

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЖИБАК МИХАЙЛО ТАРАСОВИЧ

УДК 577.15+543.06+543.55+573.6

ДИСЕРТАЦІЯ
**РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНИХ НАНОКОМПОЗИТНИХ
БІО/ХЕМОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТАБОЛІТІВ У БІОЛОГІЧНИХ
РІДИНАХ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Жибак М.Т.

Науковий керівник: Корпан Ярослав Ізидорович, кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Жибак М.Т. Розробка амперометричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена розробці амперометричних нанокompозитних біо/хемосенсорів на основі комерційних друкованих електродів, високочутливих електронанесених композитів та іммобілізованих ферментів для високоточного визначення концентрацій клінічно важливих низькомолекулярних метаболітів (іонів амонію, холіну, L-аргініну, креатиніну та сечовини) у біологічних рідинах.

У роботі представлено результати розробки біосенсорів для визначення холіну на основі іммобілізованої холіноксидази (ХОД) на золотих друкованих електродах (ЗЕ). В ході роботи було застосовано два різні підходи щодо іммобілізації ХОД: А) використання амінованих багат шарових вуглецевих нанотрубок (БШВНТ-NH₂) як структурного елемента БСА-ХОД мембрани; Б) іммобілізація ХОД у силікатній плівці за допомогою електрохімічного нанесення (ЕХН). Досліджено ефективність методів іммобілізації ХОД та визначено основні аналітичні параметри біосенсорів (чутливість, лінійний діапазон, мінімальна межа визначення (ММВ), операційна стабільність та стабільність при зберіганні).

Так, чутливість БСА-ХОД-БШНТ-NH₂/ЗЕ складала 523,71 А·М⁻¹·м⁻², ММВ становила 5 мкМ, а лінійний діапазон – від 0,03 до 0,5 мМ, операційна стабільність складала 100 вимірювань. Мембрани, що містили БШВНТ-NH₂, зберігали стабільність впродовж 2 тижнів. Вперше показано, що застосування БШВНТ-NH₂ як структурного елемента біоселективної БСА-ХОД мембрани сприяє суттєвому підвищенню її стабільності, імовірно за рахунок підвищення кількості ковалентних

зв'язків в мембрані ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) та зменшенню набрякання мембран в буфері, що перешкоджає вимиванню ферменту в процесі зберігання.

Чутливість $\text{SiO}_2\text{-ХОД/ЗЕ}$ становила $480 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^2$, калібрувальна крива була лінійною в діапазоні концентрацій холіну від 0,02 до 0,6 мМ, ММВ становила 6 мкМ, чого є цілком достатньо для вимірювання вмісту холіну у зразках їжі та крові. Встановлено, що додавання 12% ЦТАБ (катионної поверхнево активної речовини) у склад золь-гелю підвищує стабільність біосенсора при зберіганні від кількох годин до 3 днів. Встановлено, що попередня обробка зразків для вимірювання 11 мМ MnO_2 протягом 15 хвилин повністю нейтралізує вплив аскорбінової кислоти. При цьому, не зафіксовано впливу на ХОД і результати визначення холіну. За допомогою створених біосенсорів було проведено вимірювання концентрації холіну у зразках дитячого харчування. Дані, отримані за допомогою біосенсорів, добре корелювали із даними виробника та результатами спектрофотометричного аналізу.

Вперше описано розробку високочутливого, селективного та стабільного амперометричного моно-ферментного сенсора для визначення L-аргініну. В ході даної розробки було використано амоній-чутливий шар поліаніліну (ПАНі), електрополімеризований на вкритий нафіоном платиновий друкований електрод (ПЕ). Далі, рекомбінантну аргініндеїміназу (АДІ), виділену із *Mycoplasma hominis*, було осаджено на поверхню ПАНі/Нафіон/ПЕ з наступним формуванням біорозпізнавальної мембрани під дією поперечного зшивання у насичених випарах ГА. Внаслідок ферментативного гідролізу аргініну утворюються іони амонію, які в свою чергу дифундують у шар Нафіон/ПАНі і провокують електровідновлення ПАНі за потенціалу -0,35 В (проти Ag/AgCl). В ході електрохімічних експериментів було вставлено основні аналітичні параметри біосенсора: $K_M^{\text{поз}}$ (0.31 ± 0.05 мМ L-Арг), лінійний діапазон (від 0,003 до 0,2 мМ L-Арг), чутливість ($684\pm 32 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^2$), ММВ (0,001 мМ). Створений біосенсор відзначається швидким відгуком на внесення L-Арг (15 с). Стабільність біосенсора при зберіганні становила 35 діб, операційна стабільність – 100 вимірювань. За допомогою створеного біосенсора проаналізовано L-Арг-вмісний препарат “Аміноплазмаль 10% Е” та зразки плазми

крові здорових людей, а також пацієнтів, що страждають на захворювання печінки. Отримані результати чітко свідчать, що даний біосенсор може бути використаний для швидкого і ефективного визначення L-Арг в простих і складних багатокомпонентних розчинах.

