить молодий, тому, мабуть, до сьогодні і не існує комерційних приладів на їхній основі.

Частина цієї роботи виконано завдяки фінансовій підтримці фонду НАТО (Collaborative Linkage Grant No 979775) та комплексної програми Національної Академії Наук України «Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій».

S. V. Dzyadevych

Conductometric enzyme biosensors: theory, technology, application

Summary

A theoretic principles of conductometric method of measurements, possibility of their application for registration of enzymatic reactions, and examples of such application have been shown. Variants of different conductometric transducers for biosensor creation, immobilisation methods of active material onto surface, measurements schemes and methods have been presented. Some examples of conductometric enzyme biosensors, their advantages and disadvantages, and perspectives of their application have been described.

Key words: conductometric biosensor, impedance, conductance, enzyme.

C. В. Дзядевич

Кондуктометрические ферментные биосенсоры: теория, технология, применение

Резюме

Рассмотрены теоретические основы кондуктометрического метода измерений и возможность его использования для регистрации прохождения ферментативных реакций, что проиллюстрировано соответствующими данными разных исследований. Приведены примеры многих кондуктометрических преобразователей, используемых при создании биосенсоров, методы иммобилизации активного материала на их поверхность, схемы и методики измерений. Описаны некоторые модели кондуктометрических биосенсоров, обсуждены их преимущества и недостатки, а также перспективы дальнейшего развития.

Ключевые слова: кондуктометрический биосенсор, импеданс, проводимость, фермент.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Coulet P. R. What is a biosensor? // Biosensor principles and application / Eds L. J. Blum, P. R. Coulet.—New York: Marcel Dekker Inc., 1991.—P. 1—6.
2. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report) // Pure Appl. Chem.—1999.—71.—P. 2333—2348.
3. Hall E. A. H. Recent progress in biosensor development // Int. J. Biochem.—1988.—20, N 4.—P. 357—362.
4. 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.
5. Bartlett P. N., Whitaker R. G. Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes // Biosensors.—1987/1988.—3.—P. 359—379.
6. Morrison L. E. Time resolved detection of energy transfer: theory and application to immunoassays // Anal. Biochem.—1988.—174.—P. 101—120.
7. Lee H. A., Morgan M. R. A. Food immunoassay: application of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies // Trends Food Sci. Technol.—1993.—3.—P. 129—134.
8. Buch R. M., Rechnitz G. A. Neuronal biosensors // Anal. Chem.—1989.—61, N 8.—P. 533A—542A.
9. Lewis R. Biological recognition repackaged // BioScience.—1989.—39, N 5.—P. 288—291.
10. Wiseman A. Comparison of use of immobilized cells and immobilized enzymes for bioanalysis: considerations in determination of ethanol // Trends Anal. Chem.—1992.—11, N 8.—P. 303—306.
11. Karube I., Sode K. Microbial sensors for process and environmental control // Bioinstrumentation and biosensors / Ed. D. L. Wise.—New York: Marcel Dekker Inc., 1991.—P. 149—160.
12. Dumschat C., Muller H., Stein K., Schwedt G. Pesticide-sensitive ISFET based on enzyme inhibition // Anal. Chim. Acta.—1991.—252.—P. 7—9.
13. Bergveld P. Thirty years of ISFETOLOGY. What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years? // Sensors and Actuators B.—2003.—88.—P. 1—20.
14. Jossinet J., McAdams E. T. The sin-electrode interface impedance // Innov. Tech. Biol. Med.—1991.—12, N 1.—P. 21—31.
15. Macdonald J. R. Impedance/admittance response of a binary

