

УДК 543.253.577.087.4 : 546/7

© 1991 г.

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ДАТЧИКИ НА ОСНОВЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ***Будников Г. Б., Медянцева Э. П., Бабкина С. С.*

Изложены и обобщены состояние, проблемы и перспективы развития одного из новых направлений аналитической химии — «безреагентных» методов анализа на примере амперометрических датчиков (сенсоров) на основе ферментов. Рассмотрены вопросы, связанные с устройством биосенсоров, особенностями их функционирования в различных условиях. Отмечены прикладные аспекты применения ферментных электродов этого типа в различных областях науки и народного хозяйства. Библиография — 134 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	881
II. Амперометрические датчики на основе различных ферментных систем	883
III. Проточные анализаторы на основе иммобилизованных ферментов	900
IV. Амперометрические датчики в иммуноферментном анализе	903

I. ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач аналитической химии является создание чувствительных и селективных методов, позволяющих анализировать биологические объекты. В связи с проблемами экологии эта задача становится еще более актуальной. Заманчивым и перспективным оказалось использование для этих целей свойств ферментов — препаратов или содержащих их биоматериалов, которые могут быть названы аналитическими реагентами нового поколения.

Ферменты как биологические катализаторы обладают очень высокой специфичностью действия и большой каталитической активностью. Эти факторы в сочетании с мягкими условиями проведения ферментативных реакций, возможностью регистрации полезного сигнала, а также успехи, достигнутые в области создания стабилизированных ферментных препаратов, посредством иммобилизации [1—6], обеспечили развитие нового направления в аналитической химии — «безреагентных» методов анализа, основанных на применении биохимических сенсоров (биосенсоров) [7].

Биохимический сенсор состоит обычно из какого-либо физико-химического детектора-датчика (электрохимического, твердотельного, оптического, энталпиметрического и т. д.) и слоя иммобилизованного фермента, закрепленного на его поверхности или около него. Многие биосенсоры содержат полупроницаемую мембрану [7—9]. Принцип их действия основан на диффузии субстрата в тонкий слой биокатализатора, в котором протекает ферментативная реакция, и на определении какого-либо компонента ферментативной реакции (продукта или субстрата) тем или иным датчиком. Если используются электрохимические датчики (ион-, газо- и молекулярно-селективные электроды и др.), то в зависимости от того, что является измеряемой величиной ток или потенциал, данные биосенсоры (первоначальное название «ферментные электроды») подразделяются на

потенциометрические и амперометрические [10]. Потенциометрические биосенсоры обладают линейной зависимостью потенциала от логарифма концентрации определяемого вещества, а в амперометрических — аналитическим сигналом является ток электрохимической реакции, зависящий от концентрации определяемого соединения [10, 11]. Различия наблюдаются в диапазоне определяемых концентраций компонентов и во времени отклика.

Со времени первого упоминания в 1967 г. Хиксом и Апдайком [12] о ферментных электродах интерес к этой области биоэлектроаналитической химии постоянно растет. Количество публикаций увеличивается с каждым годом. Ежегодно проводятся симпозиумы, конференции, совещания, посвященные электрохимическим биосенсорам и связанным с ними вопросам, т. е. мировой интерес к данной проблеме весьма высок. Это и не удивительно, поскольку ферментные электроды позволяют успешно решить целый ряд сложных проблем анализа субстратов, активаторов и ингибиторов ферментов; они весьма перспективны в биохимическом анализе, медицине и фармакологии [13, 14]. Кроме того, уже сейчас на основе ферментных электродов, сочетающих специфичность биокатализаторов и высокую чувствительность электрохимической аппаратуры, созданы эффективные электроаналитические анализаторы [15].

Данный обзор посвящен одному из типов биосенсоров с амперометрической индикацией сигнала и охватывает литературу с 1977 г. до настоящего времени. Более ранние работы в этой области систематизированы в [7, 8, 10, 11, 16]. Упоминание о них представляет интерес в плане становления данной области электроаналитической химии и биоэлектрокатализа [17]. Целый ряд последующих обзоров посвящен описанию большого числа ферментных систем и разнообразных амперометрических сенсоров на их основе [18, 19]. Причем наибольшее внимание уделено теоретическому описанию и свойствам различных типов ферментных электродов [18—24] и их составных частей [21], вопросам кинетики ферментативных реакций [25—27] и условиям работы электродов (*in vivo* и *ex vivo*) [28, 29]. Из года в год число новых ферментных электродов растет и расширяется диапазон их применения [30]. Однако несмотря на многообразие ферментных датчиков существуют единые методологические подходы к их конструированию, единые требования к функционированию электродов, а также к способам контроля стабильности и воспроизводимости показаний [31].

Современные ферментные электроды позволяют с высокой чувствительностью и селективностью определять многие органические и неорганические вещества, являющиеся субстратами, ингибиторами и активаторами ферментов, т. е. прямых и косвенных участников ферментативной реакции. Чувствительность ряда биосенсоров достигает в отдельных случаях нескольких пикамолей на литр [30].

Проблемам практического применения ферментных электродов в клинических исследованиях, микробиологии, иммунологии, других областях медицины, а также экологии и сельского хозяйства посвящены обзоры [32, 33], а также материалы ряда симпозиумов, конференций и совещаний [13, 34—39]. Причем отмечается несомненная экономическая рентабельность применения ферментных систем для анализа [37, 40], перспективность использования биодатчиков *in vivo* и *in vitro* [38, 41].

Несмотря на всплеск интереса различных исследователей к этой области знания, отраженный в упомянутых публикациях, следует отметить, что библиография в обзорах, появившихся за относительно короткое время, отражает «специфические» интересы авторов, и как правило, большей частью не повторяется, поэтому каждый обзор служит дополнением другого.

II. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ДАТЧИКИ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

Анализ литературы по вопросам, связанным с приготовлением биосенсоров, позволяет выделить в процессе изготовления любого ферментного электрода основные 4 стадии [16]:

- выбор фермента как реагента;
- получение фермента;
- иммобилизация фермента;
- конструирование самого ферментного электрода.

Нужно также отметить, что при изготовлении электрода большое значение имеет выбор способа регистрации полезного сигнала, т. е. подбор того или иного, в данном случае, электрохимического датчика. Причем, можно создать электрод трех типов: тип А — диализный мембранный электрод; тип В — с физическим нанесением фермента на поверхность; тип С — прямой иммобилизацией фермента на мембране [16].

Первым биосенсором явился ферментный электрод типа А для определения глюкозы, изготовленной на основе ячейки (электрода) Кларка, где глюкозооксидазу удерживали в виде тонкого слоя между двумя диализными мембранами [7, 8]. Впоследствии раствор глюкозооксидазы был заменен глюкозооксидазой, иммобилизованной в полиакриламидном геле. Устройство одного из первых биосенсоров представлено на рис. 1 [8]. В настоящее время ферментный электрод изображают как двухмембранную модель (рис. 2) [42], что позволяет на основе теоретического анализа получать полные и приближенные уравнения, характеризующие стационарное поведение моноферментных электродов во всем диапазоне концентраций субстрата. При этом можно оценить влияние различных факторов, таких, как диффузионный слой, отношение толщины ферментсодержащего слоя и наружной мембраны к рабочим характеристикам датчиков.

Ферментный препарат предлагают также фиксировать на поверхности мешалки или на поверхности легко сменяемой неподвижной части, устанавливаемой внутри ферментного реактора, что, по мнению авторов [43], улучшает ряд аналитических характеристик данных устройств.

Действие ферментных электродов основано на прямом электронном переносе между активным центром иммобилизованного фермента и поверхностью электрохимического датчика, зачастую модифицированную тем или иным способом. Но перенос электронов можно осуществить и при помощи специальных медиаторов.

Основные требования, которые предъявляются к медиаторам, можно сформулировать следующим образом [44, 45]:

- стадия взаимодействия медиатора с активным центром фермента должна быть быстрой, т. е. медиатор должен быть, по существу, как бы субстратом фермента;
- окислительно-восстановительный потенциал медиатора должен быть низким и не зависеть от pH;
- медиатор должен электрохимически окисляться (или восстанавливаться) на электроде из данного материала в условиях, близких к обратимым;
- переносчик электронов должен быть стабильным (его восстановленная форма не должна, например, окисляться кислородом воздуха).

Чаще всего в качестве медиаторов применяют низкомолекулярные соединения, характеризующиеся большой подвижностью электрохимического равновесия — красители, соединения типа хинонов, ферри- и ферроцианиды, проводящие органические соли, т. е. молекулы и ионы, существующие в растворах в двух формах, отвечающих различным степеням окисления одного из входящих в них элементов [21, 25, 26]. Таким образом, выбор медиатора представляет собой особую задачу.

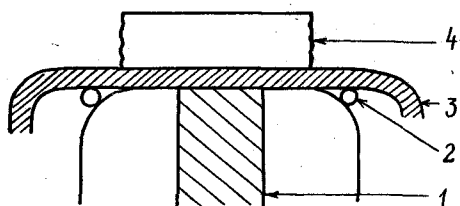


Рис. 1

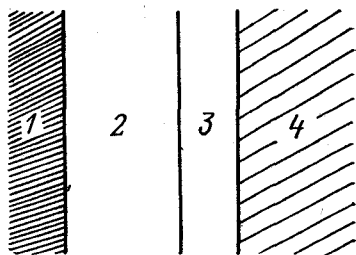


Рис. 2

Рис. 1. Схематическое изображение ферментного глюкозного электрода, изготовленного на основе кислородного мембранного датчика [8]: 1 — катод, 2 — электрод сравнения, 3 — полупроницаемая тефлоновая мембрана, 4 — энзимный гелевый слой

Рис. 2. Общая схема ферментного электрода [42]: 1 — индикаторный электрод (плоский), 2 — слой иммобилизованного фермента, 3 — наружная мембрана, 4 — анализируемый раствор субстрата

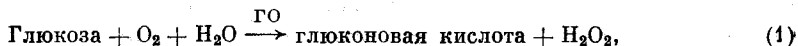
1. Биосенсоры для определения глюкозы

Следует отметить, что на сегодняшний день для определения глюкозы создано наибольшее число различных биодатчиков и соответствующих приборов-анализаторов, что связано с необходимостью контроля за содержанием сахара в биологических жидкостях не только для диагностирования, но и для лечения целого ряда заболеваний. В настоящее время имеются уже отечественные промышленные разработки таких анализаторов [9].

Все ферментные электроды на глюкозу с амперометрической индикацией, использующие способность глюкозы окисляться (уравнение (1)), изготавливают на основе кислородных электродов Кларка, пероксидных электродов и некоторых других детекторов [46].

В качестве индикаторного электрода в кислородных электродах Кларка и его модификациях применяют электроды из Pt, Au, Ag или Rh. Электродная часть, как правило, отделяется от анализируемого объекта и раствора тонкой полимерной пленкой, непроницаемой ни для высоко-, ни для низкомолекулярных соединений, но проницаемой для кислорода (см. рис. 1).

Принцип работы такого электрода прост: фермент катализирует удаление кислорода из раствора со скоростью, зависящей от содержания глюкозы, что и фиксируется кислородным электродом.



ГО — глюкозооксидаза.

Основным достоинством кислородных датчиков является простота изготовления, высокая стабильность, селективность и воспроизводимость показаний, достаточно высокая чувствительность.

