

## Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов

С. В. Дзядевич

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

---

*Проанализированы возможности современных микросистемных технологий, включающих производство амперометрических биосенсоров (изготовление преобразователей, методы иммобилизации биологического материала, совмещение различных технологических процессов в одном производственном цикле). Описаны современные коммерческие системы на основе амперометрических биосенсоров и области их применения.*

---

**Введение.** В предыдущем обзоре [1] подробно рассмотрены основные принципы и понятия, связанные с разработкой амперометрических биосенсоров, а также подробно описаны все их группы, существующие на данный момент. Повышенное внимание было уделено научным основам, принципам и подходам к их созданию. Данный обзор продолжает описание этого самого обширного и успешного в плане коммерциализации класса приборов биомолекулярной электроники. Основу его составляют вопросы, связанные с современными микроэлектронными микросистемными технологиями (MEMS-technology), включающими изготовление электродов, методы иммобилизации биологического материала, совмещение разных процессов в одном технологическом цикле, а также описание реальных коммерческих вариантов амперометрических биосенсоров и областей их применения.

Чаще всего термин «микро» используется как противовес слову «макро» и ни в коей мере не связан с «микронном» или «микрометрией». «Микро» в микросистемных технологиях (в частности, в микроэлектронике) используется в том же смысле, что и в слове микроскоп, то есть прибор, позволяющий увидеть мелкие предметы. Насколько мелкие — это не имеет значения. Обычно «микро» — это системы с микронными или миллиметровыми размерами, хотя нижний предел зачастую меньше,

поскольку нанотехнологии и ультрамикроэлектроды с наноразмерами также являются типичными элементами микросистем [2]. Поэтому микросистемные технологии — это технологии, связанные с микросистемами и комбинирующие оригинальные гетерогенные технологические процедуры производства электронных, механических, оптических и других компонент на базе планарных литографических процессов [3, 4].

Развитие амперометрических биосенсоров неразрывно связано с развитием микросистемных технологий. Огромный прогресс в разработке микроэлектродов стал возможен благодаря современным достижениям в области микромеханики и увеличению чувствительности и качества сопутствующего электрического оборудования. Одновременно с этим прогресс в математике и вычислительной технике привел к возможности теоретически моделировать микросистемы и их работу в различных условиях, оценивать их чувствительность и соотношение сигнал/шум, тем самым понижая затраты на проведение дополнительных экспериментов [5]. К тому же миниатюризация таких систем позволила уменьшить расходы на реагенты, используемые при анализе, и сделала их гораздо удобнее в эксплуатации и при транспортировке [6]. Все эти явно положительные факторы привели к успешной коммерциализации амперометрических биосенсоров.

Современные материалы и технологии изготовления амперометрических преобразователей. *Материалы, используемые при изготовлении амперометрических преобразователей.* Большинство амперометрических преобразователей состоит из проводящего рабочего электрода и поддерживающего его основания (в планарной технологии — подложки). Материалы, чаще всего используемые при изготовлении рабочего электрода, — благородные металлы и различные формы углерода. Прежде всего, это такие металлы, как платина, золото, серебро и высококачественная сталь, поскольку они имеют великолепные электрические и механические свойства. Возможность использования углеродных волокон при создании сенсоров впервые продемонстрирована Вебером [7]. Волокна располагались параллельно и были отделены друг от друга изоляторами. Углеродные материалы, такие как графит, сажистый углерод, активированный углерод и углеродное волокно, обладают высокой химической инертностью и обеспечивают работу в широком диапазоне потенциалов с низким электрическим сопротивлением. Они имеют также беспримесную кристаллическую структуру, что обеспечивает низкие остаточные токи и высокое соотношение сигнал/шум [8].

Часто для изготовления электродов применяются различные смешанные материалы. В этом случае проводящий композитный материал формируется комбинацией двух или более неоднородных материалов [7]. Каждый материал сохраняет свои оригинальные свойства, а композит обладает улучшенными химическими, механическими и физическими свойствами по сравнению с индивидуальными компонентами. В частности, углеродно-полимерный композит сначала изготавливали путем дисперсии графитового порошка в различные полимерные материалы (эпоксидная смола, силикон, метакрилат, полиэстер, полиуретан и др.). Затем этот композит смешивали с ферментом и медиатором и из него формировали проводящий электрод. Таким образом, в частности, был изготовлен смешанный рабочий электрод с ферментом, адсорбированным на пиролитический кобальт-тетраметоксифенилпорфирин [9].

В последние годы широко стали применяться электропроводящие полимеры. Эти материалы могут быть использованы как при изготовлении непосредственно электродов, так и для иммобилизации биологического материала. В качестве примера можно привести электрод, изготовленный с использованием эластичной проводящей полимерной пленки полипиррола, допированной полианионами, и микропористого слоя черненой платины [10].

В качестве непроводящей подложки (поддерживающего основания) чаще всего используют керамику, ситал, стекло, кремний, полистирол, поливинилхлорид.

*Технологии изготовления амперометрических преобразователей.* Технологии, используемые при изготовлении амперометрических преобразователей, можно классифицировать следующим образом: трафаретная печать; химическое или электрохимическое нанесение; полимеризация; плазменная полимеризация (вакуумное напыление); микролитография.

Трафаретная печать — толсто пленочная технология, широко используемая при массовом производстве, при которой материал в виде пасты печатается непосредственно на подложку через маску с необходимым дизайном. Сейчас эта техника применяется при создании биосенсоров на основе углерода и графита. Группа Тернера недавно улучшила эту технологию, применив в качестве маски растворимый резист, как подложку — высокотемпературные пластиковые листы, проводящие углеродные контакты и полимер на основе эпоксидной смолы [11]. Эти электроды практически не меняли своих характеристик со временем и позволяли работать в смешанных с водой органических растворителях.

Семиканальный мультисенсор, позволяющий после иммобилизации биологического материала определять сразу несколько параметров одновременно в цельной крови и сыворотке, описан в работе [12]. Его преобразователь изготовлен с помощью трафаретной печати и состоял из 14 золотых электродов (семь пар: рабочий — вспомогательный) и одного Ag/AgCl электрода сравнения.

В работе [13] рассматривается трафаретная технология изготовления не только преобразователя, но и готового биосенсора. В этом варианте сначала готовили смесь тетрацианохинодимертана (TCNQ) с раствором тетрагидрофульвалена (ТТФ) в ацетонитриле. На полученный органический проводящий комплекс адсорбировали глюкозооксидазу. Затем такой комплекс смешивали со связующим веществом и растворителем. Эту пасту наносили на матрицу углублений и высушивали в вакууме, после чего наносили тонкий желатиновый слой. Далее этот датчик помещали в 5 %-й раствор глутарового альдегида. Разработанный сенсор имел большой отклик с минимальной интерференцией с кислородом, расширенный диапазон работы до концентрации глюкозы 100 мМ, а также высокую стабильность.

Наиболее полно различные конфигурации амперометрических ферментных биосенсоров на осно-

ве технологии трафаретной печати, их преимущества и недостатки описаны в обзоре Алегре [14].