Вперше описано розробку лабораторного прототипу високочутливого до іонів амонію сенсора на основі нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu з використанням технології пошарового електроосадження. Згідно запропонованої концепції, іони амонію дифундують з розчину, в якому ведеться вимірювання, в нанокompозит ПАНі/Нафіон/Cu, внаслідок чого відбувається формування амонійних комплексів Cu (I). З іншого боку амонійні сполуки Cu (I) проявляють каталітичну дію щодо реакції відновлення кисню при значенні потенціалу $-0,45$ В проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Розроблено оптимальну технологію модифікації вуглецевих електродів (ВЕ) наночастинками міді та ПАНі та встановлено, що композит ПАНі/Нафіон/Cu володіє значно вищою чутливістю до іонів амонію ($2500 \pm 100 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) ніж ПАНі ($59,5 \pm 8 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) або електроосаджена мідь ($184 \pm 14 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) окремо на поверхні ВЕ, що свідчить про вагомий роль всіх компонентів у електрокаталітичному процесі. Вперше виявлено, що реакція відновлення кисню є частиною механізму електрохімічного відгуку. На основі даних амперометрії визначено основні аналітичні параметри хемосенсора: лінійний діапазон ($0,001 - 0,15$ мМ), динамічний діапазон ($0,001 - 1$ мМ), ММВ ($0,5$ мкМ). Хемосенсор зберігав стабільність (операційну і під час зберігання) більше 1 року.

Проведено контрольні дослідження на чутливість даного нанокompозиту до можливих інтерферентів в сироватці крові людини: білків, креатиніну, сечовини та їх сумішей. Встановлено, що їх присутність на роботу сенсора не впливає. Виготовлений амоній-чутливий сенсор використано для визначення NH_4^+ в зразках сироватки крові, отриманих від здорових людей та пацієнтів, що страждають на захворювання печінки та нирок. Результати, отримані за допомогою хемосенсора, добре корелювали із результатами стандартного методу.

Вперше описано результати розробки біосенсорів для визначення креатиніну та сечовини на основі композиту ПАНі/Нафіон/Cu та іммобілізованих гідролізуючих ферментів креатиніндеїмінази (КДІ) та уреазі. На основі даних, отриманих в ході вольтаметрії та амперометричного визначення креатиніну/сечовини, були розраховані основні аналітичні характеристики сенсорів: лінійний діапазон (1 – 125 мкМ), чутливість ($850 \pm 34 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ і $1120 \pm 33.6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ для біосенсора для визначення креатиніну і сечовини, відповідно), ММВ для обох біосенсорів становила 0,5 мкМ.

Для тестів у реальних біологічних рідинах було використано зразки сироватки крові пацієнтів, що страждають на хронічну хворобу нирок. Отримані за допомогою біосенсорів результати добре корелювали із результатами стандартних ферментних спектрофотометричних методів визначення креатиніну і сечовини.

Ключові слова: амперометричні біосенсори, іммобілізовані ферменти, нанокompозити, поліанілін, холіноксидаза, рекомбінантна аргініндеїміназа, уреазі, креатиніндеїміназа, іони амонію.

Список публікацій здобувача

1. Белоиван О.А., Дуда Т.И., Васильев А.А, Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Шкотова Л.В., **Жибак М.Т.**, Бойчук Ю.В., Бардаков Б.В., Корпан Я.И. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в биосенсорной технологии // Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине / Редкол.: А.Г. Наумовец (глав. ред.); НАН Украины. – К.: Академперіодика, 2014. – 768 с., – ISBN 978-966-360-260-8. – С. 541-545.

2. Mazurenko E., Tananaiko O., Biloivan O., **Zhybak M.**, Pelyak I., Zaitsev V., Etienne M., Walcarius A. Amperometric biosensor for choline based on gold screen-printed electrode modified with electrochemically-deposited silica biocomposite // *Electroanalysis*. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 1685-1692.