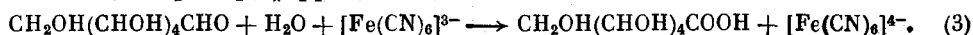
Окисление пероксида водорода (уравнение (2)) следует обычно за реакцией (1), что и может быть зафиксировано соответствующими электродами на пероксид водорода:



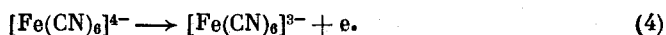
Такие датчики изготавливают из различных материалов (Pt, Au, Ni, графита). Четко выраженный диффузионный ток дает возможность использовать реакцию (2) для количественного определения глюкозы (на платиновом электроде эта реакция наблюдается при 0,6—0,7 В относительно нас. к. э.). Анализаторы на пероксид водорода отличаются малым временем отклика в интервале 45—60 с (120 с для проточного непрерывного

анализатора крови), но более низкой селективностью, поскольку при потенциалах окисления H_2O_2 электрохимическому превращению подвергается также ряд органических соединений, которые могут присутствовать в образце.

Помимо анализаторов на глюкозу с кислородным электродом и с электродом на пероксид водорода, разработаны устройства, в которых ферментативное окисление глюкозы осуществляется не кислородом, а другим окислителем, например, феррицианидом калия:



Образующийся в результате реакции (3) ферроцианид окисляется на платиновом электроде:

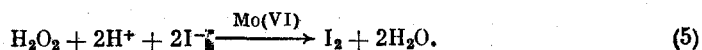


Реакция (4) осуществляется при потенциале $-0,5$ В относительно хлорсеребряного электрода сравнения, служащего одновременно вспомогательным [46].

Реакция гидролиза глюкозы протекает и с участием хинона. Образующийся гидрохинон обычно фиксируют платиновым электродом. Такой принцип использован в датчике на глюкозу с глюкозооксидазой (ГО), иммобилизованной на целлофане [15]. Ферментные электроды на глюкозу, основанные на подобных принципах и разрабатываемые ранее, подробно описаны в [7, 8, 10, 11]. Использование в качестве собственно электрохимического датчика различных углеродистых материалов в подобных устройствах отражено в статье [21]. Ряд работ в этой области описан в [30].

В сводной табл. 1 приведены характеристики различных ферментных датчиков, в том числе и для определения глюкозы.

Разработан ферментный электрод для определения глюкозы, с помощью которого следят за изменением концентрации H_2O_2 по катализируемой Mo(VI) реакции с иодид-ионами:



Меняя скорость вращения дискового электрода с кольцом, на котором иммобилизована ГО, определяют скорость массопереноса субстрата и скорость каталитической реакции. Срок действия такого электрода около 6 дн [47]. Преимущества использования в амперометрических датчиках вращающихся электродов типа «диск с кольцом» обсуждены также в статье [20].

При разработке глюкозных датчиков ГО иммобилизовали тремя способами: 1) ковалентной пришивкой бифункциональным реагентом — глutarовым альдегидом на модифицированном кремнеземном носителе силохроме С-50; 2) с помощью синтетического водорастворимого сополимера акролеина с винилпиридином; 3) окислением углеродных компонентов фермента. Носитель с иммобилизованным ферментом помещали на дно ячейки под нейлоновым пористым фильтром. С помощью такого ферментного датчика в течение двух недель можно провести более 200 определений стандартных растворов глюкозы по единому градуированному графику. Время отклика электрода составляет 10—15 с. Препарат, иммобилизованной ГО, полученный окислением углеводородных компонентов фермента, хранили более двух месяцев при комнатной температуре без потери активности [50]. Относительное стандартное отклонение единичного определения (s_r) составило около 0,03 в интервале концентраций субстрата 0,18—0,10 мк/мл и 0,13 при концентрации субстрата 0,005 мг/мл [50]. Для увеличения скорости переноса электронов в ряде биосенсоров, как отмечалось выше, используют различные медиаторы. Так, предложен селективный ферментный электрод для определения глюкозы, механизм отклика

Аналитические возможности ферментных амперометрических датчиков

Таблица 1

Определяемое соединение	Фермент	Метод иммобилизации	Амперометрический детектор	Интервал определяемых концентраций	Ссылки
Глюкоза	Глюкозооксидаза	Сшивание глутаровым альдегидом с поверхностью угольной пасты с добавками аминов	Вращающийся дисковый электрод с кольцом	—	[47]
	»	Сшивание с альбумином	Платиновый H_2O_2 -электрод	0,05—10 мМ	[48]
	»	Захват в приэлектродном слое	Два платиновых ферроцианидных электрода	6,9—27,8 мМ	[49]
	»	а) Ковалентная пришивка глутаровым альдегидом на силихроме С-50; б) С помощью синтетического сополимера акролеина с винилпиридином; в) Окисление углеводородных компонентов фермента	Кислородный электрод Кларка	$3,10^{-5}$ — $1,10^{-3}$ М	[50]
	»	Ковалентная пришивка к полиамидным сеткам	Мембранный O_2 -электрод	0,1—7,0 мМ	[51]
	»	Захват в гель в приэлектродном слое	Алюминиевый стержень с графитовым торцом и нанесенным на него слоем геля, медиатор — $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$5,10^{-6}$ — $2,10^{-3}$ М	[52]
	»	Ковалентная пришивка к графиту, модифицированному 1-циклогексил-3-(2-морфолинотил)карбодимид <i>п</i> -метилтолуолсульфонатом	Графитовый электрод, медиатор — ферроцен	1—30 мМ	[53]

	Глюкозооксидаза	Захват в приэлектродном слое	Платиновый диск, покрытый полупроницаемой мембраной	0,01—7,00 мМ	[54]
	»	Ковалентная пришивка к коллагеновым пленкам	Платиновый H_2O_2 -электрод	10^{-6} — 10^{-3} М	[55]
	»	Пленка с иммобилизованной ГО	Катод — серебро, анод — платина	0,8 мг/мл	[58]
	»	Электрополимеризация пиррола в присутствии фермента	Платиновый или стеклоуглеродный электрод	10^{-4} — 10^{-2} М	[57]
	»	Включение в пленку из поли-N-метилпиррола	Платиновый дисковый электрод	0,22 М	[58]
	»	Ковалентная пришивка к стеклоуглеродному электроду через борнокислотные группы 3-аминофенилборной кислоты	Стеклоуглеродный электрод, модифицированный 3-аминофенилборной кислотой	—	[59]
	»	Адсорбция ГО на модифицированном графитовом электроде	Графитовый электрод, модифицированный ионным напылением палладия и золота	$3,10^{-6}$ — $4,10^{-3}$ М	[60]
	»	Гомогенная мембрана	Мембранный O_2 -электрод	1,0—5,0 М	[61]
	»	ГО модифицирована путем введения производных ферроцена	—	—	[28]
	»	Включение в полупроницаемую мембрану	Пастовый угольный электрод, модифицированный п-бензохиноном	—	[62]

Таблица 1 (продолжение)

Определяемое соединение	Фермент	Метод иммобилизации	Амперометрический детектор	Интервал определяемых концентраций	Ссылки
	Глюкозооксидаза	Включение в полупроницаемую мембрану вместе с <i>п</i> -бензохиноном	Золотой и сетчатый платиновый электроды	—	[63]
	»	Присоединение активированной <i>п</i> -бензохиноном ГО к ацетатцеллюлозной мембране с ковалентно связанным бычьим альбумином	Платиновый электрод	—	[64]
	»	Ковалентное связывание с ферроценкарбоновыми кислотами	Стеклоуглеродный электрод	—	[65]
Мочевая кислота	Уриказы	Ковалентное связывание с глутаровым альдегидом	Платиновый электрод с тонким слоем иммобилизованного фермента	0,02—0,08% в сыворотке, 0,25—0,75% в моче	[66]
	»	Ковалентная пришивка к пористому стеклу с помощью глутарового альдегида	Платиновый H_2O_2 -электрод	2—8 мг/100 мл сыворотки	[67]
Ароматические амины	Пероксидаза	а) Адсорбция; б) адсорбция с последующей обработкой глутаровым альдегидом	Эпоксидированный в тефлоновом корпусе стеклоуглеродный электрод	0,1—3 мкМ	[68]
Холестерин	Холестериноксидаза	Включение в коллагеновую мембрану	Мембранный O_2 -электрод	0—0,2 мМ	[69]
	»	Захват в гель, обработанный глутаровым альдегидом, 2-гидроксиметилметокрилата	Платиновый O_2 -электрод	0,4—12 мМ	[70]

Этанол	Алкогольоксидаза	Захват в приэлектродном слое под нейлоновой пленкой	Платиновый дисковый H_2O_2 -электрод	10 мг в 100 г определяемого вещества	[46]
Лактат-ион (молочная кислота)	Лактатмонооксидаза	В желатиновом геле	O_2 -зонд типа Кларка	10^{-5} — $6,10^{-4}$ М	[71]
	Цитохром b_2	Сшивание с альбумином	Платиновый ферроцианидный электрод	1,2 мМ	[48]
	»	Адсорбция на токопроводящей матрице	Органические металлы	2 мМ	[72]
Галактоза	Галактозооксидаза	Сшивание с альбумином	Электрохимический H_2O_2 -датчик	0—27,8 мМ	[73]
Фенол	Полифенолоксидаза	Сшивание с альбумином	Мембранный O_2 -электрод	0—0,08 мМ	[74]
Оксалат-ион	Оксалатоксидаза	Пришивка к полиамидной мембране	Платиновый H_2O_2 -электрод	10^{-7} — 10^{-4} М	[75]
Пируват-ион	Пируватоксидаза	Иммобилизация на нейлоне	Платиновый H_2O_2 -электрод, O_2 -электрод	10^{-3} мМ	[76]
Салицилат-ион	Салицилатгидроксилаза	Химическая иммобилизация на поверхности электрода	O_2 -датчик	10^{-5} — $2,10^{-3}$ М	[77]
Сахароза	Инвертаза	Адсорбция и захват в матрицу полимера поливинилового спирта	Электрод из пирографита	—	[78]
Ацетилхолин, холин	Ацетилхолинэстераза, холинэстераза	Иммобилизация на нейлоновой сетке в приэлектродном слое	Амперометрический H_2O_2 -датчик	1—10 мкМ	[79]
Бутирилтиохолин иодид (ВГХИ)	Холинэстераза	Включение в полиакриламидный гель с помощью глутарового альдегида	Стационарный амальгмированный серебряный электрод	0,05—0,85 мг/мл	[80]

Таблица 1 (окончание)

Определяемое соединение	Фермент	Метод иммобилизации	Амперометрический детектор	Интервал определяемых концентраций	Ссылки
БХТИ и ингибиторы ХЭ	Холинэстераза	Ковалентная пришивка к нитроцеллюлозе с помощью глутарового альдегида	Стационарный амальгмированный серебряный электрод	10^{-3} — 10^{-6} М, 10^{-3} — $n \cdot 10^{-11}$ М	[81] [82]
Индоксилацетат	»	В желатиновом геле на гидратцеллюлозной мембране	Вращающийся дисковый электрод из стеклоуглерода	$1,5 \cdot 10^{-3}$ М — $5,0 \cdot 10^{-3}$ М	[83]
Гипоксантин, ксантин, пурин	Ксантиноксидаза	Адсорбция на электроде	Проводящие органические соли тетрагидрофульвален ⁺ /тетрацианодиметан ⁻	10^{-5} — $6 \cdot 10^{-4}$ М	[84]
НАДН	Глюкозодегидрогеназа	Адсорбция на электроде	Проводящие органические соли N-метилфенарин ⁺ /тетрацианхинодиметан ⁻	—	[84]
α -Аскорбиновая кислота	Аскорбиноксидаза	Пластика (5×5×2 мм) из кожуры огурца (тыквы)	Кислородный электрод Кларка	—	[85]
Допамин, допаминхинон	Полифенолоксидаза	Ткань плода банана	Угольный пастовый электрод	$1,3 \cdot 10^{-6}$ — $9 \cdot 10^{-5}$ М	[86]
Глицерофосфат	α, α -глицерофосфатоксидаза	Сшивка с поверхностью тефлоновой мембраны с помощью сывороточного альбумина и глутарового альдегида	Кислородный электрод Кларка	—	[87]