**Химическое или электрохимическое нанесение** — традиционный метод, применяемый при создании амперометрических преобразователей для нанесения электропроводящих пленок на подложку. Наносимые пленки могут быть чисто металлическими (например, платиновыми), состоять из каталитического материала (например, TiO) или составлять металлический комплекс с биологическими компонентами. В работе [15] рассмотрены различные аналитические стратегии создания амперометрических биосенсоров на основе химически модифицированных электродов и ферментов альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

**Полимеризация** — метод, при котором происходит конденсация небольших молекул в мономерах или образуются свободные радикалы с дальнейшей перестройкой связей внутри каждого мономера. Свободные радикалы образуются при разрыве двойных связей в результате тепловой, световой или электрохимической активации. Электропроводность может быть увеличена введением металлического порошка в мономер перед полимеризацией. Таким образом, с помощью электрополимеризации на золотых электродах были сформированы толстые пленки голубого полиметилена — электрокаталитически активного проводящего слоя, обладающего прочным и стабильным контактом с золотой электродной поверхностью [16]. Методом электрополимеризации были также получены тонкие пленки поли(1,3-диаминобензена), которые позволили значительно уменьшить электрохимическую интерференцию аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, ацетаминофена и других электроактивных частиц при определении креатинина в сыворотке крови человека [17]. В работе [18] фермент был введен в редокс-полимер на основе гидрогеля с помощью фотоиницированной свободнорадикальной полимеризации. Благодаря этому увеличилась скорость переноса электронов с редокс-сайта фермента на поверхность электрода через гель.

**Плазменная полимеризация** (вакуумное напыление) — полимеризация в высоком вакууме, при которой на поверхность подложки вводят функциональные группы и затем покрывают полимеризуемой газовой плазмой до образования пленки. Плазменно-полимеризованные пленки, генерируемые в тлеющем электрическом заряде или в паровой газовой фазе, могут быть очень тонкими (< 1 мкм) и обладать великолепной адгезией. В работе [19] подробно рассмотрено изго-

товление таких пленок и приведены примеры иммобилизации биологического материала на поверхности с дальнейшим использованием полученных преобразователей в качестве биосенсоров.

**Микролитография** — хорошо известная и широко применяющаяся в полупроводниковой промышленности технология при производстве интегральных схем и структур. Для создания структуры необходимой конфигурации на слой металла наносят фотодеградирующий резист, а поверх него — фотошаблон. В процессе фотолитографии свет проникает через фотошаблон на поверхность фотодеградируемого резиста, формируя таким образом нужный рисунок. Затем происходит химическое травление металлического слоя через полученную резистивную маску, а после этого оставшийся резист удаляется. Минимальная толщина линий получающегося рисунка, создаваемого с помощью фотолитографии, может составлять 2 мкм. В случае же нанолитографии, когда используется электронорезист, толщина может уменьшиться до  $5 \cdot 10^{-5}$  мкм. Метод микролитографии применим в удивительно широкой области технологических задач для обработки самых различных материалов. Характерной чертой изготавливаемых с помощью фотолитографии структур является их квазидвумерность, или планарность, так как отношение параметров, характеризующих рельеф поверхности, обычно не превосходит 1:5. Это позволяет избежать погрешностей, связанных с эффектами на боковых гранях планарных электродов. И в то же время при необходимости существуют возможности для создания трехмерных микроструктур путем их механической и химической обработки [20].

Все приведенные выше технологии используются при создании амперометрических сенсоров. Однако в последнее время различные технологии чаще всего комбинируют, так как применяя разнообразные материалы, можно формировать многослойные структуры с заранее заданными свойствами. Так, к примеру, двухслойный полимер, нанесенный электрополимеризацией на электрод и содержащий полипирол, улучшил селективность и уменьшил интерференцию глюкозы с электроактивными частицами мочевой и аскорбиновой кислот, присутствующих в биологических жидкостях [21]. В работе [22] предложена многослойная архитектура, предопределяющая заранее направление переноса электронов, включающая в себя редокс-медиаторы, ферменты и полностью преграждающая доступ интерферирующих компонент. Очень перспективным кажется подход, при котором формируется прямое электрохимическое соеди-

нение между активным центром фермента и поверхностью электрода с помощью биокатализаторов с очень маленькой молекулярной массой (например, микропероксидаза), которые иммобилизируются на тиомонослой [23]. В этом случае расстояние между ферментом и поверхностью электрода значительно сокращается, и такая модификация увеличивает величину выходного сигнала.

При создании глюкозного сенсора получены электрически проводящие и механически гибкие композитные полимеры [24]. В работе [25] для получения пористого, неактивного слоя поверх углеродного электрода использованы фибриногенные пленки, с помощью которых контролировали диффузию частиц в активную мембрану. Таким образом, при выборе материалов и технологии для изготовления амперометрических преобразователей необходимо учитывать дизайн датчика, особенности его конструкции, используемые материалы, метод дальнейшей иммобилизации биоселективного материала и методику работы с готовым прибором.

Современные материалы и методы иммобилизации биологического материала, используемые при создании амперометрических биосенсоров. *Принципы иммобилизации биологического материала.* Процесс иммобилизации биологического материала можно определить как включение биологической молекулы в некую изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, однако может обмениваться с ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

История иммобилизации ферментов ведет свое начало с 1916 г., когда Нельсон и Гриффин показали, что инвертаза, адсорбированная на угле, сохраняет свою каталитическую активность. В 20—30-е гг. работы по изучению адсорбции белков и ферментов были продолжены, однако исследования этого периода не преследовали практических целей. В 1939 г. Пфанмюллер и Шлейх получили первый патент на применение адсорбированных на древесных опилках протеолитических ферментов для обработки шкур. В 1949 г. Майкл и Юэрс использовали азидную производную карбоксиметил-целлюлозы для иммобилизации целого ряда белков. Однако серьезные эксперименты в этой области не проводились до 1954 г., когда Грубхофер и Шляйт использовали диазопроизводные поли-*n*-аминостирола для иммобилизации пепсина, амилазы и карбоксипептидазы [26]. В середине 60-х гг. были опубликованы первые работы по аналитическому применению иммобилизованных ферментов. В 1965 г. Гилболт включил холиэстеразу в крахмальный гель, который затем был нанесен на полиуретановую пластинку и использован для

определения фосфоорганических соединений в воздухе [27].

Иммобилизованные ферменты обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с нативными ферментами:

гетерогенный катализатор можно легко отделить от реакционной среды, что дает возможность остановить в нужный момент реакцию, использовать его повторно и получить чистый продукт, не загрязненный ферментом;

использование иммобилизованных катализаторов позволяет проводить ферментативный процесс непрерывно, например, в проточной ячейке и регулировать скорость катализируемой реакции, а также выход продукта, изменяя скорость потока;

иммобилизация ферментов дает возможность регулировать их каталитическую активность за счет изменения свойств носителя под действием некоторых физических факторов, таких, к примеру, как свет или звук;

иммобилизация или/и модификация ферментов способствует целенаправленному изменению свойств катализатора, в том числе специфичности, зависимости каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды.

*Материалы, используемые для иммобилизации биологического материала.* Успех практического использования иммобилизованных ферментов в значительной мере зависит от подходящего выбора носителя. В настоящее время для иммобилизации биологического материала применяют огромное количество носителей как органических, так и неорганических. Основные требования, предъявляемые к ним, следующие: высокая химическая и биологическая стойкость; высокая механическая прочность; достаточная проницаемость для фермента и субстратов, большая удельная поверхность, высокая вместимость, пористость; возможность получения в виде удобных в технологическом плане форм; легкое переведение в реакционноспособную форму (активация); высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность проведения реакции связывания фермента с носителем в водной среде; низкая стоимость.

Наиболее часто применяемые при иммобилизации материалы — это многофункциональные агенты (глутаровый альдегид и гексаметилдиизоцианат), формирующие ковалентные связи между биокаталитическими частицами или белками, а также непроводящие полимеры (полиакриламид и полифенол), которые формируют некое подобие сетки для захвата и удержания биологического материала.