- electrolyte // *Electrochim. Acta.*—1992.—37, N 6.—P. 1007—1014.
16. *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.
 17. *Дзядевич С. В.* Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций // *Биополімери і клітина.*—2002.—18, № 1.—С. 13—25.
 18. *Kell D. B., Davey C. L.* Conductimetric and impedimetric devices // *Biosensors. A practical approach* / Ed. A. F. Gass.—Oxford: IRL Press, 1990.—P. 125—153.
 19. *Cullen D. B.C., Sethi R. B.S., Lowe C. R.* Multi-analyte miniature conductance biosensor // *Anal. Chim. Acta.*—1990.—231. P. 33—40.
 20. *Fawcett N., Evans J., Chien L.-C., Flowers N.* Nucleic acid hybridization detected by piezoelectric resonance // *Anal. Lett.*—1988.—21, N 7.—P. 1099—1114.
 21. *Roef P.* Attention focuses on optical fibre biosensors // *Sensor Rev.*—1987.—7, N 3.—P. 127—132.
 22. *Smardzewski R. R.* Multi-element optical waveguide sensor: general concept and design // *Talanta.*—1988.—35, N 2.—P. 95—101.
 23. *Luong J. H. T., Mulchandani A., Guibault G. G.* Developments and application of biosensors // *Tibtechnology.*—1988.—6.—P. 310—316.
 24. *Dittmar A., Pauchard T., Delhomme G., Vernet-Maury E.* A thermal conductivity sensor for measurement of skin blood-flow // *Sensor and Actuators.*—1992.—7, N 1—3.—P. 327—331.
 25. *Дзядевич С. В.* Биосенсоры на основе ион-селективных полевых транзисторов: теория, технология, практика // *Биополімери і клітина.*—2004.—20, № 1.—С. 7—16.
 26. *Дзядевич С. В.* Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // *Биополімери і клітина.*—2002.—18, № 5.—С. 363—376.
 27. *Дзядевич С. В., Солдаткин О. П.* Кондуктометричный метод у ферментативному аналізі // *Укр. біохім. журн.*—1994.—66, № 4.—С. 30—42.
 28. *Hall E.* *Biosensors.*—Cambridge: Open Univ. press, 1991.—351 p.
 29. *Tran Minh C.* *Biosensors.*—London: Chapman & Hall, 1993.—236 p.
 30. *Kress-Rogers E.* *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment.*—New York: CRC press, 1997.—720 p.
 31. *Glass R. S., Perone S. P., Ciarlo D. R.* Application of information theory to electroanalytical measurements using a multielement, microelectrode array // *Anal. Chem.*—1990.—62.—P. 1914—1918.
 32. *Hoffheins B. S., Lauf R. J., Siegel M. W.* Intelligent thick-film gas sensor // *Hybrid Circuits.*—1987.—14.—P. 8—12.
 33. *Alder J. F., Fielden P. R., Clark A. J.* Simultaneous conductivity and permittivity detector with a single cell for liquid chromatography // *Anal. Chem.*—1984.—56.—P. 985—988.
 34. *Дорохова Е. Н., Прохорова Г. В.* Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа.—М.: Высш. школа, 1991.—256 с.
 35. *Gopel W., Jones T. A., Kleitz M., Lundstrom J., Seiyama T.* Conductometry // *Sensors. A Comprehensive Survey* // Eds W. Gopel, J. Hesse, J. N. Zemel.—Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1991.—Vol. 2, pt I.—P. 314—337.
 36. *Kell D. B.* The principles and potential of electrical admittance spectroscopy: an introduction // *Biosensors: Fundamentals and Applications* / Eds A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson.—Oxford: Oxford Univ. press, 1987.—P. 427—468.
 37. *Камман К.* Работа с ионо-селективными электродами.—М.: Мир, 1980.—283 с.
 38. *Феттер К.* Электрохимическая кинетика.—М.: Химия, 1967.—855 с.
 39. *McAdams E. T., Jossinet J.* Electrode-electrolyte impedance and polarisation // *Innov. Tech. Biol. Med.*—1991.—12, N 1.—P. 11—20.
 40. *Антропов Л. И.* Теоретическая электрохимия.—М.: Высш. школа, 1984.—519 с.
 41. *Watson L. D., Maynard P., Cullen D. C., Sethi R. S., Brettell J., Lowe C. R.* A microelectronic conductometric biosensor // *Biosensors.*—1987/1988.—3.—P. 101—115.
 42. *Kissinger P. T., Heineman W. R.* *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry.*—New York: Marcel Dekker Inc., 1984.—...p.
 43. *Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковский С. В., Архипова В. Н., Солдаткин А. П., Стриха В. И.* Тонкопленочный кондуктометрический датчик для ферментных биосенсоров // *Электрохимия.*—1994.—30, № 8.—С. 982—987.
 44. *Olthuis W., Volanschi A., Bomer J. G., Bergveld P.* A new probe for measuring electrolytic conductance // *Sensors and Actuators B.*—1993.—13—14.—P. 230—233.
 45. *Olthuis W., Smith A., Van der Zalm R. A. J., Bergveld P.* New operational modes for the Ta₂O₅-based electrolyte conductance cell // *Sensors and Actuators B.*—1994.—18—19.—P. 65—68.
 46. *Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Patskovsky S. V., Arkhipova V. N., Soldatkin A. P., Strikha V. I.* Thin-films conductometric transducer for enzyme biosensor // *Rus. J. Electrochem.*—1994.—30, N 8.—P. 887—891.
 47. *Weimar U., Gopel W.* A. c. measurements on tin oxide sensors to improve selectivities and sensitivities // *Sensors and Actuators B.*—1995.—26—27.—P. 13—18.
 48. *Sheppard N. F., Tucker R. C., Wu C.* Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes // *Anal. Chem.*—1993.—65.—P. 1199—1202.
 49. *Lee W. Y., Kim S. R., Kim T. H., Lee K. S., Shin M. C., Park J. K.* Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum // *Anal. Chim. Acta.*—2000.—404.—P. 195—203.
 50. *Jacobs P., Suls J., Sansen W.* Performance of a planar differential-conductivity sensor for urea // *Sensors and Actuators B.*—1994.—20.—P. 193—198.
 51. *Hintsche R., Moller B., Dransfeld I., Wollenberger U., Scheller F., Hoffmann B.* Chip biosensors on thin-film metal electrodes // *Sensors and Actuators B.*—1991.—4.—P. 287—291.
 52. *Trebbe U., Niggemann M., Cammann K., Fiaccabrino G. C., Koudelka-Hep M., Dzyadevich S., Shulga O.* A new calcium sensor based on ion-selective conductometric microsensors — membranes and features // *Fres. J. Anal. Chem.*—2001.—371.—P. 734—739.
 53. *Mikkelsen S. K., Rechnitz G. A.* Conductometric transducers for enzyme-based biosensors // *Anal. Chem.*—1989.—61.—P. 1737—1742.
 54. *Bilitewski U., Drewes W., Schmid R. D.* Thick film biosensors for urea // *Sensors and Actuators B.*—1992.—7.—P. 321—326.
 55. *McNeil C. J., Athey D., Ball M., On Ho W., Krause S., Armstrong R. D., Wright J. D., Rawson K.* Electrochemical