Холинсодержащие липиды	Холиноксидаза	Физическая иммобилизация—включение в триацетатцеллюлозную мембрану	То же	$3,3 \cdot 10^{-6}$ — $8,6 \cdot 10^{-6}$ М	[88]
Мальтоза, глюкоза	Глюкоамилаза, глюкоксидаза	Ковалентная пришивка к коллагеновым пленкам	Платиновый анод, H_2O_2 -электрод	$5 \cdot 10^{-8}$ М (через 2 мес. $2,5 \cdot 10^{-7}$ М)	[55]
Холестерин	Холестериноксидаза, холистерингидролаза	Захват в гель 2-гидроксиметакрилата, обработанного глутаровым альдегидом	Платиновый кислородный электрод	$4 \cdot 10^{-4}$ — $12 \cdot 10^{-3}$ М	[70]
Ароматические амиды	Пероксидаза, глюкозооксидаза	Ковалентная пришивка глутарового альдегида к поверхности электрода	Стеклоуглеродный электрод	$4,7 \cdot 10^{-5}$ М	[68]
Глюкоза	Глюкооксидаза, каталаза	Захват в приэлектродном слое в гомогенную мембрану	Мембранный кислородный электрод	$1 \cdot 10^{-3}$ М	[61]
Этиловый спирт	Алкогольоксидаза, пероксидаза	Мембрана в приэлектродном слое	Стеклоуглеродный электрод	—	[89]
Мочевая кислота	Уриказа, пероксидаза	Ковалентная пришивка к альбумину с глутаровым альдегидом на диализную мембрану	»	$(0,5-10) \times 10^{-5}$ М	[90]
α -Лактатаны, пируватионы	Лактатоксидаза, лактатдегидрогеназа	Пришивка к тефлоновой мембране	Кислородный электрод Кларка	$8 \cdot 10^{-8}$ — $8 \cdot 10^{-6}$ М	[91]
Глюкоза, мочевина	Глюкооксидаза и уриказа	Ковалентная пришивка глутаровым альдегидом к графиту	Графитовый электрод	$0-7 \cdot 10^{-6}$ М	[92]

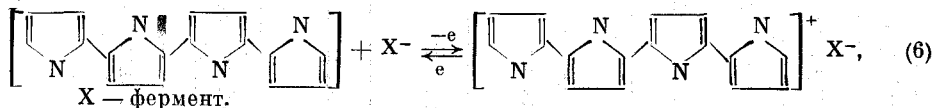
которого основан на избирательном окислении глюкозы до глюконовой кислоты действием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в присутствии ГО [52]. Образующийся $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ снова окисляется до $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ на поверхности индикаторного ферментного электрода, состоящего из алюминиевого стержня, торец которого покрыт графитосодержащим материалом. На графит нанесен слой геля с иммобилизованной ГО, закрытый мембраной из целлофана. В промежутке между измерениями электрод хранили при 4°C в фосфатном буферном растворе содержащем $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Величина s_r составляет 0,03—0,06 для интервала $5 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ М глюкозы и менее 0,03 при больших концентрациях субстрата.

Время отклика зависит от концентрации глюкозы и составляет для малых концентраций 2—4 мин. Электрод устойчив в работе не менее трех недель и использован для определения глюкозы в сыворотке крови и мочи по градуированному графику, который строили ежедневно. Определению не мешает присутствие других ферментов, в том числе каталазы.

Описан ферментный электрод для определения глюкозы в крови и плазме, в котором в качестве медиатора между иммобилизованной ГО и графитовым электродом используют ферроцен и его производные, окисленные до ферроцениевых ионов [53]. В работе [54] для этой цели применяют флавинаденилдинуклеотид. Коллагеновые пленки, на которых проводят иммобилизацию, предварительно активируют ацил-азидным способом [55]. Платиновый электрод покрывают коллагеновой мембраной с иммобилизованной ГО и перед измерениями высушивают от 2 дн до 2 нед. Между измерениями электрод хранят на воздухе, так как вследствие дегидратации происходит более плотное покрытие платинового электрода мембраной и в результате облегчается диффузия H_2O_2 к электроду. После внесения электрода в раствор мембрана остается плотно прижатой к электроду. Полученный электрод стабилен в течение месяца, а при измерении содержания глюкозы в течение 160 дн. Время отклика до высушивания составляет немногим более 10 мин, однако через 2 дн высушивания оно улучшилось на 35% и составило уже 4—8 мин.

Для устранения мешающего действия аскорбиновой и мочевой кислот, билирубина и аминокислот при анализе биологических жидкостей на содержание глюкозы в ферментный электрод между мембраной с иммобилизованной глюкозооксидазой и платиновым анодом вводят диафрагму из ацетата целлюлозы, проницаемую только для низкомолекулярных соединений малого размера [56]. Величина s_r при определении 0,20 мг/мл глюкозы составляет 2—3% (число определений равно 20).

Одним из перспективных способов получения ферментных электродов является иммобилизация фермента в полимерные покрытия непосредственно на поверхности самого электрохимического датчика, причем полимеризация мономеров, из которых будет возникать полимер и сшивание макромолекул последнего происходит в приэлектродном слое. Этот новый интересный способ иммобилизации ГО за счет электрохимической полимеризации описан в работах [57, 58]. Например, ГО захватывают полипиррольной пленкой, растущей на поверхности электрода [57]. Такой способ иммобилизации имеет ряд преимуществ. Полипиррол, проводящий органический материал, и продукты ферментативной реакции с глюкозой оказываются в непосредственной близости к проводящему материалу. За концентрацией H_2O_2 следят также по его реакции с анионом иодида (I^-), за которой следует электрохимическое восстановление иода при потенциале $\leq 0,2$ В относительно нас. к. э.



Полученный электрод стабилен в течение 7 дн. Описано получение иммобилизованной ГО в пленке поли-N-метилпиррола при препаративном электрохимическом окислении N-метилпиррола на платиновом диске на фоне 0,1 М $(C_2H_5)_4NBH_4$ в водном фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем 1 мк/мл глюкозооксидазы [53]. Показано, что образующаяся H_2O_2 окисляется на тыльной поверхности платины, а не на полимерной пленке. Отклик электрода наблюдается при 0,95 В (относительно нас. к. э.).

Прямой перенос электрона осуществляется также между ГО и поверхностью стеклогуглеродного электрода, модифицированного 3-аминофенилборной кислотой [59].

Интересный электрод предложен в работе [60]. В ней отмечается, что частичное удаление кислорода из анализируемого раствора снижает отклик электрода, однако содержащегося в ферментном слое на графитовом электроде кислорода достаточно для сохранения линейности градуировочного графика при определении содержаний глюкозы ≤ 1 мМ. Кажущаяся константа скорости ферментативной реакции Михаэлиса-Ментен составляет ~ 50 ммоль. Стабильность отклика полученного электрода зависит от рН, от приложенного к электроду значения потенциала и частоты введения проб.

Устойчивый и достаточно быстрый отклик ферментного электрода наблюдается обычно в случае, если меняется только концентрация глюкозы [61]. Этими же авторами установлено, что сократить время отклика можно, уменьшая толщину мембраны в приэлектродном слое и увеличивая каталитическую константу иммобилизованного фермента. С целью оптимизации отклика электрода рассмотрены вариации толщины мембраны

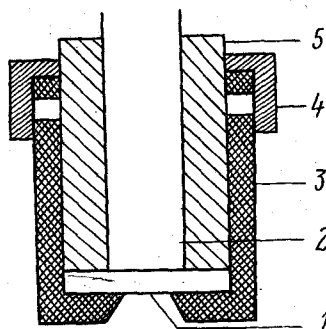


Рис. 3. Схема вращающегося мембранного глюкозного электрода [64]. 1 — мембрана, содержащая иммобилизованный фермент, 2 — платиновый электрод (ось вращающегося электрода), 3 — держатель мембраны, 4 — зажимное кольцо с резьбой, 5 — корпус электрода

и коэффициента диффузии. Еще одна модель ферментного электрода на глюкозу предложена в [28]. В этой модели переносчик электронов включен в структуру ГО. Так, получена модифицированная ГО с помощью ферроцена и его производных, которую затем наносили на электрод. Окисление глюкозы уже происходило без участия кислорода непосредственно на электроде.

В качестве медиатора в работе [62] используют упомянутый *n*-бензохинон. Его вводят в объем угольного пастового электрода, поверхность которого закрывают полупроницаемой мембраной с иммобилизованной ГО. Аналогичный прием использован и для других ферментов (глюконатдегидрогеназы, этанолдегидрогеназы).

Возможность применения золотых электродов, покрытых пленкой ГО с *n*-бензохиноном и платиновых сетчатых электродов, покрытых пленкой ГО и кислородпроницаемой мембраной, показана в работе [63]. Одна из последних разновидностей глюкозного электрода описана в [64] (рис. 3). Способ иммобилизации, предложенный авторами, позволяет получить мембраны с высокой поверхностной активностью, которые стабильные в течение месяца и более. Электрохимический контроль и контроль с помощью

радиоактивных меток показывают незначительную инактивацию фермента при иммобилизации.

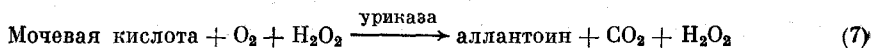
Предлагают также ковалентное связывание ГО с ферроценкарбоновыми кислотами [65]. Значение каталитической константы наибольшее в случае модифицирования ГО ферроценуксусной кислотой.

Измерение отклика платинового электрода, покрытого слоем иммобилизованной ГО, в зависимости от времени и концентрации субстрата показывает хорошее соответствие между теоретическими представлениями и экспериментом [93]. Удовлетворительно согласуется и изменение концентрационных профилей в математической модели многослойного ферментного датчика с полученными экспериментально на примере серийно выпускаемого датчика для определения глюкозы [94]. Причем эти расчетные концентрационные профили лучше описывают работу датчика, по сравнению с однослойной моделью.

2. Использование различных ферментных реакций в биосенсорах]

Электроды на глюкозу составляют наибольшую группу ферментных амперометрических датчиков. Другие ферменты и ферментные реакции используются пока для этих целей значительно реже (см. табл. 1).

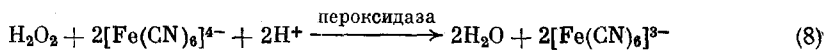
Так, например, мочевую кислоту определяют с помощью ферментных датчиков на основе иммобилизованной уриказы [66, 67].



Уменьшение растворенного кислорода во время окисления субстрата фиксируется при $-0,6$ В (относительно нас. к. э.) платиновым электродом с тонким слоем иммобилизованного фермента [66]. Ошибка определения не превышает 4% при определении мочевой кислоты в моче и 6% при определении в сыворотке крови. При использовании электрода несколько раз в неделю в течение 100 дней его активность уменьшается лишь на 29%.

В работе [67] описано применение ковалентной пришивки фермента к пористому стеклу электрода глутаровым альдегидом. Такой электрод оказался очень стабильным в работе (~ 10 мес), что позволило использовать его в проточном режиме.

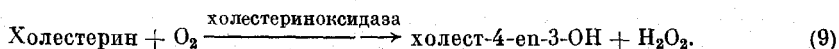
Основой действия электродов с пероксидазой является реакция окисления ферроцианид-иона пероксидом водорода, катализируемая иммобилизованной пероксидазой:



Образующийся феррицианид-ион восстанавливается на стеклоуглеродном электроде при 0 В (относительно хлорсеребряного электрода) [68]. При наличии ароматических соединений, являющихся активаторами пероксидазного окисления ферроцианида, скорость ферментативной реакции возрастает, и катодный ток увеличивается, что позволяет проводить определение, например ряда ароматических аминов [68]. Интервал определяемых концентраций меняется в зависимости от типа субстрата. Нижняя граница определяемых концентраций *о*-дианизидина и бензидаина 0,055 и 0,065 мкмоль, а для остальных изученных соединений она выше. Коэффициент чувствительности данных ферментных электродов меняется от 0,215 до 0,0022 мкА/мкмоль при переходе от *о*-дианизидина к 1,2-диаминобензолу. Для электродов второго типа (см. табл. 1) этот коэффициент выше, в результате чего значительно уменьшается нижняя граница определяемых содержаний ароматических аминов.