Преимуществом органических проводящих по-

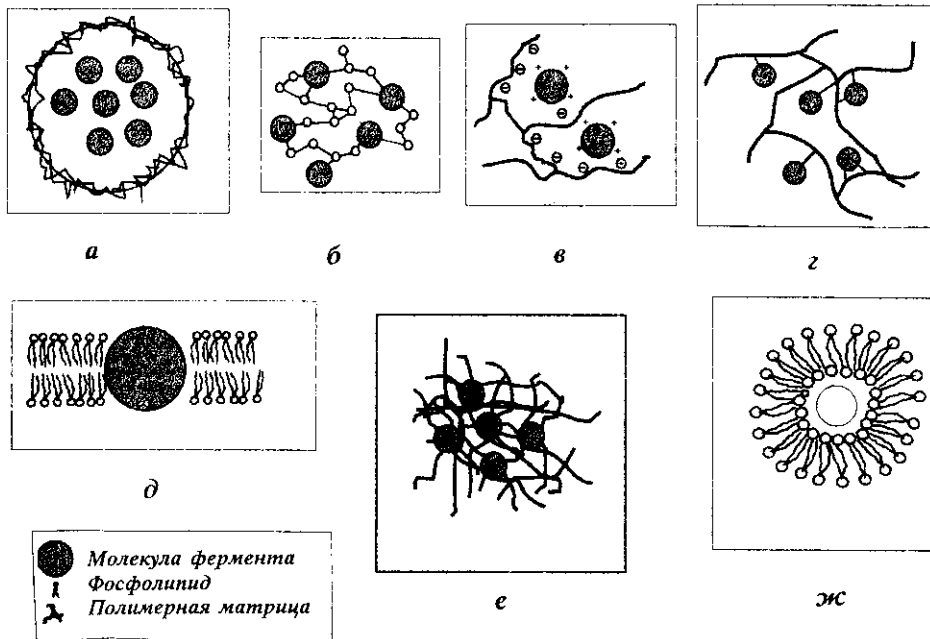


Рис. 1. Возможные способы иммобилизации фермента: *a* — инкапсуляция; *б* — сополимеризация; *в* — электростатическое связывание; *г* — ковалентное связывание; *д* — гидрофобное взаимодействие; *е* — включение в полимер и *ж* — включение в липосомы

лимеров является то, что при иммобилизации биологического объекта на электроде образуется поверхность, имеющая электрический контакт с металлическим или углеродным проводником [28]. В итоге электрический контакт между редокс-центром фермента и поверхностью электрода более тесный. Такие полимеры могут быть получены с помощью различных химических процессов, а именно — реакции Зиглер-Натта для полиацетилена [29], сопряжения органометаллических компонент (политиофен) [30], окисления мономеров [31] и других.

Для захвата оксидоредуктаз применяли редокс-полимерные гидрогели [32], основанные на связывании полиэтиленгликоля, диакрилата и винилферроцена с помощью ультрафиолетового фотoinициатора. Фермент растворяли в такой смеси непосредственно перед облучением. Также при иммобилизации биомолекул использовали латексные частички [33]. Авторами изучено формирование латексной двумерной мембраны на проводящей твердой поверхности при иммобилизации человеческого сывороточного альбумина.

Для дополнительных внешних мембран, выполняющих функции диффузионного контроля, механической защиты и уменьшения влияния интерферирующих частиц, используются различные коммерческие полимеры, а именно — поливинилхлорид, полиэтилен, полиметакрилат, нафийон и полиуретан.

*Методы иммобилизации биологического материала.* При создании амперометрических биосенсоров применяются принципы и методики иммобилизации биологического материала, общие для всех сенсоров.

На рис. 1 схематически представлены основные способы иммобилизации фермента. Прежде всего, свойства иммобилизованного фермента зависят от характера фазы, в которую он включается. Очень часто молекулу фермента ковалентно связывают с нерастворимым полимером, например, целлюлозой или полиакриламидом, который может быть в виде порошка или в форме пленки [34]. Это наиболее распространенный способ, так как, несмотря на трудоемкость, позволяет получить иммобилизованный фермент, прочно связанный с полимерным носителем. Иногда молекулы фермента соединяются ковалентными связями один с другим или с каким-либо инертным белком [35]. При этом они образуют нерастворимый, но активный комплекс. Эти методы обладают по крайней мере двумя важными достоинствами: высокая прочность образующегося конъюгата и возможность существенного изменения свойств фермента, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

Еще один способ привязки фермента к полимеру состоит в использовании электростатических или других нековалентных механизмов связывания [36]. При этом фермент необязательно должен

быть прикреплен к полимеру, он может находиться внутри него. В этом случае полимер образует вокруг фермента сеткоподобную матрицу, ячейки которой настолько малы, что достаточно крупная молекула фермента не может освободиться из сетки, но в то же время достаточно велики для проникновения внутрь низкомолекулярных субстратов.

Один из вариантов инкапсуляции включает в себя использование в качестве ферментной фазы двойного фосфолипидного слоя [37]. В этом случае фермент может как находиться в водном растворе в окружении фосфолипидов, так и быть растворенным непосредственно в гидрофобной части двойного слоя фосфолипидов. В такой системе для оптимизации загрузки фермента часто применяется послойное нанесение. Например, в работе [38] для увеличения чувствительности датчика использовали до 10 слоев, содержащих холиноксидазу, и дополнительно два слоя с холинэстеразой.

Еще один новый метод иммобилизации фермента — это его электрохимическое осаждение на поверхность электрода в присутствии полимера [39, 40]. В этом случае фермент включается в полимерную матрицу-носитель путем простого захвата во время электрополимеризации. Процесс электрохимической полимеризации технологически прост и удобен. Он позволяет выбирать и поддерживать размеры, форму и толщину мембраны, обеспечивает контроль над процессом осаждения, дает возможность изготавливать различные микробiosенсоры в одном технологическом цикле [41].

Успех иммобилизации биологического материала очень часто зависит от правильного выбора подходящего метода. Выбор этот определяется целым рядом факторов, многие из которых невозможно выявить до тех пор, пока метод не будет опробован. Первичный отбор обычно осуществляется сугубо эмпирическим путем: сначала нужно решить, необходим ли для иммобилизации фермента какой-либо специфический носитель или же применение любого материала позволит получить препарат иммобилизованного фермента с высокой активностью. Понятно, что тогда границы поиска сразу же сужаются.

Если же оказывается, что пригоден любой носитель, то при дальнейшем выборе метода необходимо выяснить, не будет ли процедура иммобилизации инактивировать фермент и сможет ли иммобилизованный фермент функционировать при тех условиях, при которых его предстоит использовать. Поэтому для успешной иммобилизации следует по возможности принять во внимание следующие факторы.

Фермент должен быть стабильным в условиях протекания реакции, которую он катализирует, и в процессе иммобилизации. Лучше всего избегать реакций, требующих, к примеру, присутствия 1 М NaOH, органических растворителей или температуры выше 50 °С.

При ковалентном связывании желательны, чтобы реагенты, образующие поперечные сшивки, взаимодействовали преимущественно с теми химическими группами, которые отсутствуют в активном центре. Если последнее условие не удастся выполнить (как это обычно и наблюдается), то поперечно сшивающий реагент должен быть как можно больших размеров, что будет препятствовать его проникновению в активный центр. Например, такой полимер, как «активированная» целлюлоза, предпочтительнее такого небольшого бифункционального реактива, как глутаровый альдегид.

Активный центр фермента по возможности необходимо защищать от влияния самого процесса иммобилизации. В частности, для сульфогидрильных ферментов этого можно добиться, если фермент предварительно обработать глутатионом или цистеином, а затем реактивировать его уже после иммобилизации. Некоторые ферменты, например папаин, можно иммобилизовать в неактивной форме. Иногда активный центр удастся заблокировать, добавляя в реакционную смесь субстрат в насыщающей фермент концентрации.