3. **Zhybak M.T.**, Vagin M.Y., Beni V., Liu X., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode // *Microchimica Acta*. – 2016. – Vol. 183, № 6. – P. 1981-1987.
4. **Zhybak M.T.**, Beni V., Vagin M.Y., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 505-511.
5. **Zhybak M.T.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184, № 8. – P. 2679–2686.
6. Biloivan O., **Zhybak M.**, Boychuk Y., Vasil'ev O., Duda T., Muratov V., Korpan Y. Carbon nanomaterial based three-dimensional enzyme membranes for amperometric sensors // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 12.
7. **Zhybak M.**, Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copper-plate/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 23.
8. **Zhybak M.**, Dempsey E., Korpan Y.I. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copperplated/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 29, Special issue. – 2013. – P. 28.
9. **Zhybak M.**, Beni V., Turner A., Korpan Y. Ammonium ion selective copper/polyaniline-based nanocomposite for creatinine and urea biosensing // Materials of VIII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 30, Special issue. – 2014. – P. 23.

10. **Zhybak M.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M., Sibirny A., Dempsey E., Korpan Y. Novel L-arginine-selective amperometric sensor based on recombinant arginine deiminase and platinum screen-printed electrodes // Book of Abstracts “MADICA 2014”. – Mahdia, Tunisia, 5-7 November, 2014. – P. B23.

SUMMARY

Zhybak M.T. The development of the amperometric nanocomposite-based bio-/chemosensors for the detection of low molecular weight metabolites in biological liquids. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality – 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

The PhD thesis is dedicated to the research and development of the amperometric nanocomposite-based bio-/chemosensors for the detection of clinically important low molecular weight metabolites in biological samples. The laboratory prototypes of the biosensors for the detection of choline, ammonium ions, L-arginine, creatinine, urea have been developed using commercial screen-printed electrodes, highly sensitive electro-deposited nanocomposites, and immobilized enzymes.

The choline biosensors were developed using two different strategies: i) usage of the NH₂-modified carbon nanotubes (MWCNT-NH₂) as a structural element of the choline oxidase (ChOx) membrane; ii) electrochemically assisted sol-gel deposition (ECD) of the ChOx on gold screen-printed electrodes. In the first case, it was estimated that existence of the MWCNT-NH₂ 2% (v/v) in the ChOx membrane enhanced greatly the stability of the enzyme, due to increasing number of covalent bonds (NH₂-NH₂) and decreasing of the soaking of the membrane in the buffer. The biosensors retained catalytic activity to choline without decreasing in amperometric response for over 2 weeks with the sensitivity of 523,71 A·M⁻¹·m⁻², linear range (LR) from 0.03 to 0.5 mM, limit of detection (LOD) of 5 μM.

In the second case, using ECD, it was established that the addition of 12 mM of cationic surfactant CTAB in silica sol allowed enhancing the stability of the sensor. The modified electrode demonstrated catalytic activity and stable amperometric response to choline for over 3 weeks of exploitation with the sensitivity of 480 A·M⁻¹·m⁻², LR from 0.02 to 0.6 mM, and LOD of 6 μM. The interference of ascorbic acid was reduced by

pretreating the analyzed solution with MnO_2 powder. The application of the sensor with the purpose of identifying choline in the baby milk demonstrated satisfactory metrological characteristics.

An amperometric biosensor for the amino acid L-arginine (L-Arg) has been fabricated. It is based on the use of a Nafion/Polyaniline (PANi) composite on a platinum screen-printed electrode (Pt-SPE) using a novel recombinant arginine deiminase isolated from *Mycoplasma hominis*. The protein was over-expressed, purified and employed as a biorecognition element of the sensor. Enzymatic hydrolysis of L-Arg leads to the formation of ammonium ions which diffuse into the Nafion/PANi layer and induce the electroreduction of PANi at a potential of -0.35 V (vs Ag/AgCl). L-Arg sensitivity is $684 \pm 32 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, and the apparent Michaelis-Menten constant (K_M^{app}) is 0.31 ± 0.05 mM. The calibration plot is linear over the range $3\text{--}200$ μM L-Arg, the LOD is 1 μM , and the response time (for 90% of the total signal change to occur) is 15 s. The sensor is selective and exhibits good storage stability over 1 month without loss in signal. The biosensor was applied to the analysis of L-Arg in pharmaceutical samples and of ammonium and L-Arg in spiked human plasma. Data generated were found to be in good agreement with a reference fluorometric enzymatic assay.