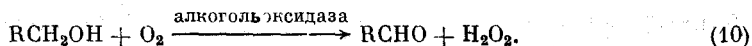
Холестерин является одним из физиологически важных компонентов

крови. Под действием холестериноксидазы происходит окисление холестерина:



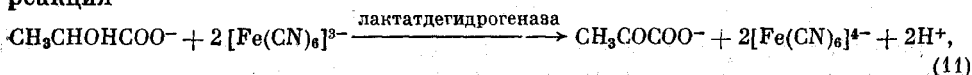
Для его определения разработан также ряд ферментных электродов [46, 69, 70]. Индикацию ведут по току восстановления H_2O_2 на кислородном платиновом электроде, на поверхность которого помещают гель с иммобилизованным ферментом [70]. Гель удерживают двумя мембранами: внутренней — из ацетата целлюлозы и внешней — из шелка. Время отклика электрода 0,5 мин в проточном и 2 мин в стационарном режимах. Величина s_r равна 0,027 и 0,045 для каждого режима соответственно.

Разработаны ферментные электроды для определения этанола в крови [46]. Алкогольоксидазу иммобилизуют на поверхности платинового дискового электрода. При потенциале $-0,6$ В измеряют убыль кислорода, пропорциональную содержанию этанола:



Для этих же целей используют и алкогольдегидрогеназу [46], причем в ферментативной и связанных с ней химических реакциях участвуют никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флавиномононуклеотид (ФМН). Восстановленный ФМН окисляется на платиновом аноде, и возникает ток, пропорциональный концентрации этанола в исследуемом растворе. Фермент-электродные процессы, протекающие в амперометрических датчиках на основе мембран с иммобилизованной лактатдегидрогеназой аналогичны процессам, наблюдаемым при определении этанола с участием ФМН, но используются для определения молочной кислоты [46].

Лактатный датчик, в котором протекает следующая ферментативная реакция



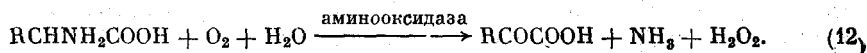
позволяет избежать использования НАДН и ФМН. Выбор оптимальных параметров, особенно толщины мембраны, позволяет определять количество лактата в крови без предварительной подготовки в течение 1 мин. Кроме платинового можно использовать в качестве рабочего электрода золотой или углеродный [46].

Описан автоматический анализатор с ферментным сенсором для определения концентрации лактат-ионов и измерения активности фермента лактатдегидрогеназы [71]. Ферментный сенсор представляет собой так называемый кислородный зонд типа электрода Кларка с фиксированным на нем слоем желатина, в котором иммобилизована лактатмонооксидаза. Величина s_r менее 0,01. Ферментный сенсор устойчиво работает в течение 55 дн. При добавлении НАДН и пируват-ионов в пробу можно последовательно определить содержание лактатионов и оценить активность лактатдегидрогеназы, для которой градуировочный график линейен в интервале 2,7—54,0 ед. биологической активности/л.

Кроме лактатдегидрогеназы для определения молочной кислоты в этих же анализах можно использовать и фермент цитохром b_2 , который катализирует перенос электронов на медиаторы ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) [48, 72].

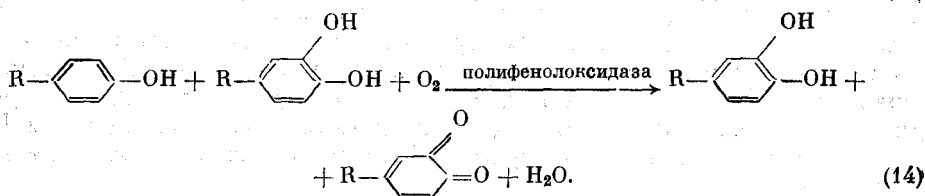
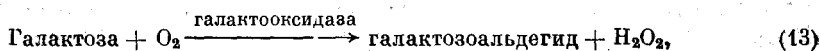
Предложены некоторые усовершенствования ферментных электродов [95]. Их сущность заключается в том, что в состав электропроводящей подложки, изготовленной из порошкообразного графита, пирографита и металлов, вводят ионные (C_{10} — C_{30} -карбоновые кислоты и др.) или неионные (4,4'-дипиридил, 1,2-бис-(4-пиридил)этилен и др.) соединения. При этом на поверхности таких электродов образуются функциональные группы для ориентации и закрепления электроактивных ферментов, та-

ких, как цитохром b_2 , кофакторов или других биокатализаторов. Поверхность углеродсодержащих подложек можно покрыть функциональными кислородсодержащими группами простым химическим окислением. Преимущество предлагаемых «функционализованных» электродов в частности в том, что биокатализаторы имеют непосредственный контакт с подложкой, т. е. с самим электродом. Поэтому окисление или восстановление органических субстратов протекает под действием ферментов без дополнительного введения в раствор окислителей, восстановителей или медиаторов. Такие электроды могут быть использованы не только для электроаналитических целей, но и для направленного электроорганического синтеза. Ферментные электроды применяют и для определения аминокислот [8, 46], при этом мембрана с ковалентно иммобилизованной аминоксидазой катализирует реакцию:



Данный фермент обладает групповой специфичностью и катализирует окисление всех присутствующих в анализируемой жидкости *L*-аминокислот.

Для определения галактозы [73] и фенолов [74] разработаны ферментные электроды, действие которых основано на реакциях:



Разработана простая и быстрая методика определения оксалат-ионов в пищевых продуктах с минимумом вспомогательных операций, основанная на использовании нового вольтамперометрического ферментного датчика [75]. Оксалаксоксидаза иммобилизована на серийно выпускаемой полиамидной мембране. Время отклика датчика в зависимости от концентрации ионов $C_2O_4^{2-}$, составляет от 20 до 60 с. Аналитический сигнал устойчив в течение почти 150 дн.

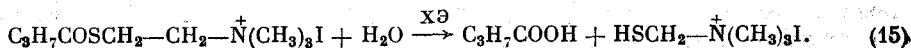
В клиническом анализе для определения пируват-ионов используют сенсор, действие которого основано на окислении пирувата растворенным кислородом воздуха в присутствии ионов HPO_4^{2-} с образованием H_2O_2 , причем процесс контролируют с помощью электрода на кислород или H_2O_2 [76].

На основе салицилатгидроксилазы, иммобилизованной на поверхности кислородного электрода, разработан ферментный электрод для определения салицилатов в сыворотке крови. Для выполнения определения ферментный датчик погружают в раствор смеси фосфатного буфера с комплексом III (pH 6,75). Затем прибавляют кофермент β -НАДН, спустя 5–10 мин вводят субстрат и через 1–6 мин в зависимости от концентрации салицилата измеряют ток с помощью ферментного электрода [77] ($s_r = 0,013-0,106$).

Инвертаза — фермент, гидролитически расщепляющий сахарозу на *D*-глюкозу и *D*-фруктозу, иммобилизован путем включения в полимерные покрытия в момент образования их непосредственно на поверхности электрода [78]. Полимерные покрытия на электродах из пирографита и алюминия можно получить при катодной поляризации в растворе поливинилового спирта, содержащем борную кислоту.

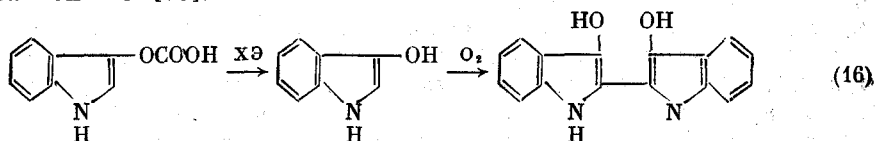
Описаны селективные биосенсоры на основе иммобилизованной холинэстеразы (ХЭ) для определения ацетилхолина и холина из пробы объемом 0,1—1 мл [79]. Время отклика около 1—2 мин. Показана возможность одновременного определения этих соединений из одной пробы с помощью двух сенсоров как в стационарных условиях, так и в проточной системе.

Предложен также ферментный электрод для определения концентрации тиохолиновых эфиров [80]. В качестве субстрата ХЭ авторы используют бутирiltиохоллин иодид, который подвергается гидролизу в присутствии ХЭ:



Определение основано на электрохимической активности продукта гидролиза — тиола. Объем анализируемого раствора 4—5 мл. Ошибка определения не превышает 9%. С помощью данного электрода можно определять и другие тиохолиновые эфиры, а также ингибиторы ХЭ, например фосфорсодержащие пестициды, что является крайне важным для решения проблем контроля окружающей среды. Оценены различные способы иммобилизации ХЭ: включение в полиакриламидный гель с обработкой глутаровым альдегидом, адсорбция на носителях — силикагеле, активированном угле, различных пленках [80]. Указаны достоинства и недостатки этих способов относительно использования в ферментных датчиках. Усовершенствованная модель этого датчика позволяет определять фосфорсодержащие пестициды и некоторые физиологически активные вещества до очень низких концентраций порядка $n \cdot 10^{-11}$ — $n \cdot 10^{-12}$ моль/л [81, 82].

В присутствии ХЭ происходит также гидролиз ряда синтетических соединений, в том числе и индоксилацетата. Продукт превращения последнего — индоксил при наличии кислорода воздуха в щелочной среде (рН 7,5—8,0) димеризуется. Скорость окисления индоксилацетата изучена с помощью стеклогуглеродного дискового вращающегося электрода с иммобилизованной ХЭ [83].



Разработаны ферментные сенсоры с проводящими органическими солями, выполняющими функцию материала электрода. Показана возможность определения гипоксантина, ксантина и пурина в плазме крови с помощью ксантиноксидазы, иммобилизованной на электроде тетратиофульвален⁺/тетрацианодиметан⁻. На отклик и стабильность сенсора влияют температура, рН и следы кислорода. Для определения НАДН используют глюкозодегидрогеназу, иммобилизованную на электроде N-метилфеназин⁺/тетрацианхинодимеран⁻ [84].

В последнее время при разработке ферментных электродов все чаще стали применять не препараты самих ферментов, а различные растительные материалы, их содержащие. Тканевые среды в биосенсорах выполняют функцию источников каталитической ферментативной активности. Так, например, создан ферментный датчик для амперометрического определения α-аскорбиновой кислоты, состоящий из электрода Кларки и пластинки кожуры огурца или тыквы, которые служат источником аскорбиноксидазы [85]. Определения проводят в буферном растворе (рН 6,0) с 0,5 ммоль/л ЭДТА. Активность фермента достаточна для обеспечения 50—80 определений. Пластинки без потери активности могут храниться в течение года в 50%-ном глицерине. Определению не мешают фенолы, кислоты, витамины В. С помощью полученного электрода проведено определе-

ние аскорбиновой кислоты в соках и фармацевтических препаратах с величиной $s_r = 0,03$.

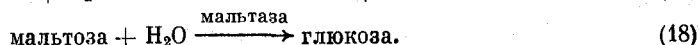
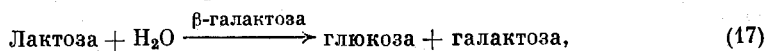
Аналогичный принцип использован в работе [86]. Ткань плода банана вводят в угольный пастовый электрод и определяют допамин. Время отклика этого биосенсора составляет не более 12 с. Величина тока каталитической реакции растет с увеличением содержания растительной ткани в пасте. Оптимальное содержание ткани 5,5%. Определению мешают пирокатехин и гидрохинон.