Процедура промывания для удаления «непришитого» фермента не должна оказывать негативного влияния на иммобилизованный фермент. К примеру, полимеры на основе целлюлозы обычно сильно адсорбируют ферменты, и после иммобилизации их приходится промывать растворами с высокой ионной силой. При работе с полимерными формами ферментов подобная промывка может привести к их диссоциации, поэтому в таких случаях использовать целлюлозу в качестве носителя нецелесообразно.

Необходимо учитывать механические свойства носителя, особенно его механическую прочность и физическую форму. В частности, для того, чтобы иммобилизованный фермент был в виде пленки, носитель должен быть способным ее образовывать.

Если все перечисленные и некоторые другие факторы удовлетворяют необходимым условиям, то можно предположить, что метод иммобилизации выбран удачно.

Коммерческие варианты систем на основе амперометрических биосенсоров. Основными областями практического применения таких биосенсоров являются медицинская диагностика, пищевая промышленность, биотехнологическое производ-

Таблица 1  
Анализаторы для клинических исследований на основе амперометрических биосенсоров

Компания	Страна	Модель	Определяемое вещество	Источник
Yellow Springs Instr. Ohio, OH	США	YS1 2300 Stat Plus YS1 2700	Глюкоза, лактат Этанол, холин	<a href="http://www.ysi.com">http://www.ysi.com</a>
NOVA Biomedical, Waltham, MA	США	NOVA Stat Profile	Глюкоза, лактат, мочевины	<a href="http://www.bioresearchonline.com">http://www.bioresearchonline.com</a>
PGW Medingen GmbH, Dresden	Германия	ESAT 6660 ECA 2000	Глюкоза, лактат Глюкоза, лактат	<a href="http://www.pd-gruppe.de">http://www.pd-gruppe.de</a>
Eppendorf AG, Hamburg	Германия	EBIO Plus EBIO Compact	Глюкоза, лактат Глюкоза, лактат	<a href="http://www.eppendorf.com">http://www.eppendorf.com</a>
EKF Diagnostic GmbH, Magdeburg	Германия	BIOSEN 5030 BIOSEN 5040	Глюкоза, лактат Глюкоза, лактат	<a href="http://www.ekf.ru">http://www.ekf.ru</a>
Analox Instruments Ltd, London	Англия	GM7 MicroStat GM9	Глюкоза, лактат, этанол Глюкоза	<a href="http://www.analox.com">http://www.analox.com</a>
Dr. Muller Geratebau GmbH, Freital	Германия	Super G	Глюкоза	[42]
Biometra, Gottingene	Германия	OLGA	Глюкоза, лактат	[42]
Gonotec, Berlin	Германия	SENSOMAT	Этанол	[43]
Fresenius AG, Hamburg	Германия	Ionometer	Глюкоза	[43]
Fuji Electric Corp., Osaka	Япония	GLUCO 20, UA-300 A	Глюкоза, мочевины, кислота	[43]
Kyoto Daiichi Kodaku Co. Ltd, Kyoto	Япония	GT 1630, LT 1710	Глюкоза, лактат	<a href="http://www.medizin.li/laktat/lactat.htm">http://www.medizin.li/laktat/lactat.htm</a>
Завод точной механики, Паневежис	Литва	ЭКРАН	Глюкоза, лактат, мочевины	[44]
Seres, Aix-en-Provence	Франция	ENZYMAT	Глюкоза, лизин, холин	[42]
Solea-Tacussel, Villeurbanne	Франция	Glucoprocasseur	Глюкоза, лактат	[43]
SGI, Toulouse	Франция	MICROZYM-L	Лактат, глюкоза	[43]
Roche, Basel	Швейцария	LA 640	Лактат	<a href="http://www.medizin.li/laktat/lactat.htm">http://www.medizin.li/laktat/lactat.htm</a>

во и экологический мониторинг. Медицинская диагностика не зря находится на первом месте в данном списке, потому что более 80 % всех коммерциализированных приборов приходится именно на данную область. Здесь также существует некое разделение: автоанализаторы для клиник и лабораторий, портативные приборы для домашнего использования и системы для *in vivo* измерений в клинических условиях.

*Анализаторы для клинической диагностики.* При создании анализаторов для клинической диагностики необходимо было учитывать следующие требования: прежде всего, это высокие аналитические характеристики приборов, а именно — точность, надежность, воспроизводимость данных;

простота в использовании; дешевизна и доступность используемых реагентов; достаточно быстрое время анализа.

В табл. 1 приведены варианты анализаторов на основе амперометрических биосенсоров, производимые различными фирмами в разное время, начиная с первого коммерческого анализатора для определения глюкозы фирмы Yellow Springs Instr., который был анонсирован в 1975 году (YSI Incorporated (<http://www.ysi.com>)).

В настоящее время YSI Incorporated выпускает анализатор YSI 2300 StatPlus, определяющий глюкозу в цельной крови, сыворотке и плазме, а также лактат в цереброспинальной жидкости (рис. 2). Для анализа необходимо 25 мкл образца, результат

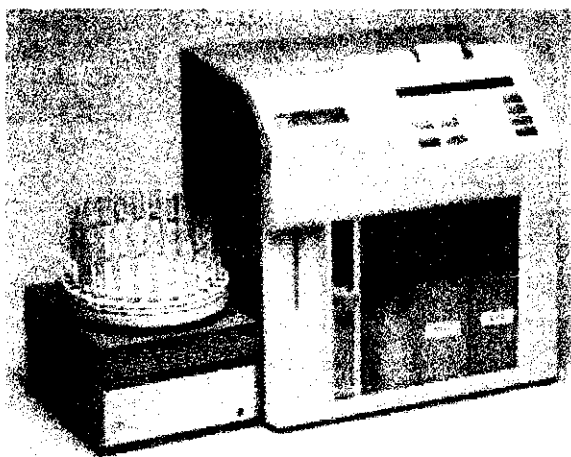


Рис. 2. Внешний вид анализатора YSI 2300 StatPlus (YSI Incorporated) (YSI Incorporated (<http://www.yisi.com>))

выводится на экран в течение минуты, интервал между измерениями около 2 мин. Фермент (глюкозооксидаза или лактатоксидаза) иммобилизуется между двумя мембранами: поликарбонатной и ацетатцеллюлозной. Первая ограничивает диффузию субстрата в ферментный слой, вторая — предотвращает интерференцию с другими электрохимически активными компонентами. Время работы мембран составляет 21 день для глюкозной и 14 дней для лактатной.

Как видно из данных табл. 1, наибольшее количество анализаторов создано для определения глюкозы. Преимущество такого рода анализаторов состоит в возможности работать с неразбавленными образцами, так как при вводе образца в ячейку происходит автоматическое внутреннее разбавление образца, что позволяет определять достаточно высокие концентрации глюкозы в пробе. Кроме этого, измерения можно проводить по мере необходимости, используя системы погружного типа. Поскольку с самого начала такие анализаторы (например, YSI, ECA, Glucoprocasseur) показали хорошие рабочие характеристики при определении глюкозы, на их основе созданы модифицированные системы для определения других веществ, а именно — сахаридов, лактата, этанола, мочевой кислоты. Они наиболее подходят для нужд небольших лабораторий. Используя объем пробы порядка 50 мкл и погрешность определения не более 2 %, эти анализаторы давали возможность проводить порядка 40 анализов в час.

Увеличение частоты измерений до 180 в час привело к расширению возможностей аналитиче-

ских систем за счет внедрения в них элементов проточного анализа. Подобного рода анализаторы (ESAT, EBIO, BIOSEN, ЭКСАН) стали выпускать в середине 80-х гг. для определения глюкозы и лактата и применять, как правило, в больших медицинских лабораториях. В таких анализаторах использовали проточную систему предварительного разведения образца.