- sensors based on impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer dissolution: theory and application // *Anal. Chem.*—1995.—67.—P. 3928—3935.
56. *Sergeeva T. A., Lavrik N. V., Rachkov A. E., Kazantseva Z. I., Piletsky S. A., El'skaya A. V.* Hydrogen peroxide — sensitive enzyme sensor based on phtalocyanine thin film // *Anal. Chim. Acta.*—1999.—391.—P. 289—297.
 57. *Endres H.-E., Drost S.* Optimization of the geometry of gas-sensitive interdigital capacitors // *Sensors and Actuators B.*—1991.—4.—P. 95—98.
 58. *On Ho W., Krause S., McNeil C. J., Pritchard J. A., Armstrong R. D., Athey D., Rawson K.* Electrochemical sensor for measurement of urea and creatinine in serum based on ac impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer transformation // *Anal. Chem.*—1999.—71.—P. 1940—1946.
 59. *Chin W. T., Kroontje W.* Conductivity method for determination of urea // *Anal. Chem.*—1961.—33, N 12.—P. 1757—1760.
 60. *Bourrelly P., Bourrelly-Durand V.* Methode d'etude par conductometric differentielle de la cinetique de l'hydrolise enzymatique de l'uree // *J. Chem. Phys.*—1965.—65.—P. 673—677.
 61. *Андреев В. С., Розенгарт В. И., Торубаров В. А.* Регистрация кинетики ферментативных реакций высокочастотным способом // *Укр. биохим. журн.*—1965.—37, № 6.—С. 920—926.
 62. *Андреев В. С., Баштанов А. В.* Дифференциальный кондуктометрический прибор для регистрации физико-химических процессов // *Заводская лаборатория.*—1968.—34, № 12.—С. 1546—1548.
 63. *Hanss M., Rey A.* Application de la conductometrie a l'etude des reactions enzymatiques. Systeme uree-urease // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1971.—227.—P. 630—638.
 64. *Lawrence A. J.* Conductometric enzyme assays // *Eur. J. Biochem.*—1971.—18.—P. 221—225.
 65. *Lawrence A. J., Moores G. R.* Conductometry in enzyme studies // *Eur. J. Biochem.*—1972.—24.—P. 538—546.
 66. *Besson C., Vessillier S., Gonzales T., Saulnier J., Wallach J.* Conductometric assay of pyroglutamyl peptidase activity // *Anal. Chim. Acta.*—1994.—294.—P. 305—309.
 67. *Shul'ga A. A., Dzyadevich S. V., Soldatkin A. P., Patskovsky S. V., Strikha V. I., El'skaya A. V.* Thin-film conductometric biosensor for glucose and urea determination // *Biosensors and Bioelectronics.*—1994.—9.—P. 217—223.
 68. *Shul'ga A. A., Dzyadevich S. V., Soldatkin A. P., Patskovsky S. V., Strikha V. I.* Conductometric biosensors for glucose and urea based on microfabricated thin-film interdigitated array-electrodes // *Biol. Ital.*—1993.—23, N 6.—P. 40—45.
 69. *Шульга А. А., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Пацковский С. В., Стародуб Н. Ф., Стриха В. И., Ельская А. В.* Тонкопленочный кондуктометрический энзимобиосенсор для определения глюкозы и мочевины в крови // *Электрохимия.*—1993.—29, № 8.—С. 998—1002.
 70. *Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Шульга А. А., Стриха В. И., Ельская А. В.* Кондуктометрический биосенсор для определения фосфоорганических пестицидов // *Журн. аналит. химии.*—1994.—49, № 8.—С. 874—878.
 71. *Hin B. F. Y., Sethi R. S., Lowe C. R.* Multi-analyte micro-electronic biosensor // *Sensors and Actuators B.*—1990.—1.—P. 550—554.
 72. *Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Soldatkin A. P., El'skaya A. V.* Enzyme biosensor based on micromachined interdigitated conductometric transducer: application to the detection of urea, glucose, acetyl and butyrylcholine chlorides // *Sensors and Actuators B.*—1994.—21.—P. 123—129.