Из последних разработок амперометрических датчиков на основе электрода Кларка можно отметить сенсорные системы на глицерофосфат и холин-содержащие липиды [87, 88].

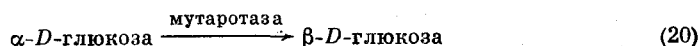
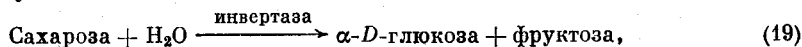
Предпринимаются новые попытки усовершенствовать составные части ферментного электрода на кислород. Для этой цели предложена пленка, проницаемая для H_2O_2 и непроницаемая для субстратов, из полиамидов, полиуретана, ацетата целлюлозы и других полимеров или сополимеров [96]. На пористой поверхности такой пленки иммобилизуют ферменты, реакция которых с субстратами идет с образованием H_2O_2 , например ГО, уриказу, ксантоксидазу, оксидазы *D*- и *L*-аминокислот, а также ферменты, образующие субстраты для ферментативных реакций с выделением H_2O_2 , например липазу, мутаротазу, фосфорилазу. Пленку наносят гладкой стороной на поверхность серебряного анода (используют и другие металлы). Такие пленки обладают большой прочностью, хорошо соединяются с электродом, обеспечивают хороший контакт фермента с субстратом, селективную проницаемость и высокую точность измерений.

3. Полиферментные биосенсоры

В тех случаях, когда продукты или субстраты ферментативной реакции электрохимически не активны, при создании амперометрических датчиков применяют последовательное превращение субстратов с помощью нескольких иммобилизованных биокатализаторов. Чаще всего используют биферментные реакции. На таком принципе, например, основано действие чувствительных к дисахаридам электродов [10]. Для определения лактозы и мальтозы обычно берут два фермента: ГО, окисляющую глюкозу по реакции (1), и β -галактозидазу или мальтазу. Дисахарид, диффундируя через мембрану, под действием соответствующего фермента отщепляет глюкозу, которая затем окисляется при помощи ГО в глюконовую кислоту. Кислородным электродом измеряется потребление O_2 , пропорциональное содержанию дисахарида в анализируемом растворе

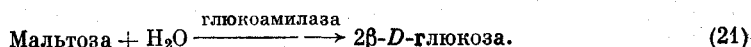


Чтобы определять сахарозу, необходим дополнительный фермент, который эпимеризует α -глюкозу — продукт гидролиза сахарозы — в β -форму, окисляемую ГО



Скорость неферментативной мутаротации высока, поэтому можно отказаться от применения мутаротазы. Чувствительность электрода к дисахариду при этом сильно уменьшается [10].

Для определения мальтозы используют также совместную иммобилизацию глюкоамилазы и ГО [55]:



Для определения сложных эфиров холестерина предлагают использовать

систему из двух иммобилизованных ферментов холестериноксидазы и гидролазы холестериновых эфиров [70]. Анализируемый раствор подвергают вначале воздействию холестерингидролазы, а затем холестериноксидазы, после чего находят общее количество холестерина.

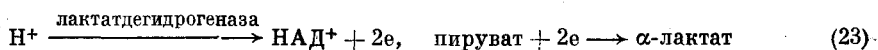
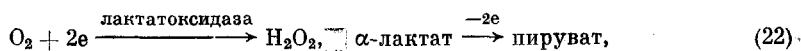
При определении ароматических аминов [68] для замены нестабильного субстрата H_2O_2 ферментные электроды готовят с использованием ГО. Смесь пероксидазы и ГО в 0,02 мл базового буферного раствора наносят на стеклоглеродный электрод и обрабатывают 2,5%-ным раствором глutarового альдегида (12—14 ч, 4° С). В присутствии в буферном растворе 0,1 ммоль глюкозы и 1,0 ммоль ферроцианида калия параметры этих электродов близки к параметрам соответствующих моноферментных электродов. Они обладают наибольшей стабильностью, сохраняя 45—62% чувствительности в течение 40 сут при 18—22° С. При функционировании этих биферментных электродов пероксид водорода образуется под действием ГО, а феррицианид генерируется пероксидазой. В условиях, когда пероксидазная реакция является лимитирующей (при концентрации глюкозы выше 0,1 ммоль), активаторы (ароматические соединения) увеличивают скорость процесса, и ток в системе растет. При более низкой концентрации глюкозы лимитирующей является глюкозидная реакция, и активаторы не влияют на ток электрода. Полученные биферментные электроды более удобны для практического применения в связи с высокой стабильностью. Их используют для определения ароматических аминов, например, *о*-дианизидина [68], глюкозы [61], этилового спирта [89], мочевой кислоты [90], α -лактат- и пируват-ионов [91].

Для определения этилового спирта проводят электролиз в буферном растворе (рН 7—8) с последующим измерением тока восстановления [89]. С целью увеличения селективности определения перед электролизом в исследуемый раствор вводят 1,0—1,5 мМ феррицианида калия. Определение мочевой кислоты проводят при диагностике гематологических заболеваний с помощью электрода на основе иммобилизованной микробной уреазы и пероксидазы [90]. В боратном буферном растворе, содержащем 1 мМ ферроцианида калия, остаточный ток при использовании ферментного электрода не превышает 1—2 мА. При добавлении в раствор мочевой кислоты ток значительно возрастает. Зависимостю стационарного тока от концентрации субстрата линейна вплоть до 0,30—0,35 ммоль/л. Продолжительность определения составляет 2—3 мин.

Эти биферментные электроды обладают высокой специфичностью и хорошей воспроизводимостью при определении мочевой кислоты в моче, крови и сыворотке. Электроды обладают также высокой стабильностью, сохраняя начальную чувствительность на уровне 50% при ежедневной пятичасовой эксплуатации и хранении в буферном растворе при 20—22° С в течение 70 сут.

Введение в фосфатный буферный раствор (рН 7,4), содержащий 10^{-3} моль/л НАДН, α -лактат- или пируват-ионы вызывает значительное снижение тока биферментного электрода ($\Delta I = 0,5$ мкА), тогда как в отсутствие НАДН в растворе $\Delta I < 8$ мА [91].

Схемы катализируемых ферментами в приэлектродном слое реакций представлены ниже:



Данный ферментный электрод «не различает» α -лактат- и пируват-ионы и может быть использован для количественного определения лактата лишь в тех образцах, в которых концентрация пируват-ионов значитель-

до ниже концентрации лактата. Время определения 3—5 мин, электрод стабилен более 10 дн при воспроизводимости определений $\pm 10\%$.

Биферментный электрод с ГО и уриказой, необходимой для подавления мешающего влияния мочевины, может быть использован для определения глюкозы и мочевины [92].

Описан также ферментный электрод с трипсином и ГО, адсорбированными на поверхности модифицированного оксидами алюминия, титана, циркония графитового электрода [97].

III. ПРОТОЧНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Концепция мониторинга, непрерывного анализа по типу *on line* и *in line* с помощью средств физикохимии и биологии, способных обеспечить автоматизацию контроля в реальном масштабе времени, приобретает важнейшее значение в методологии аналитической химии.

Для непрерывного анализа различных веществ на содержание субстратов, ингибиторов и активаторов ферментов, для возможности автоматизации контроля состава воздуха, воды и других объектов окружающей среды, для определения содержания компонентов в потоке большое значение приобретают исследования и разработки так называемых ферментных реакторов или анализаторов с иммобилизованными ферментами. Они обычно содержат довольно большое количество фермента, иммобилизованного на носителе, имеющем форму слоев или колец, что позволяет весь субстрат, содержащийся в образце, превратить в продукт за относительно короткий промежуток времени, в течение которого образец находится в реакторе.

Выделено 3 типа реакторов, отличающихся по форме, расположению носителя иммобилизованного фермента и расположению образца в них: трубчатый реактор для газообразных образцов; реактор, наполненный слоями шариков с иммобилизованными ферментами, и трубчатый реактор, наполненный твердыми шариками из волокон с иммобилизованным ферментом [24]. На таких принципах разработаны реакторы для определения глюкозы и лактозы с амперометрической детекцией.

Вопросам исследования структуры и свойств ферментных мембран для биореакторов, получаемых при иммобилизации одного или нескольких ферментов на природных или синтетических носителях посвящены обзоры [24, 98]. Проточные ферментные реакторы могут быть использованы и для непрерывной регистрации кинетики ферментативных реакций [7]. Подробное описание и схемы функционирования промышленных образцов ферментных реакторов отражены в обзорной статье, посвященной использованию иммобилизованных ферментов в аналитической химии [99].

Весьма перспективно использование ферментных реакторов и различных ферментных электродов в варианте проточно-инжекционного анализа [100]. На примере определения глюкозы с помощью индикаторного электрода на кислород, состоящего из платинового диска с закрепленными на поверхности двумя целлюлозными мембранами, между которыми помещается ГО в полиуритановом слое, разработаны математические модели функционирования таких анализаторов. Причем предложенная математическая модель практически полностью подтвердилась экспериментально [101]. С помощью этой системы можно проводить определение глюкозы почти в 300 образцах (объем пробы 1,5 мл) в течение часа, область линейной зависимости тока от концентрации 0,01—100 мМ глюкозы.

Используют также платиновые макро- и микроэлектроды с ГО иммобилизованной на нейлоновой сетке, расположенной вплотную к платиновому электроду или иммобилизованной непосредственно на поверхности платиновой проволоки [102]. Линейная зависимость градуировочных

графиков наблюдается в области $1 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-2}$ М глюкозы соответственно.¹

Для определения глюкозы в проточно-инжекционном варианте анализа применяют и электроды из графита, как сетчатого стекловидного [103], так и модифицированного ионным напылением палладия и золота [60] (см. табл. 1) с ковалентно иммобилизованной или адсорбированной ГО. Производительность реактора при изменении скорости потока от 0,5 до 2 мл/мин варьируется от 30 до 77 проб в час при $s_r = 0,02$. В интервале 2,5—10 мМ глюкозы наблюдается линейная зависимость градуировочного графика [103]. Электрод сохраняет 30% своей первоначальной активности в течение 40 дн при хранении при 2° С.

Имеется пример использования проточно-инжекционной системы на основе ферментного реактора шарикового типа для изучения кинетики реакции мутаротации *D*-глюкозы в присутствии фосфат-ионов и *D*-галактозы [104]. С помощью ряда параллельно расположенных ферментных реакторов и многоканального потенциостата можно определить глюкозу, фруктозу и цикрозу при их совместном присутствии [105]. При определении цикрозы перед соответствующим реактором помещали реактор с иммобилизованной ГО для исключения мешающего действия глюкозы. В этом случае амперометрически фиксировали пероксид водорода. Мешающее действие аскорбиновой кислоты полностью исключали использованием реактора с иммобилизованной аскорбатоксидазой. При анализе фруктозы фиксировали гексацианоферрат (II) калия. Характеристики воспроизводимости такой системы 1,6—1,8%.

Большое практическое значение имеет одна из последних разработок этого типа по определению свободного и общего холестерина (ХЛ) в сыворотке крови [106]. После ввода микропробы в поток носителя, содержащий фосфатный буферный раствор, $K_4[Fe(CN)_6]$ и тритон X-100, его разделяют на два потока, один из которых пропускают через колонку с иммобилизованной холестеролэстеразой, затем оба потока соединяют и снова пропускают через колонку с иммобилизованной холестеролоксидазой.

Амперометрический детектор с двумя поляризованными электродами регистрирует два пика: первый соответствует содержанию свободного ХЛ, а второй — общего ХЛ в пробе (c_n — $8 \cdot 10^{-7}$ и $3 \cdot 10^{-6}$ мМ соответственно)¹.