Все приведенные в табл. 1 анализаторы обладают сходными характеристиками, так как в большинстве своем основаны на подобной технике и принципах. На сегодняшний день это самые простые в использовании и дешевые лабораторные аналитические методы анализа. Все результаты измерений хранятся в памяти анализатора, могут быть распечатаны и отправлены на внешнюю лабораторную базу данных. Большинство параметров анализатора обычно может быть программно изменено, к примеру, это границы патологических значений (для автоматического повторного измерения), протоколы, язык общения с оператором и другие. Анализаторы позволяют вести повторные динамические наблюдения (в частности, «сахарный профиль»), а также они незаменимы при экспресс-диагностике в реанимационных отделениях.

*Портативные анализаторы для использования в домашних условиях.* При создании анализаторов для диагностики в домашних условиях необходимо было учесть следующие требования: короткое время анализа; размеры прибора; простота в использовании; дешевизна как самого прибора, так и его чувствительного элемента; аналитические характеристики, позволяющие получить достоверные результаты.

Для уменьшения времени анализа нужно было, прежде всего, перейти к работе с цельной неразбавленной кровью, тем самым убрав любые преданалитические процедуры. Впервые подобного рода датчики разработали и внедрили в практику на фирме Genetic International в Англии (затем переименованной в MediSense, сейчас входящей в состав Abbott Laboratories). Сенсор состоял из одноразовой электродной полоски с иммобилизованной глюкозооксидазой, модифицированной ферроценем. Для проведения анализа каплю крови, предварительно взятую из пальца, наносили на рабочую область сенсора, который затем вставляли в небольшой прибор (рис. 3). Время анализа составляло 30 с, что было быстрее, чем с помощью фотометрических полосок. Погрешность измерений составляла порядка 4 % (Abbott Laboratories (<http://www.abbottdiagnostics.com>)), что также значительно меньше, чем погрешность измерений бу- мажными тест-полосками.





Рис. 3. Внешний вид анализатора MediSense Precision (Abbott Laboratories) (Abbott Laboratories (<http://www.abbottdiagnostics.com>))

Glucometer Elite, производимый фирмой Bayer Diagnostics для анализа глюкозы, основан на электрохимическом определении растворимого медиатора феррицианида и использует при работе принцип «капиллярного заполнения» сенсора образцом крови. Однако в этих приборах часто происходит спонтанная реакция феррицианида с interfering веществами, в частности, с аскорбиновой и мочевой кислотами, что влияет на величину отклика, соответствующего содержанию глюкозы. К тому же у него достаточно высокая стоимость одного измерения (Bayer Corporation (<http://www.glucometer.com>)).

i-STAT Co. выпускает портативный прибор для анализа глюкозы, мочевины и различных ионов, состоящий из сменного картриджа и анализатора (i-STAT Corporation (<http://www.i-stat.com>)). Картридж представляет собой яркую демонстрацию новейших достижений микросистемных технологий и комбинирует компоненты микроэлектронной кремниевой, микропроточной, биосенсорной и пленочной технологий [45]. Интеграция полупроводниковой технологии с электрохимическими и биохимическими принципами нашла свое отражение в создании микросенсорного массива с высокими аналитическими характеристиками. Этот сенсорный массив, являющийся основной частью картриджа, представляет собой набор тонкопленочных металлических электродов и в зависимости от определяемого вещества может работать в режиме амперометрического, потенциометрического или кондуктометрического измерений.

Для анализа каплю крови помещают в спе-

циальный отдел картриджа. Внутри картриджа в резервуаре из фольги находится калибровочный раствор с известной концентрацией необходимого субстрата. Сначала идет тестовый этап, при котором калибровочный раствор проходит через сенсорный массив для установочного измерения. После этого использованный раствор выводится в небольшой резервуар для отходов внутри картриджа с помощью воздушного пузыря, который также находится внутри. Затем на сенсорный массив поступает образец крови, который после измерения также выводится в резервуар для отходов. Система i-STAT начинает анализ в тот момент, когда картридж вставляется в портативный анализатор или модуль анализа крови в системе мониторинга пациентов Omnicare фирмы Hewlett Packard (Palo Alto, CA, США). Результаты выводятся на экран в течении 2 мин, погрешность определения — 1—3 %.

В табл. 2 приведены различные варианты портативных анализаторов на основе амперометрических биосенсоров.

Дизайн портативных анализаторов существенно отличается от такового анализаторов для клинической диагностики, хотя некоторые из них также применяются в клинических условиях или, как в случае i-STAT, являются составной частью большой системы клинического мониторинга. При этом используется картридж i-STAT EC8+, определяющий одновременно 13 параметров крови (i-Stat Corporation (<http://www.i-stat.com>)).

Последние исследования в области разработки и создания портативных анализаторов для широкого применения направлены на создание приборов «безболезненного анализа», в которых образец крови берется не из пальца, а из менее болезненной части тела (к примеру, предплечье или бедро). Первые успешные варианты выпущены фирмой Amira Medical (Scotts Valley, CA, США). Их система AtLast прошла маркетинговую апробацию в конце 1998 г. через 510(k) процесс, который в настоящее время является обязательным в США при внедрении в сфере здравоохранения, и представляла собой комбинацию прибора для взятия пробы с глюкозным анализатором (Amira Medical (<http://www.amiramed.com>)). AtLast делает маленький надрез на коже, используя микроскальпель, соединенный со специальным механизмом взятия пробы. Для анализа необходимо всего 2 мкл крови, которая по капилляру поступает на датчик. Система может адаптироваться к различным типам кожи. AtLast получила очень высокие оценки специалистов и потребителей и была награждена в 2000 г. Medical Design Excellence Award. В ноябре

Таблица 2  
Портативные анализаторы для диагностики в домашних условиях

Компания	Страна	Модель	Определяемое вещество	Источник
Abbott Laboratories, Illinois, IL	США	MediSense ExaTTech MediSense Precision	Глюкоза Глюкоза	<a href="http://www.abbottdiagnostics.com">http://www.abbottdiagnostics.com</a>
Bayer Corporation, Leverkusen	Германия	Glucometer Elite	Глюкоза	<a href="http://www.glucometer.com">http://www.glucometer.com</a>
i-STAT Corporation, Princeton, NJ	США	i-STAT G3+	Глюкоза, кислород	<a href="http://www.i-stat.com">http://www.i-stat.com</a>
Roche Diagnostics, Basel	Швейцария	Advantage Meter	Глюкоза	<a href="http://www.extracare.co.nz">http://www.extracare.co.nz</a>
Johnson & Johnson, Brunswick, NJ	США	LifeScan OneTouch	Глюкоза	<a href="http://www.lifescan.com">http://www.lifescan.com</a>
Home Diagnostics Inc., Fort Lauderdale, FL	США	Prestige IQ	Глюкоза	<a href="http://www.homediagnosticsinc.com">http://www.homediagnosticsinc.com</a>
MedTest Systems, College Park, MD	США	Medisensor 2001	Глюкоза, мочевая кислота	[42]
Inverness Medical Technology Inc., Inverness	Шотландия	Excel G	Глюкоза	<a href="http://www.invernessmedical.com">http://www.invernessmedical.com</a>

2001 г. фирма Roche Diagnostics объявила о приобретении Amira Medical, прекращении с 14 декабря 2001 г. производства AtLast и выпуске на рынок своего продукта под торговой маркой Accu-Check, который совместил в себе «know-how» Amira Medical и анализаторы фирмы Roche (Accu-Chek from Roche (<http://accu-check.com>)).