 73. *Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Soldatkin A. P., Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.* Application of conductometric for sensitive detection of pesticides biosensor based on the cholinesterases // *Electroanalysis.*—1994.—6.—P. 752—758.
 74. *Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V.* Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination // *Sensors and Actuators B.*—1995.—24—25.—P. 145—148.
 75. *Dzyadevich S. V., Zhylyak G. A., Soldatkin A. P., El'skaya A. V.* Conductometric urease microbiosensor based on thin-films interdigitated electrodes for urea determination // *Biopolimery i kletka.*—1996.—12, N 1.—P. 53—57.
 76. *Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Ельская А. В.* Ферментные биосенсоры для определения пенициллина на основе кондуктометрических планарных электродов и pH-чувствительных полевых транзисторов // *Укр. біохім. журн.*—1996.—68, № 1.—С. 27—32.
 77. *Castillo-Ortega M. M., Rodriguez D. E., Encinas J. C., Plascencia M., Mendez-Velarde F. A., Olayo R.* Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites // *Sensors and Actuators B.*—2002.—85.—P. 19—25.
 78. *Limbut W., Thavarungkul P., Kanatharana P., Asawatratanakul P., Limsakul C., Wongkittisuksa B.* Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductometric biosensor system // *Biosensors and Bioelectronics.*—2004.—8.—P. 813—821.
 79. *Steinschaden A., Adamovic D., Jobst G., Glatz R., Urban G.* Miniaturised thin film conductometric biosensors with high dynamic range and high sensitivity // *Sensors and Actuators B.*—1997.—44.—P. 365—369.
 80. *Lee W.-Y., Lee K. S., Kim T.-H., Shin M.-C., Park J.-K.* Microfabricated conductometric urea biosensor based on sol-gel immobilized urease // *Electroanalysis.*—2000.—12.—P. 78—82.
 81. *Sheppard N. F., Mears D. J., Guiseppi-Elie A.* Model of an immobilized enzyme conductometric urea biosensor // *Biosensors and Bioelectronics.*—1996.—11.—P. 967—979.
 82. *Gallardo Soto A. M., Jaffari S. A., Bone S.* Characterisation and optimisation of AC conductometric biosensors // *Biosensors and Bioelectronics.*—2001.—16.—P. 23—29.
 83. *Jin P., Yamaguchi A., Asari O. F., Matsuo S., Tan J., Misawa H.* Glucose sensing based on interdigitated array micro-electrode // *Analyt. Sci.*—2001.—17.—P. 841—846.
 84. *Senillou A., Jaffrezic N., Martelet C., Cosnier S.* A laponite clay-poly(pyrrrole-pyridinium) matrix for the fabrication of conductometric microbiosensors // *Analyt. Chim. Acta.*—1999.—401.—P. 117—124.
 85. *Дзядевич С. В., Корпан Я. И., Солдаткин А. П., Шульга А. А., Стриха В. И., Ельская А. В.* Использование кондуктометрических микросенсоров для определения кинетических параметров ферментов // *Укр. біохім. журн.*—1993.—65, № 5.—С. 47—54.
 86. *Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A., Jdanova A. S., Dzyadevich S. V., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet P.* Glucose sensitive conductometric biosensor with additional NAFION membrane: reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range // *Anal. Chim. Acta.*—1994.—288.—P. 197—203.
 87. *Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Архипова В. М., Шульга*