Кроме перечисленных проточно-инжекционных систем имеется еще целый ряд примеров использования ферментных электродов в непрерывном режиме. Так, для определения глюкозы в сыворотке крови и моче предложено использовать платиновый сетчатый электрод предварительно обработанный 3-аминопропилтриэтоксисилоном с иммобилизованной смесью ферментов: ГО и каталазы или ГО и пероксидазы с бычьим альбумином и глутаровым альдегидом [107]. При объеме пробы 5 мкл интервал линейности градуировочного графика составляет 20—800 мг/л (ГО — катализа), а при 1 мкл — 30—40 мг/л (ГО — пероксидаза).

Возможности применения датчиков на глюкозу, лактат, мочевину в системах с постоянным отбором крови для непрерывного экспрессного мониторинга *in vivo* метаболитов крови рассмотрены в работах [27, 28]. Авторы этих работ, по существу, поставили перед собой цель — создать на основе таких систем датчики, имплантируемые в организм пациента.

В проточных условиях при скорости потока 7 мл/мин для определения мочевой кислоты использовали ферментный электрод с иммобилизованной на пористом стекле уриказой [67]. С помощью данного устройства возможно анализировать до 100 образцов в час с точностью определения 2—4%. Фермент при этом сохраняет активность длительное время и лишь через 10 мес теряет 70% своей первоначальной характеристики.

¹ c_n — нижняя граница определяемых концентраций.

Проточные анализаторы на основе алкоголь-, лактат- и глутаматдегидрогеназ с регенерированием кофактора (НАДН), способные проводить многократные измерения, предложены в [108]. Фермент с иммобилизованным НАДН удерживают между платиновым электродом и полупроницаемой мембраной. НАДН регенерируют либо прямым электрохимическим путем, либо с помощью электрохимического окисления феназинметосульфата. Линейность градуировочного графика наблюдается до концентрации 1,5 мМ в случае лактата, до 0,5 мМ в случае глутамата и до 40 мМ для этанола. Схема проточного ферментного анализатора на основе дегидрогеназ приведена на рис. 4. Используют реактор на основе иммобилизованной ХЭ для непрерывного контроля воздуха и потока воды на

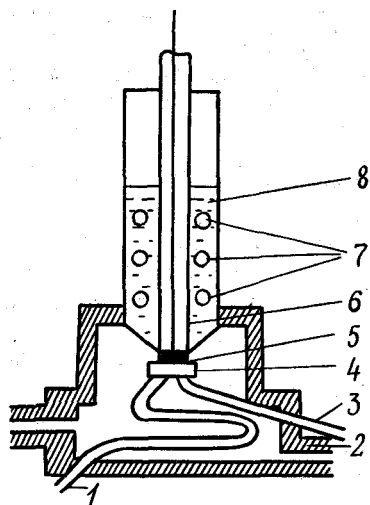


Рис. 4

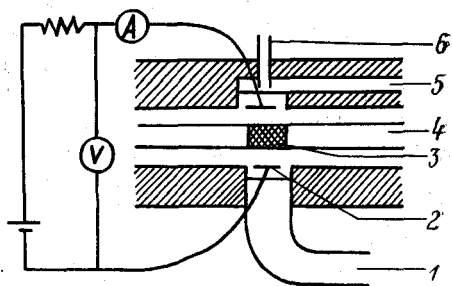


Рис. 5

Рис. 4. Схематическое изображение проточного ферментного электрода на основе дегидрогеназ: 1 — ввод для потока исследуемого раствора, 2 — теплообменник, 3 — вывод для продуктов ферментативной реакции и потока исследуемого вещества, 4 — микрокамера, 5 — полупроницаемая мембрана, 6 — платиновый электрод (диск), 7 — вспомогательный электрод, 8 — буферный раствор

Рис. 5. Схематическое изображение электрохимической ячейки с ферментным электродом на основе иммобилизованной холинэстеразы: 1 — вывод для продуктов ферментативной реакции, 2 — платиновый электрод, 3 — иммобилизованная холинэстераза, 4 — отделение (держатель) для иммобилизованной холинэстеразы, 5 — ввод для подачи потока воды или воздуха, 6 — ввод для подачи потока субстрата]

содержание ингибиторов ХЭ — инсектицидов на основе фосфорорганических соединений и карбаматов. Иммобилизуют ХЭ путем захвата в гель крахмала и закрепляют на поверхности сменного полиуретанового носителя, помещенного в электрохимическую ячейку (рис. 5) [99]. Теоретическое описание ингибиторного метода анализа с использованием проточной ферментативной системы, приобретающего в последнее время все большее значение в связи с необходимостью контролировать увеличивающееся число токсичных соединений, дано в [109].

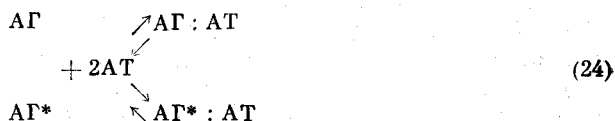
Один из последних вариантов реактора для проведения ферментативных реакций предложен в [43]. При этом ферментный препарат фиксируют на поверхности мешалки или на поверхности легко сменяемой неподвижной части, устанавливаемой внутри реактора.

IV. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ДАТЧИКИ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Способность антител высокоспецифически взаимодействовать с различными соединениями и способность ферментов ускорять химические превращения широко используется в иммуноэнзимологии [7]. В качестве альтернативы радиоиммунологическому анализу около 15 лет тому назад [110—112] применили ферменты-маркеры в количественном иммунологическом методе, получившем название иммуноферментный анализ (ИФА). Этот метод безопасен для здоровья, срок службы ферментов-маркеров составляет несколько лет. Он применим ко всем системам антиген-(гап-тен) — антитело (АГ — АТ) и чрезвычайно чувствителен. Иммуноферментный анализ дает возможность обнаруживать АГ, АТ и другие субстанции в биологических системах в ничтожно малых концентрациях 10^{-14} — 10^{-12} М [113—118]. Существует две разновидности ИФА: гетерогенный твердофазный и гомогенный. В гомогенном ИФА активность фермента-маркера изменяется в процессе иммунологической реакции. В этом случае необязателен этап физического разделения комплексов АГ — АТ, как это требуется в гетерогенном варианте. С помощью гомогенного варианта анализа можно определять только вещества с относительно низкой молекулярной массой, например лекарства и гормоны [113]. Более четкая классификация приемов ИФА дана в обзоре [117], она основана на том, что в любом варианте ИФА может измеряться ферментативная активность меченого соединения, находящегося или в специфическом иммунном комплексе или же в комплексе со свободными, не вступившими в реакцию центрами связывания. Большинство иммуноферментных тестов базируется на спектрофотометрическом и флуориметрическом методах определения ферментативной активности [117]. С практической точки зрения заслуживает внимания использование в ИФА электрохимических датчиков, сочетающих принципы действия аналитических систем на основе иммобилизованных ферментов и иммуноферментные методы анализа. Такие системы, получившие название иммуноферментных электродов, весьма перспективны благодаря возможности автоматизации иммуноферментных методов и создания компактных иммуноферментных анализаторов. Однако следует отметить, что понятие «иммуноферментный электрод», на наш взгляд, не всегда используют достаточно корректно. Так, в ряде работ [113—117] описываемые электроды не всегда содержат слой иммобилизованного фермента, поэтому правильнее было бы отнести этот способ к иммуноферментному анализу с амперометрической (вольтамперометрической) индикацией аналитического сигнала. Чаще всего такие системы содержат иммобилизованный АГ или АТ.

Описанный выше кислородный датчик одним из первых использовали в конкурентном твердофазном ИФА [118]. Капроновую сетку, содержащую иммобилизованное АТ против альбумина сыворотки человека (анти-АСЧ) или инсулин, закрепляли на поверхности кислородного электрода. В растворе, содержащем АСЧ или инсулин иммобилизованное АТ реагирует с АГ. Если к АСЧ или инсулину предварительно пришит фермент (каталаза к АСЧ и ГО к инсулину), то на капроновой сетке образуются комплексы анти-АСЧ·АСЧ-Е или антиинсулин·инсулин-Е, где Е — фермент. Когда в растворе наряду с мечеными молекулами АГ содержится АГ без ферментов, то образуются смешанные комплексы, количество фермента в которых будет тем выше, чем ниже концентрация немеченных АГ. В условиях, когда отклик кислородного электрода зависит от концентрации фермента, показания электрода пропорциональны концентрации АГ в растворе. Время отклика такой системы равно 2 мин. Общее время определения, включая регенерацию мембраны действием глицинового буферного раствора, составляет 10 мин. Иммобилизованное на капроновой сетке АТ сохраняет активность в течение нескольких дней.

Предложено использовать щелочную фосфатазу в качестве метки АГ α -глюкопротеиновую кислоту, фиксированную глутаровым альдегидом, и конкурентный способ ИФА, заключающийся в связывании избытка АГ и АГ меченного ферментом с ограниченным числом высокоспецифичных АТ [119]:



В условиях гетерогенного ИФА проводят разделение «связанных» и «свободных» меченных АГ и строят градуировочный график зависимости отношения «связанного» и «свободного» АГ от концентрации АГ (s_r составляет 0,03—0,05). В качестве электрохимического датчика используют угольный пастовый электрод. Гетерогенный вариант ИФА применен и для определения иммуноглобулина G [120]. В этом случае определение проводят непосредственно на поверхности стеклоуглеродного электрода, на котором адсорбированы АТ. Поверхность электрода при этом выполняет функцию иммунологической твердой фазы и собственно электрохимического детектора. Ферментом-маркером служит ГО с бензохиноном в качестве медиатора. Разработаны способы регенерации поверхности электрода после проведения определения, что имеет значение для осуществления автоматизации процедуры ИФА.

Ток, возникающий в электрохимической ячейке с сывороткой в качестве электролита и рабочим стеклоуглеродным дисковым электродом, покрытым иммобилизованным иммуноглобулином или антииммуноглобулином в комплексе с иммуноглобулином, растет с добавлением сыворотки, содержащей иммуноглобулин (система сыворотка—иммуноглобулин) или антииммуноглобулин (система сыворотка—иммуноглобулин—антииммуноглобулин) [121]. Полагают, что образующиеся комплексы изменяют строение двойного слоя, что и вызывает увеличение тока.

Для определения иммуноглобулина G предложен также проточный иммунореактор с платиновым электродом и скоростью потока 0,5 мл/мин. В этом случае иммуноглобулин иммобилизовали на носителе, а в качестве метки применяли ГО, которую закрепляли с помощью *n*-бензохинона. Анализатор работает стабильно почти 3 мес с ошибкой определения $\pm 3\%$ [122].

Амперометрический иммунодетектор, основанный на окислении глюкозы, иммобилизованной ГО с феррициниевым ионом, выполняющим роль медиатора и метки АГ одновременно, был использован для определения лекарства лидокаина ((α -диэтиламино)-2,6-диметилацетанилид), концентрацию которого в плазме, как известно, необходимо тщательно контролировать [123]. При этом в условиях гомогенного конкурентного ИФА комплекс АГ—феррициниевый ион играет роль электронного акцептора для ГО. Каталитический ток, возникающий при ферментативном окислении глюкозы, уменьшается при связывании комплекса АГ — ферроцен с АТ. Это ингибирование обратимо при добавлении свободного АГ. Время определения не превышает 15 мин ($s_r = 0,03—0,06$).

В другом случае, при изучении такого же иммунного комплекса (лидокаин—антилидокаин) в качестве метки АГ использовали глюкозу-6-фосфатдегидрогеназу, активность которой определяли по скорости окисления НАДН на платиновом электроде [124].