Следующей компанией, которой удалось пройти апробацию и в ноябре 2000 г. получить 510(k) допуск, была Abbott Laboratories с ее продуктом под торговой маркой Sof-Tac (Abbott Laboratories (<http://www.abbottdiagnostics.com>)). Принцип его работы подобен системе AtLast. Sof-Tac достаточно прост в использовании, величиной с плеер и, по утверждению производителей, применение его совершенно безболезненно для пациента. Так же, как и в случае AtLast, данные могут храниться в памяти анализатора и загружаться из него в компьютер.

Компания Johnson and Johnson также получила в 2000 г. 510(k) допуск для своего продукта One Touch Ultra серии LifeScan, который был выпущен на рынок в феврале 2001 г. (LifeScan from Johnson and Johnson (<http://www.lifescan.com>)). Для анализа с помощью их датчика необходимо всего лишь 1 мкл крови из плеча, принцип работы тот же. При клинической апробации 78 % пациентов подтвердили, что такой тест либо вообще безболезненный, либо значительно менее болезненный, чем тест при пробе крови из пальца. Так же, как все описанные выше портативные системы, этот анализатор значительно удобнее при персональном мониторинге диабета у населения.

*Системы для постоянного in vivo мониторинга в клинических условиях.* При создании анализаторов для in vivo измерений в клинических условиях необходимо было учесть следующие требования: возможность автоматических измерений каждые несколько минут; высокие аналитические характеристики приборов, а именно — точность, надежность, воспроизводимость данных; совместимость с человеческим организмом; быстрое время анализа; высокая операционная стабильность.

Над разработкой подобного рода систем работало несколько исследовательских групп и фирм. В работе [46] описана модифицированная двухэлектродная система с сенсором иглообразной формы для подкожной имплантации собакам. Система базировалась на электроде Кларка и требовала не менее 30 мин для установления базового значения.

В работе [47] предложено применить два трехэлектродных датчика для определения поглощения кислорода в процессе окисления глюкозы. Авторы также использовали каталазу для увеличения срока жизни сенсоров. Имплантированные в организм различных собак сенсоры показывали хорошую чувствительность и время жизни около 15 недель.

Куделка и др. [48] имплантировали подкожно крысам более 22 тонкопленочных металлических глюкозных электродов, после 90 мин стабилизации 30 % сенсоров оставались в рабочем состоянии после 8 дней работы. Первыми попытку коммерциализировать подобного рода систему предприняли на фирме Miles Laboratories (Elkhart, IN, США) (Turner A. P. F. Biosensors: past, present and future (<http://www.cranfield.ac.uk/biotech/chinap.htm>)).

Таблица 3  
Анализаторы для контроля процесса производства и качества продуктов

Компания	Страна	Модель	Определяемое вещество	Источник
Yellow Springs Instr., Ohio, OH	США	YSI 2700	Глюкоза, лактоза, этанол, цукроза	<a href="http://www.ySI.com">http://www.ySI.com</a>
Analox Instruments Ltd, London	Англия	GM6	Глюкоза, лактат, этанол, глицерин	<a href="http://www.analox.com">http://www.analox.com</a>
Biometra, Gottingene	Германия	OLGA	Глюкоза, этанол, [50]	
Seres, Aix-en-Provence	Франция	ENZYMAT	Глюкоза, лактат	[43]
Solea-Tacussel, Villeurbanne	Франция	Glucoprocasseur	Глюкоза, лактат	[50]
Oriental Electric Co., Ltd	Япония	Freshness Meter	Свежесть рыбы	[51]
Toyo Jozo Co.	Япония	Biosensor	Холестерол, фосфолипиды	[52]

Система нуждалась во внешней циркуляции крови с помощью двух внутривенных катетеров с ферментным сенсором и системе ввода инсулина, контролируемой с помощью компьютера. Однако большой размер и необходимость в большом количестве крови ограничили использование этой системы только для исследовательских целей.

Фирма MiniMed (Norrrthridge, CA, США), в настоящее время находящаяся в стадии приобретения компанией Medtronic (Minneapolis, США), была первой, которой удалось коммерциализировать реальную систему для постоянного *in vivo* мониторинга при использовании в клинических условиях (Medtronic MiniMed (<http://www.minimed.com>)). Она была предоставлена для продажи в августе 2000 г. Следующей компанией, пытавшейся внедрить подобную технику, является Cygnus Inc. (Redwood City, CA, США), которая анонсировала свой продукт в марте 2001 г.

Система для постоянного мониторинга глюкозы (Continuous Glucose Monitoring System — CGMS) фирмы MiniMed, анонсированная в июне 1999 г., сейчас используется только в профессиональных клинических условиях и позволяет измерять содержание глюкозы каждые 5 мин в течение 72 ч имплантации. Сенсором является крошечный электрод, находящийся внутри маленькой иголки, с помощью которой он вводится под кожу. После удаления иголки сенсор прикрепляется к маленькому пластиковому диску размером с небольшую монетку, который удерживает его в жестком положении, и соединяется с помощью тонкого кабеля с монитором в форме пейджера (рис. 4). После трех дней работы пациент возвращается к врачу, где данные можно загрузить в компьютер. Эта система требует начального калибровочного измерения с помощью стандартного анализатора и крови из

пальца, а также четыре промежуточные подкалибровки каждые сутки. CGMS-система была протестирована на пациентах, больных сахарным диабетом, и продемонстрировала высокую корреляцию со значениями, полученными с помощью портативного анализатора.

Medtronic MiniMed предполагает выпустить потребительскую версию такого прибора в 2002 г., которая будет нуждаться в меньшем количестве промежуточных подкалибровок, а также не только показывать уровень глюкозы, но и обеспечивать анализ гипо- и гипергликемии.

Кроме этого, MiniMed и фирма Medical Research Group Inc. (присоединенная к ней в качестве филиала и также приобретаемая компанией Medtronic) в настоящее время совместно начинают клиническую апробацию комплекса для постоянного мониторинга глюкозы (CGMS) с имплантированной системой ввода инсулина (Implantable Insulin Pump System Medtronic MiniMed 2007), который может послужить платформой для создания имплантированной искусственной поджелудочной железы. Вариант такой системы был имплантирован нескольким пациентам-добровольцам, и компания Medtronic уже заявила о полученных высоких результатах. Кроме этого, алгоритм автоматического контроля системы уже введен нескольким собакам с подобной имплантированной системой и продемонстрирован практически постоянный нормальный уровень глюкозы. Компания надеется завершить полную клиническую апробацию такой системы к концу 2003 г.

Перспективы применения подобного рода техники очень высокие, однако существует ряд преград, сдерживающих ее быстрое успешное развитие. Прежде всего, не все пациенты согласны на введение в организм подобных *in vivo* систем.

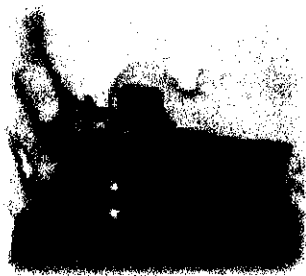


Рис. 4. Внешний вид системы для постоянного мониторинга глюкозы CGMS компании Medtronic MiniMed (Metronic Minimed (<http://www.minimed.com>))

Кроме этого, не все врачи еще полностью доверяют таким новейшим системам и предпочитают пользоваться традиционными подходами.