- О. А., Ельська Г. В. Кондуктометричний ферментний глюкосенсор. Пошук шляхів поліпшення аналітичних характеристик // Укр. біохім. журн.—1995.—67, № 6.—С. 53—59.
88. Білоіван О. А., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П., Стародуб М. Ф., Ельська Г. В. Ензимосенсор на основі трипсину та кондуктометричних планарних електродів для визначення вмісту білків та пептидних субстратів у водних розчинах // Укр. біохім. журн.—1997.—69, № 2.—С. 14—18.
89. Soldatkin A. P., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Arkhipova V. N., Zhylyak G. A., Piletsky S. A., Sergeeva T. A., Panasyuk T. L., El'skaya A. V. Biosensors based on conductometric detection // *Biopolimery i kletka*.—1998.—14, N 4.—P. 268—277.
90. Dzyadevich S. V., Arkhipova V. N., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A. Glucose conductometric biosensor with potassium hexacyanoferrate (III) as an oxidizing agent // *Anal. Chim. Acta*.—1998.—374.—P. 11—18.
91. Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Щувайло О. Н., Солдаткін А. П., Ельська А. В., Жафрезик-Рено Н., Жафрезик Г., Мартле К. Концепція мультибиосенсора для визначення різних токсичних речовин на основі ферментного інгібіторного аналізу // *Біополімери і клітина*.—2001.—17, № 1.—С. 70—77.
92. Dzyadevych S. V., Arkhipova V. N., Korpan Y. I., El'skaya A. V., Soldatkin A. P., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. Conductometric formaldehyde sensitive biosensor with specifically adapted analytical characteristics // *Analyt. Chim. Acta*.—2001.—445.—P. 47—55.
93. Arkhipova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Jaffrezic H., Martelet C. Multi-biosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances // *Talanta*.—2001.—55.—P. 919—927.
94. Dzyadevych S. V., Arkhipova V. N., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Soldatkin A. P. Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis // *Curr. Top. Analyt. Chem.*—2001.—2.—P. 179—186.
95. Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Chovelon J.-M. Assessment of the toxicity of parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors // *Analyt. Chim. Acta*.—2002.—459.—P. 33—41.
96. Dzyadevych S. V., Chovelon J.-M. A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique // *Materials Sci. and Engin. C*.—2002.—21.—P. 55—60.
97. Mai Anh T., Dzyadevych S. V., Chau Van M., Jaffrezic-Renault N., Duc Chien N., Chovelon J.-M. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of dluron, atrazine and its main metabolites // *Talanta*.—2004.—63.—P. 365—370.
98. Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Arkhipova V. N., El'skaya A. V., Chovelon J.-M., Georgiou C., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for the environmental monitoring based on enzyme inhibition effect // *Sensors and Actuators B*.—2005.—105.—P. 81—87.

УДК 577.15; 573.6

Надійшла до редакції 18.02.04