Авторами работы [125] разработан амперометрический датчик проточного типа для определения α -аспаргиназы. Ферментом-маркером служила пероксидаза хрена. Ее ферментативную активность оценивали с помощью угольного электрода и деполяризатора I_3^- . Величина s_n α -аспаргиназы в этом случае составляет $1,8 \cdot 10^{-10}$ М, что соответствует клинически значимым концентрациям фермента. Анализатор апробирован на широком

круге объектов: иммуноглобулине, α -амилазе, АТ к вирусу ВИЧ и вирусу-Х картофеля, яичном альбумине и клеточных суспензиях [126]. Результаты определения соответствуют данным спектрофотометрического анализа. Производительность датчика (более 350 проб в час) позволяет использовать его для оценки влияния биотехнических производств на окружающую среду и человека.

Аналитические возможности и преимущества проточно-инжекционного иммунологического анализа, заключающегося в инъецировании субстрата (10—20 мкл) в поток жидкости, протекающей через микрореактор с иммобилизованным ферментом, ковалентно связанным с АГ (АТ), рассмотрены в работах [127, 128].

Степень протекания иммунологической реакции оценивают, например, по току окисления продуктов ферментативной реакции на платиновом электроде [127]. В этих условиях c_n субстратов составляет 10^{-15} М. При надлежащей обработке иммуносорбента возможно выполнение 500—600 определений в течение почти 3 мес с высокими метрологическими характеристиками [128].

В проточно-инжекционном варианте использовали и анализатор на основе ГО, иммобилизованной на гелевой подложке в результате иммунологической реакции [129]. Такая косвенная (непрямая) иммобилизация позволяет легко заменить носитель и легко регенерировать систему после определения с потерей первоначальной активности лишь на 5%. Вся процедура занимает менее часа. Обратимая иммобилизация фермента достигается различной последовательностью реакций, включающих взаимодействия АГ—АТ [129]. Интервалы прямой зависимости градиентных графиков составляют $1,1 \cdot 10^{-9}$ — $1,1 \cdot 10^{-5}$ и $1,1 \cdot 10^{-10}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ М. В таких устройствах объединены сразу 3 принципа: ферментный электрод, проточная система и иммунологическая реакция.

Во всех рассмотренных вариантах ИФА фермент используется как метка АГ или АТ, перераспределение которой между твердой и жидкой фазами зависит от концентрации исследуемого соединения. В настоящее время разрабатываются новые системы ИФА, основанные на том, что появление фермента в растворе является следствием специфического взаимодействия АГ—АТ [130]. Один из путей создания таких систем — заключение фермента внутрь липосом, на поверхности которых химически присоединен АГ. Добавление в систему АТ и раствора, содержащего комплемент (комплекс ферментов), приводит к образованию комплекса АГ—АТ на липосоме и лизису ее из-за действия комплемента, связавшего с фрагментами АТ. Лизис сопровождается переходом фермента в раствор. Добавление в систему определяемого АГ ингибирует процесс лизиса, вследствие присоединения к липосоме меньшего количества молекул АТ и комплемента. Скорость появления в растворе ферментативной активности служит характеристикой начальной концентрации АГ [131]. Время анализа теофилина (липосомы с пероксидазой) составляет 15 мин, чувствительность $4 \cdot 10^{-9}$ М при электрохимической регистрации пероксидазной активности окисления НАДН [132]. Кроме ферментов в липосомах могут быть включены частицы электроактивного маркера (ионов, субстратов).

Основные данные, характеризующие свойства и устройство описанных выше иммуноферментных электродов приведены в табл. 2. Следует отметить, что химическое усиление сигнала, имеющее место при действии ферментов, может быть использовано также и для определения гормонов, некоторых лекарств, нейромедиаторов, циклических нуклеотидов, и других биологически важных соединений, концентрация которых в организме меньше 10^{-6} М [131]. Этим, а также другим вопросам использования иммуноферментных сенсоров посвящен также ряд обзоров [20, 21, 25, 26, 114, 119, 133, 134].

Характеристики иммуноферментных электродов

Определяемое вещество	Используемые соединения		Способ иммобилизации	Электрохимический датчик	Интервал определяемых концентраций	Ссылки
	АГ (АТ)	Фермент (метка)				
Альбумин сыворотки человека (АСЧ) инсулин	АТ (анти-АСЧ), антиинсулин	Каталаза для АСЧ, глюкозооксидаза для инсулина	АТ на капроновой сетке	Мембранный кислородный электрод	Менее 10^{-8} М АСЧ; менее 10^{-6} М инсулина	[118]
α -Глюкопротеиновая кислота	АГ	Щелочная фосфатаза	Обработка глутаровым альдегидом	Угольный пастовый электрод	1,0—10,0 нг/мл	[119]
Иммуноглобулин G кролика	Антииммуноглобулин G	Глюкозооксидаза — метка АГ	АТ адсорбированы на поверхности стеклоглеродного электрода	Стеклоуглеродный электрод	$4 \cdot 10^{-18}$ моль/см ² электродной поверхности	[120]
Иммуноглобулин G	»	Глюкозооксидаза — метка АГ (закрепляли с помощью л-бензохинона)	Иммобилизация на носителе	Платиновый электрод в проточном иммунореакторе	—	[122]
Лидокаин	Антилидокаин	Глюкозооксидаза с феррициниевым ионом — метка и медиатор АГ одновременно	Ковалентная прививка к носителю	Золотой дисковый электрод — рабочий, платиновый газовый — противоэлектрод	5—50 мМ	[123]
α -Аспаргиназа	Антиаспаргиназа	Пероксидаза хрена — метка АГ	Иммобилизация АТ против аспаргиназы в лунках полистирольных плат	Графитовый электрод в проточном анализаторе	$1 \cdot 10^{-11}$ — $4 \cdot 10^{-10}$ М	[125]

В заключение следует отметить, что обсуждаемая проблема весьма актуальна. В настоящее время существует большое количество устройств (биосенсоров) различных конструкций с амперометрической индикацией аналитического сигнала на основе иммобилизованных ферментов. Во многих случаях для одних тех же целей создаются как потенциометрические, так и амперометрические ферментные датчики, причем последние находят все более широкое распространение, поскольку обладают обычно большим диапазоном линейности аналитического сигнала и более низким нижним пределом определяемых концентраций. Кроме того, в амперометрическом варианте биосенсора, в отличие от его потенциометрического аналога, возможно осуществить иммобилизацию фермента непосредственно на электропроводной поверхности за счет его включения в полимерную пленку, которую можно сформировать в ходе электрополимеризации.

Предлагаемый обзор о состоянии проблемы амперометрических биосенсоров, естественно далеко не исчерпывает всю литературу, опубликованную к настоящему времени. Нет необходимости проводить в нем сопоставление преимуществ и недостатков того или иного биосенсора, поскольку каждый биосенсор создается обычно для решения какой-то практической задачи, работает обычно в определенных условиях, применяем чаще всего, для определения конкретных соединений в конкретной среде. С большой уверенностью можно сказать, что детекторы с иммобилизованными ферментами в своем разнообразии дополняют друг друга. И только практика позволит дать ответ на вопрос — какой биосенсор лучше или хуже в каждом отдельном случае в зависимости от условий работы и природы объекта анализа.

Потребности в рассмотренных биосенсорах быстро и непрерывно растут, возрастают требования к потребительским свойствам. Дальнейшее развитие теоретических и практических аспектов их применения связано с расширением ассортимента промышленно выпускаемых ферментов и совершенствованием способов их иммобилизации, увеличением чувствительности и стабильности самих электрохимических датчиков и совершенствованием материалов, используемых для их изготовления — здесь большая роль будет принадлежать различным модификациям электропроводной поверхности [135—136].

Высказывается мнение, что биосенсоры — будущее аналитической химии и настоящая революция в этой области науки ожидается через некоторое время. Одной из причин такой оценки, видимо, является наукоемкость исследований по биосенсорам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И. В. Березина и др. М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 1. 296 с.
2. Мартинек К., Березин И. В. // Успехи химии. 1980. Т. 49. С. 737.
3. Березин И. В., Клячко П. Л., Левашов А. В. и др. // Иммобилизованные ферменты. М.: Высш. шк. 1987. 159 с.
4. Маркони В. // Успехи химии. 1976. Т. 45. С. 2077.
5. Conlon N. D., Walt D. R. // J. Chem. Educ. 1986. V. 63. P. 368.
6. Schellenberger A., Ulbrich R. // Z. Chem. 1985. V. 25. P. 349.
7. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинек. М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 2. 358 с.
8. Лахминарайнайак Н. Мембранные электроды. Л.: Химия, 1979. 324 с.
9. Кулис Ю. Ю. // Новые направления биотехнологии. Тех. докл. Пущино, 1988, С. 112.
10. Кулис Ю. Ю. // Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Мокслас, 1981. 200 с.
11. Хаваш Е. // Ионно- и молекулярно-селективные электроды в биологических системах. М.: Мир, 1988. С. 173.
12. Updike S. J., Hicks G. P. // Nature. 1967. V. 214. P. 986.
13. Proceedings of the Symposium on Biosensors, Los Angeles, 1984 / Eds. A. R. Potvin, M. R. Neuman. N. Y.: IEEE, 1984. 118 p.

14. Будников Г. К. // Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41. С. 1733.■
15. Разумас В. И. Биокатализ в электрохимии органических соединений. Вильнюс: Моклас, 1981. 168 с.
16. Kessler M., Clark L. C., Lubbers D. W. et al. // Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine. Munchen; Berlin; Wien: Urban and Schwarzenberg, 1976. 412 S.
17. Богдановская В. А., Тарасевич М. Р. // Электрохимия. Т. 27. М.: Изд-во ВИНТИ, 1984. С. 111.
18. Fishman M. M. // Anal. Chem. 1980. V. 52. P. 185R.
19. Davis J., Solsky R., Giering L., Malhotra S. // Ibid. 1983. V. 55. P. 202R.
20. Guilbault G. G. // Anal. Proc. 1983. V. 20. P. 550.
21. Разумас В. И., Ясайтис Ю. Ю., Кулис Ю. Ю. Амперометрические ферментные электроды на основе углеродистых материалов. Вильнюс, 1984. 45 с.— Деп. в ВИНТИ 23.03.84, № 1609-84.
22. Alberly W. J., Bartlett P. M., Cass A.E.G. et al. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1986. Pt 1. V. 82. P. 1033.
23. Koryta J. // Electrochim. Acta. 1986. V. 31. P. 515.
24. Bowers L. D. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 513A.
25. McCann J. // Lab. Pract. 1987. V. 36. P. 17, 20.
26. Mottola H. A. // Analyst. 1987. V. 112. P. 719.
27. Frew J. E., Hill H. A. O. // Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 933A.
28. Janata J., Bezegh A. // Ibid. 1987. V. 60. P. 62R.
29. Johnson D. S., Ryan M. D., Wilson G. S. // Ibid. 1988. V. 60. P. 147R.
30. Сорочинский В. В., Курганов Б. И. // Биотехнология. Т. 13. М.: Изд-во ВИНТИ, 1984. 207 с.
31. Имобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Дж. Вудворда М.: Мир, 1988. 216 с.
32. Триев М. Имобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. 213 с.
33. Vadgama P. // Trends Anal. Chem. 1984. V. 1. P. 13.
34. Chemical Sensors. Proc. Int. Meet. Fukuoka / Eds. T. Seiyamo et al. Tokyo ets.: Elsevier, 1983. 775 p. (Anal. Chem. Symp. Ser. V. 17); РЖХим. 1984. 2Г191.
35. Proc. VIII Inter. Symp. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Bioelectrochem. and Bioenerg. 1986. V. 16. P. 243, РЖХим. 1987, 10Б3249.
36. Ibid.; РЖХим. 1987, 11Б3346.
37. Zinko M. // Eur. Brewery Conv. Proc. XX Congr., Helsinki, 1985. Oxford, 1985. P. 39. РЖХим. 1987. 8Р427.
38. Senda M. // Anal. Sci. 1986. V. 2. P. 499.
39. Bioelectroanalysis 1: I Symp., Matrafured, 6—8 Oct., 1986 / Ed. E. Pungor. Budapest: Akad. Kiado, 1987. 434 p.; РЖХим. 1988, 2Г1.
40. Hulley B. // Meas. Contr. 1988. V. 21. P. 44—47.
41. Новые направления биотехнологии: Тез. докл. Пушино, 1988. 138 с.
42. Сорочинский В. В., Курганов Б. И. // Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41. С. 2055—2063.
43. Cerkasov L., Linek V. A. с. 238261 ЧССР // РЖХим. 1988, 6Р404П.
44. Березин И. В. // Прикл. биохимия и микробиология 1982. Т. 48. С. 451.
45. Turner A. P. F., Pickup J. C. // Biosensors. 1985. V. 1. P. 85.
46. Черепанов Д. С. // Электрокатализ и электрокаталитические процессы. Киев: Наук. думка, 1986. С. 103.
47. Shu F. R., Wilson G. S. // Anal. Chem. 1976. V. 48. P. 1679.
48. Кулис Ю. Ю., Ралис Э. В. // Получение и применение иммобилизованных ферментов: Тез. докл. Абовян, 1977. С. 111.
49. Mor J. R., Guarnaccia T. // Anal. Biochem. 1977. V. 79. P. 319.
50. Александровский Я. А., Агасян П. К., Егоров А. М. и др. // Журн. аналит. химии. 1978. Т. 33. С. 1833.
51. Ралис Э. В. Автореф. ... канд. хим. наук. М., 1981.
52. Vincke B. J., Kauffmann J.-M., Devleeschouwer M. J., Patriarche G. J. // Analusis. 1984. V. 12. P. 141.
53. Gass A. E. G., Davic G., Francis G. D. et al. // Anal. Chem. 1984. V. 56. P. 667.
54. Durliat H., Comtat M. // Ibid. 1984. V. 56. P. 148.
55. Bardeletti G., Coulet P. R. // Ibid. 1984. V. 56. P. 591.
56. Ho M. H., Wu T. G. // ISA Trans. 1985. V. 24. P. 61.
57. Umana M., Waller J. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 2979.
58. Bartlett P. N., Whitaker R. G. // J. Electroanal. Chem. 1987. V. 224. P. 37.
59. Narasimhan K., Wingard L. B. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 2984.
60. Jonsson G., Gorton L. // Anal. Lett. 1987. V. 20. P. 839.
61. Tse P. H. S., Gough D. A. // Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 2339.
62. Senda M., Ikeda T., Mizai K., Hiasa H. // Anal. Sci. 1986. V. 2. P. 501.
63. Senda M., Ikeda T., Hiasa H., Katasho I. // J. Chem. Soc. Jap. Chem. and Ind. Chem. 1987. P. 358; РЖХим. 1987, 23Б3322.
64. Steruberg R., Bindra D. S., Wilson G. S. et al. // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2781.