Анализаторы для пищевой промышленности, биотехнологического производства и экологического мониторинга. Пищевая промышленность и биотехнологическое производство — это области, в которых в последние несколько лет началось внедрение биосенсоров, хотя, конечно же, не так интенсивно, как в медицинской диагностике. Прежде всего, для контроля процесса производства адаптируются известные коммерческие системы, используемые в медицинской диагностике, но, кроме этого, также специально разрабатываются новые. Существуют два основных варианта (кроме «*off line*»-анализа) использования биосенсоров для контроля процесса производства: «*in situ*» и «*on line*». При непосредственном использовании датчиков внутри биореакторов («*in situ*») необходимо учесть следующие факторы: сенсор должен оставаться работоспособным даже после стерилизации; концентрации, которые необходимо определять в биореакторах, часто превышают диапазон работы сенсора; присутствие в биореакторе в большой концентрации множества интерферирующих частиц; высокая температура внутри биореактора, которая может привести к инактивации биологического материала сенсора.

Такие условия не позволили пока разработать успешный коммерческий вариант сенсора для непосредственного использования внутри биореактора. В литературе описан ферментный электрод для «*in situ*»-анализа глюкозы во время процесса ферментации теста [49]. Анализатор состоял из двух частей. Внутренняя часть содержала ферментный датчик, состоящий из четырех рабочих электродов, модифицированных 1,1-диметилферроценом, на

три из которых была иммобилизована глюкозооксидаза. Стерильность достигалась внешней поликарбонатной мембраной с размером пор 0,015 мкм на электродах и металлической мембраной с размером пор 2 мкм, закрытыми неким внешним кожухом. Сенсор мог калиброваться «*in situ*» потоком калибровочного раствора между кожухом и ферментными электродами и показывал операционную стабильность на протяжении 4 дней, в течение которых его чувствительность упала всего на 15 %.

В основном все применяемые в настоящее время системы работают в так называемом квазинепрерывном режиме анализа. В этом случае анализатор состыковывается с системой отбора проб, пробу периодически извлекают из биореактора и анализируют.

В табл. 3 приведены некоторые коммерческие варианты анализаторов для использования в пищевой промышленности и биотехнологии.

В области мониторинга окружающей среды, прежде всего, используют микробиальные амперометрические сенсоры [53], в частности, при анализе сточных вод определяют биохимически окисляемые компоненты (БОК). Однако для такой оценки необходимо время порядка 5 дней, поэтому датчики невозможно применять для постоянного контроля. Сенсоры для экспресс-определения БОК разработаны на основе иммобилизованных клеток *Bacillus subtilis* и *Trichosporon cutaneum* [54]. В работе [55] описывается датчик для определения бактериального состава растворов. Прибор основан на способности медиаторов (к примеру, *p*-бензохинона) «отнимать» электроны из дыхательного цикла микроорганизмов. Переокисление медиатора на электроде является прямым индикатором активности бактерий в растворе. Данный прибор был коммерциализирован фирмой Biosensori Iritech S.p.a (Италия) и получил название Midas Pro (Biosensori Iritech (<http://www.mclink.it/com/iritech/ebiosens.htm>)).

Что касается ферментных амперометрических биосенсоров для экологического мониторинга, то это в основном датчики на основе ингибирования холинэстераз [56, 57], однако успешных коммерческих вариантов таких приборов в настоящее время пока не существует.

Выводы. Таким образом, в представленном обзоре рассмотрены вопросы, связанные с современными микроэлектронными микросистемными технологиями, которые включают в себя, прежде всего, изготовление преобразователей и методы иммобилизации биологического материала. Кроме этого, приведены примеры современных коммерческих анализаторов на основе амперометрических

биосенсоров, используемых в медицинской диагностике, пищевой промышленности, биотехнологическом производстве и экологическом мониторинге.

Перспективы использования подобных систем очень высоки. На сегодняшний день — это самые простые в использовании и дешевые аналитические методы анализа. Они обеспечивают высокоселективный и чувствительный анализ не только в стационарных, но и в полевых условиях. Использование последних достижений микроэлектроники и новейших технологических материалов позволяет значительно удешевить производство и обеспечить совместимость разных элементов аналитических систем. Кроме того, почти все анализаторы совместимы с компьютерной обработкой сигналов или автоматизированным контролем процессов, а последние модели имеют прямой доступ к Интернету для непосредственной связи с различными базами данных, что является образцом приборов XXI века.

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

S. V. Dzyadevych

Amperometric biosensors. Modern technologies and commercial variants

#### Summary

*The advantages of modern microsystem technologies as applied to the production of amperometric biosensors (including manufacture of transducers, immobilization of biological material, combining different procedures in one technological cycle) are analyzed. The modern commercial systems based on amperometric biosensors and the fields of their application are described.*

C. В. Дзядевич

Амперометричні біосенсори. Сучасні технології та комерційні варіанти аналізаторів

#### Резюме

*Проаналізовано можливості сучасних мікросистемних технологій, які включають у себе виробництво амперометричних біосенсорів (виготовлення перетворювачів, методи іммобілізації біологічного матеріалу, суміщення різних технологічних процесів в одному виробничому циклі). Описано сучасні комерційні системи на базі амперометричних біосенсорів та галузі їхнього застосування.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций // Биополімери і клітина.—2002.—18, № 1.—С. 13—25.
2. Fluitman J. Microsystems technology: objectives // Sensors and Actuators A.—1996.—56—P. 151—166.
3. Zinner H. Microsystems — the European approach // Sensors and Actuators A.—1995.—46/47.—P. 1—7.
4. Abraham M., Ehrfeld W., Hessel V., Kamper K. P., Lacher M., Picard A. Microsystem technology: between research and industrial application // Microelectronic Eng.—1998.—41/42.—P. 47—52.
5. Schultze J. W., Tsakova V. Electrochemical microsystem technologies: from fundamental research to technical systems // Electrochim. acta.—1999.—44.—P. 3605—3627.
6. Rapp R., Hoffmann W., Sub W., Ache H. J., Golz H. Performance of an electrochemical microanalysis system // Electrochim. acta.—1997.—42.—P. 3391—3398.
7. Weber S. G. Signal-to-noise in microelectrode-array-based electrochemical detectors // Anal. Chem.—1989.—61.—P. 295—302.
8. Cespedes F., Alegret S. New materials for electrochemical sensing: glucose biosensors based on rigid carbon-polymer biocomposites // Food Technol. Biotechnol.—1996.—34.—P. 143—146.
9. Atanasov P., Gamburzev S., Wilkins E. Needle-type glucose biosensors based on a pyrolysed cobalt-tetramethoxy-phenylporphyrin catalytic electrode // Electroanalysis.—1996.—8.—P. 158—164.
10. Khan G. F., Wernet W. Platinization of shapable electroconductive polymer film for improved glucose sensor // J. Electrochem. Soc.—1996.—143.—P. 3336—3342.
11. Kroger S., Turner A. P. F. Solvent-resistant carbon electrodes screen printed onto plastic for use in biosensors // Anal. chim. acta.—1997.—347.—P. 9—18.
12. Silbert A., Bisenberger M., Brauchle C., Hampp N. Thick-film multichannel biosensors for simultaneous amperometric and potentiometric measurements // Sensors and Actuators B.—1996.—30.—P. 127—132.
13. Khan G. F. Organic charge transfer complex based printable biosensor // Biosensors and Bioelectronics.—1996.—11.—P. 1221—1227.
14. Albareda-Sirvent M., Merkoci A., Alegret S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review // Sensors and Actuators B.—2000.—69.—P. 153—163.
15. Lorenzo E., Pariente F., Hernandez L., Tobalina F., Darder M., Wu Q., Maskus M., Abruna H. D. Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes // Biosensors and Bioelectronics.—1998.—13.—P. 319—332.
16. Silber A., Hampp N., Schuhmann W. Poly(methylene blue)-modified thick-film gold electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH and their application in glucose biosensors // Biosensors and Bioelectronics.—1996.—11.—P. 215—223.
17. Madaras M. B., Buck R. P. Miniatures biosensors employing electropolymerised permselective films and their use for creatinine assays in human serum // Anal. Chem.—1996.—68.—P. 3832—3839.
18. Sirkar K., Pishko M. V. Amperometric biosensors based on oxidoreductases immobilised in photopolymerised poly(ethylene glycol) redox polymer hydrogels // Anal. Chem.—1998.—70.—P. 2888—2894.
19. Muguruma H. K., Karube I. Plasma-polymerised films for biosensors // Trends Anal. Chem.—1999.—18.—P. 62—68.
20. Wohltjen H. Chemical microsensors and microinstrumentation // Anal. Chem.—1984.—56, N 1.—P. 87A—103A.
21. Vidal J. C., Garcia E., Mendez S., Yarnoz P., Castillo J. R. Three approaches to the development of selective bilayer amperometric biosensors for glucose by *in situ* electropolymerization // Analyst.—1999.—124.—P. 319—324.
22. Kranz C., Wohlschlager H., Schmidt H. L., Schuhmann W. Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensors based on conducting polymer multilayers // Electroanalysis.—1998.—10.—P. 546—552.
23. Lotzbeyer T., Schuhmann W., Schmidt H. L. Electron transfer

- principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface // *Sensors and Actuators B*.—1996.—33.—P. 50—54.
24. Yamato H., Koshiba T., Ohwa M., Wemet W., Matsumura M. A new method for dispersing palladium microparticles in conducting polymer films and its application to biosensors // *Synth. Met.*—1997.—87.—P. 231—236.
  25. Elrhazi M., Deslouis C., Nigretto J. M., Frouji A. Electrochemical behaviour of carbon paste electrode modified by fibrinogen for biosensor. An impedance study // *Quim. Anal.*—1997.—16.—P. 49—53.
  26. *Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology* / Ed. M. D. Trevan—New York: John Wiley and Sons, 1980.
  27. Guilbalt G. G., Kramer D. N. Fluorometric system employing immobilized cholinesterase for assaying anticholinesterase compounds // *Anal. Chem.*—1965.—37.—P. 1675—1680.
  28. Bartlett P. N., Cooper J. M. A review of the immobilisation of enzymes in electropolymerized films // *J. Electroanal. Chem.*—1993.—362.—P. 1—12.
  29. Naarmann H., Theophilou N. New process for the production of metal-like, stable polyacetylene // *Synth. Met.*—1987.—22.—P. 1—8.
  30. Kobayashi M., Chen J., Chung T. C., Moraes F., Heeger A. J., Wudl F. Synthesis and properties of chemically coupled poly(thiophene) // *Synth. Met.*—1984.—9.—P. 77—86.
  31. Ratcliffe N. M. Polypyrrole-based sensor for hydrazine and ammonia // *Anal. chim. acta.*—1990.—239.—P. 257—262.
  32. Sirkar K. K., Lloyd D. R. New membrane materials and processes for separation // *AIChE Symp. Series.*—New York: Amer. Inst. Chem. Eng., 1988.—Vol. 84, N 261.—177 p.
  33. Słomkowski S., Kowalczyk M., Trznadel M., Kryszewski M. Two-dimensional latex assemblies for biosensors // *ACS Symp. Ser.*—1996.—627.—P. 172—186.
  34. 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.
  35. Grisel A. Microelectronic devices // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment* / Ed. E. Kress-Rogers.—New York: CRC press, 1997.—P. 137—147.
  36. Scouten W. H., Luong J. H., Brown R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design // *Trends Biotech.*—1995.—13.—P. 178—185.
  37. Hianik T., Snejdarkova M., Cervenanska Z., Miernik A., Krawczyk T. K. V. Electrochemical biosensors with supporte bilayer lipid membranes based on avidin-biotin interaction // *Chem. Analyt.*—1997.—42.—P. 901—906.
  38. Chen Q., Kobayashi Y., Takeshita H., Hoshi T., Anzai J. Avidin-biotin system-based enzyme multilayer membranes for biosensor applications: optimisation of loading of choline esterase and choline oxidase in the bienzyme membrane for acetylcholine biosensors // *Electroanalysis.*—1998.—10.—P. 94—97.
  39. Yon Hin B. F. Y., Lowe C. R. Amperometric response of polypyrrole entrapped bienzyme films // *Sensors and Actuators B*.—1992.—7.—P. 339—342.
  40. Cooper J. C., Hall E. A. H. Electrochemical response of an enzyme-loaded polyaniline film // *Biosensors and Bioelectronics.*—1992.—7.—P. 473—485.
  41. 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.
  42. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D. Biosensori elettrochimici in Biomedicina // *Caleidoscopio Italiano.*—Genova: MedicalSystems S.p.A., 1997.—N 112.—P. 6.
  43. Scheller F. W., Pfeiffer D. Commercial devices based on amperometric biosensors // *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment* / Ed. E. Kress-Rogers.—New York: CRC press, 1997.—P. 245—256.
  44. ЭКСАИ-Г. Инструкция по применению и эксплуатации.—Паневежис, 1990.
  45. Lauks J. R. Microfabricated biosensors and microanalytical systems for blood analysis // *Acc. Chem. Res.*—1998.—31.—P. 317—324.
  46. Pat. German 43 352413. Verfahren zur kontinuierlichen Analyse von Bestandteilen einer Flüssigkeit / A. Schwock, P. Abel // *Publ.* 1991.
  47. Armour J. C., Lucisano J. Y., McKean B. D., Gough D. A. Application of chronic intravascular blood glucose in dogs // *Diabetes.*—1990.—39.—P. 1519—1523.
  48. Koudelka M., Rohner-Jeanrenaud F., Terretaz J., Bobbioni-Harsch E., de Rooij N.F., Jeanrenaud B. *In vivo* behaviour of hypodermically implanted microfabricated glucose sensors // *Biosensors and Bioelectronics.*—1991.—6.—P. 31.
  49. Bradley J., Schmid R. D. Optimisation of a biosensor for *in situ* fermentation monitoring of glucose concentration // *Biosensors and Bioelectronics.*—1991.—6.—P. 669.
  50. Luong J. H. T., Bouvrette P., Male K. B. Developments and applications of biosensors in food analysis // *Tibtech.*—1997.—15.—P. 369—377.
  51. Freshness Meter from oriental electric Co. Ltd // *Chemical Sensors.*—1992.—8, N 1.—P. 18.
  52. Nagai R., Yaoita M., Yoshida Y., Ikariyama Y., Yamauchi S. High-performance biosensor for cholesterol // *Proc. of 9<sup>th</sup> Chem. Sensor Symp.*—Aoyama: Gakuin Univ. press, 1989.—P. 17—20.
  53. Hikuma M., Yasuda T. Microbial sensors for estimation of biochemical oxygen demand and determination of glutamate // *Methods Mosbach Enzymol.*—San Diego: Acad. press, 1998.—Vol. 137, pt D.—P. 124.
  54. Riedel K., Neumann B., Scheller F. W. Mikrobielle Sensoren auf basis von respirations-messungen // *Chem. Ing. Tech.*—1992.—64.—P. 518.
  55. 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.
  56. Skladal P., Mascini M. Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanine-modified electrodes and immobilized cholinesterases // *Biosensors and Bioelectronics.*—1992.—7.—P. 335—344
  57. Gogol E. V., Evtugyn G. A., Marty J.-L., Budnikov H. C., Winter V. G. Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors // *Talanta.*—2000.—53.—P. 379—389.

УДК 577.15.573.6

Надійшла до редакції 26.10.2000