65. Bartlett P. N., Whitaker R. M., Green M. L., Freu J. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. P. 1603.
66. Najo M., Guibault G. G. // Anal. Chem. 1974. V. 46. P. 1769.
67. Iob A., Mottola H. A. // Ibid. 1980. V. 52. P. 2332.
68. Кулис Ю. Ю., Виджюнайте Р. А. // Журн. аналит. химии. 1983. Т. 38. С. 484.
69. Satoh I., Karube I., Suzuki S. // Biotechnol. Bioeng. 1977. V. 19. P. 1095.
70. Wollenberger U., Kuhn M., Scheller F. et al. // Bioelectrochem. and Bioenerg. 1983. V. 11. P. 307.
71. Weigelt D., Schubert F., Scheller F. // Analyst. 1987. V. 112. P. 1155.
72. Кулис Ю. Ю., Шварцман Г.-Ю. С. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. С. 137.
73. Taylor P. J., Kmetec E., Johnson J. M. // Anal. Chem. 1977. V. 49. P. 789.
74. Macholan L., Schanel L. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1977. V. 42. P. 3667.
75. Assolant-Vinet C. H., Bardeletti G., Coulet P. R. // Anal. Lett. 1987. V. 20. P. 513.
76. Mascini M., Mazzei F. // Anal. Chim. Acta. 1987. V. 192. P. 9.
77. Mohammad A. N. K., Guibault G. G., Oliveira G., Neto D. // Ibid. 1986. V. 191. P. 219.
78. Кузнецова О. Г., Зытнер Я. Д., Тихонова Л. С. и др. // Электрохимия. 1988. Т. 24. С. 107.
79. Mascini M., Moscone P. // Anal. Chim. Acta. 1986. V. 179. P. 439.
80. Будников Г. К., Медянцева Э. П., Волков А. В., Аронзон С. С. // Журн. аналит. химии. 1983. Т. 38. С. 1283.
81. Будников Г. К., Медянцева Э. П., Улахович Н. А., Бабкина С. С. А. с. 1296913 СССР // Б. И. 1987. № 10. С. 182.
82. Будников Г. К., Медянцева Э. П., Бабкина С. С. // Проблемы разработки и эксплуатации систем и средств контроля загрязнений окружающей среды: Тез. докл. Казань, 1989. С. 83.
83. Сурвилене С. П. // Электрохимия. 1985. Т. 21. С. 435.
84. McKenna K., Brajter-Toth A. F. // Abstr. Pap. Pittsburg Conf. and Expo. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., Atlantic City, N. Y., March 9-13, 1987. Pittsburgh, 1987. 440 p.; РЖХим. 1988. 19Б3307.
85. Machdan K., Chmelikova B. // Anal. Chim. acta. 1986. V. 185. P. 187.
86. Wang J., Lin M. S. // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 1545.
87. Takagi M., Kojima J., Morita N. // Anal. Sci. 1988. V. 4. P. 361.
88. Campanella L., Tomassetiti M., Sanmartino M. P. // Analyst. 1988. V. 113. P. 77-80.
89. Кулис Ю. Ю., Лауринавичюс В.-С. А., Послякене М. В., Островский Ю. М. А. с. 1326978 СССР // Б. И. 1987. № 28.
90. Кулис Ю. Ю., Послякене М. В., Лауринавичюс В.-С. А. и др. // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. С. 2077.
91. Mizutani F., Shimura Y., Tsuda K. // Chem. Lett. 1984. P. 199.
92. Накай С., Накамура К., Иидзима Т. Пат. 58-17427 Япония // РЖХим. 1984, 21Г99П.
93. Wu H., Zhon S. // J. Xiamen Univ. Nat. Sci. 1987. V. 26. P. 81; РЖХим. 1987. 23Б3319.
94. Schulmeister T. // Anal. Chim. Acta. 1987. V. 198. P. 223.
95. Eddowes M. J., Hill H. A. О. Заявка 2105750 Великобритания // РЖХим. 1984. 1Л298П.
96. Йода К., Уракабэ Р., Тода Х. Пат. 59-21500 Япония // РЖХим. 1985. 4Г67.
97. Островидова Г. У., Чечош М. И., Алесковский В. Б. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 1987. Т. 30. С. 48.
98. Kunugi S. // J. Soc. Fiber Sci. and Technol. Jap. 1985. V. 41. P. 205; РЖХим. 1986. 14С187.
99. Gray D. N., Keyes M. N., Watson B. // Anal. Chem. 1977. V. 49. P. 1067A.
100. Rus J., Lazaro F., Luque de Castro M. D. // J. Autom. Chem. 1988. V. 10. P. 15.
101. Olsson B., Lundback, Johansson G. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 1046.
102. Moody G. J., Sanghera G. S., Thomas J. D. P. // Anal. Proc. 1986. V. 23. P. 446.
103. Wieck H. J., Heider G. N. Jn., Yacynych A. M. // Anal. Chim. acta. 1984. V. 158. P. 137.
104. Wade A. P., Crouck S. R. // Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 2245.
105. Matsumoto K., Kanukado H., Matsubara H., Osajima Y. // Ibid. 1988. V. 60. P. 147.
106. Yao T., Wasa T. // Anal. Chim. acta. 1988. V. 207. P. 319.
107. Yao T., Nakanishi K., Wasa T. // Бунсэки кагаку. 1984. Т. 33. С. 213; РЖХим. 1984, 19Г316.
108. Кулис Ю. Ю., Малинаускас А. А. // Журн. аналит. химии. 1979. Т. 34. С. 876.
109. Гладышев П. П., Мамлеев В. Ш., Козлов В. А., Шаповалов А. Ю. Проточный ферментативный анализ токсичных соединений. 2 сообщ. Алма-Ата, 1983. 8с. — Деп. в ВИНТИ 22.12.83.1867-84, 1866-84.
110. Чард Т. // Радиоммунологические методы. М.: Мир, 1981. 246 с.
111. Engvall E., Perlmann P. // Immunochemistry. 1971. V. 8. P. 871.
112. Van Weenen B. K., Schuur A. H. // FEBS Lett. 1971. V. 15. P. 232.

113. Иеницкий Д. М. // Журн. аналит. химии. 1987. Т. 42. С. 204.
114. Методы иммуноферментного анализа] в биологии и медицине. М.: Изд-во ВНИИВС им. Мечникова, 1983. 178 с.
115. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхоффа, М.: Мир, 1988. 446 с.
116. Blake C., Gould B. J. // Analyst. 1984. V. 109. P. 533.
117. Дзантиев Б. Б., Осипов А. П. // Биотехнология. Т. 3. М.: Изд-во ВИНТИ, 1987. 172 с. (Итоги науки и техники).
118. Mattiasson B., Nilsson H. // FEBS Lett. 1977. V. 78. P. 251.
119. Doyle M. J., Halsall H. B., Heineman W. R. // Anal. Chem. 1985. V. 56. P. 2355.
120. Gyss C., Bourdillon C. // Ibid. 1987. V. 59. P. 2350.
121. Hertl W. // Bioelectrochem. and Bioenerg. 1987. V. 17. P. 89.
122. De Alwis W. U., Wilson G. S. // Anal. Chem. 1985. V. 57. P. 2754.
123. Di Gleria K., Hill H. A. O., McNeil C. J. // Ibid. 1986. V. 58. P. 1203.
124. Broyles C. A., Rechnitz G. A. // Ibid. 1986. V. 58. P. 1241.
125. Иеницкий Д. М., Юлаев М. Ф., Аронбаев Д. М. и др. // Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41. С. 55.
126. Ситдыков Р. А., Аскаров К. А., Иеницкий Д. М. и др. // Всесоюз. симп.: Биотехнология и хим. методы охраны окр. среды. Тез. докл. Самарканд, 1988. Ч. 2. С. 54.
127. De Alwis W. U., Wilson G. S. // Abstr. Pap. Pittsburgh Conf. and Expo Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., Atlantic City, N. Y., March 10—14, 1986. S. L., s. a., 1971; РЖХим. 1987., 2Г34.
128. De Alwis W. U., Wilson G. S. // Abstr. Pap. Pittsburgh Conf. and Expo. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., Atlantic City, N. Y., March 9—13, 1987. Pittsburgh, 1987. P. 677; РЖХим. 1988, 4Г2.
129. De Alwis W. U., Hill B. S., Meiklejohn B. I., Wilson G. S. // Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 2688—2691.
130. Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. 27. С. 82.
131. Szaban J. D. // Anal. Chem. 1985. V. 57. P. 345A.
132. Haga M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. P. 187.
133. Heineman W. R., Halsall H. B. // Anal. Chem. 1985. V. 57. P. 1321A.
134. Lunte C. H., Halsall H. B., Heinemann W. R. // Lab. Management. 1986. P. 51.
135. Боровков В. С., Богдановская В. А., Луковцева Н. В. и др. // Химические сенсоры — 89: Тез. докл. Ленинград, 1989. С. 244.
136. Тарасевич М. Р., Хорозова Е. Г., Богдановская В. А. и др. // Там же. 1989. С. 245.

Казанский государственный
университет им. В. И. Ульянова-Ленина