A novel composite material for use in electrochemical oxygen reduction is described. A carbon SPE was consecutively modified with electrodeposited copper, a Nafion membrane and electropolymerized PANi to give an electrocatalytic composite of type PANi/Nafion/ Cu_2O /SPE. It is found that the presence of ammonia causes complex formation with Cu(I), and this causes electroreduction of oxygen to result in an increased cathodic current. The finding was applied to the quantification of ammonium ions in the 1 to 1000 μM concentration range by amperometry at -0.45 V (vs. Ag/AgCl). This Faradaic phenomenon offers the advantage of direct voltammetric detection, one of the lowest known limits of detection (0.5 μM), and high sensitivity ($2500 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). It was applied to the determination of ammonium ion in human serum where it compared well with the photometric routine approach for clinical analysis using glutamate dehydrogenase.

The use of a novel ammonium ion-specific copper-polyaniline nano-composite as transducer for hydrolase-based biosensors is proposed. In this work, a combination of creatinine deaminase and urease has been chosen as a model system to demonstrate the construction of urea and creatinine biosensors. Immobilisation of enzymes was shown to be a crucial step in the development of the biosensors; the use of glycerol and lactitol as stabilisers resulted in a significant improvement, especially in the case of the creatinine, of the operational stability of the biosensors (from few hours to at least 3 days). The developed biosensors exhibited high selectivity towards creatinine and urea. The sensitivity was found to be $850 \pm 34 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ for the creatinine biosensor and $1120 \pm 33,6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ for the urea biosensor, with K_M^{app} of 0.163 mM for creatinine deaminase and 0.139 mM for urease, respectively. The biosensors responded linearly over the concentration range 1–125 mM, with a limit of detection of 0.5 μM and a response time of 15 s. The performance of the biosensors in a real sample matrix, serum, was evaluated and a good correlation with standard spectrophotometric clinical laboratory techniques was found.

Keywords: amperometric biosensors, immobilized enzymes, nano-composites, polyaniline, choline oxidase, recombinant arginine deiminase, urease, creatinine deiminase, ammonium ions.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. Белоиван О.А., Дуда Т.И., Васильев А.А, Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Шкотова Л.В., **Жибак М.Т.**, Бойчук Ю.В., Бардаков Б.В., Корпан Я.И. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в биосенсорной технологии // Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине / Редкол.: А.Г. Наумовец (глав. ред.); НАН Украины. – К.: Академперіодика, 2014. – 768 с., – ISBN 978-966-360-260-8. – С. 541-545.
2. Mazurenko E., Tananaiko O., Biloivan O., **Zhybak M.**, Pelyak I., Zaitsev V., Etienne M., Walcarius A. Amperometric biosensor for choline based on gold screen-

printed electrode modified with electrochemically-deposited silica biocomposite // *Electroanalysis*. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 1685-1692.

3. **Zhybak M.T.**, Vagin M.Y., Beni V., Liu X., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode // *Microchimica Acta*. – 2016. – Vol. 183, № 6. – P. 1981-1987.

4. **Zhybak M.T.**, Beni V., Vagin M.Y., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 505-511.

5. **Zhybak M.T.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184, № 8. – P. 2679–2686.

6. Biloivan O., **Zhybak M.**, Boychuk Y., Vasil'ev O., Duda T., Muratov V., Korpan Y. Carbon nanomaterial based three-dimensional enzyme membranes for amperometric sensors // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 12.

7. **Zhybak M.**, Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copper-plate/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 23.

8. **Zhybak M.**, Dempsey E., Korpan Y.I. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copperplated/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // *Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 29, Special issue. – 2013. – P. 28.*

9. **Zhybak M.**, Beni V., Turner A., Korpan Y. Ammonium ion selective copper/polyaniline-based nanocomposite for creatinine and urea biosensing // *Materials*

of VIII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 30, Special issue. – 2014. – P. 23.

10. **Zhybak M.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M., Sibirny A., Dempsey E., Korpan Y. Novel L-arginine-selective amperometric sensor based on recombinant arginine deiminase and platinum screen-printed electrodes // Book of Abstracts “MADICA 2014”. – Mahdia, Tunisia, 5-7 November, 2014. – P. B23.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Світові тенденції щодо розробок електрохімічних біосенсорів	25
1.2. Холін. Біосенсори для визначення холіну	31
1.3. Аргінін. Аналітичні методи вимірювання та біосенсорні підходи....	36
1.3.1. Аргінін як важливий маркер захворювань людини	36
1.3.2. Існуючі методи визначення аргініну.....	38
1.3.3. Біосенсори для визначення аргініну	40
1.4. Креатинін і сечовина. Основні досягнення з розробки біосенсорних систем	43
1.4.1. Існуючі аналітичні методи для визначення креатиніну. Біосенсори для визначення креатиніну.....	44
1.4.2. Біосенсори для визначення сечовини	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	53
2.1. Реактиви	53
2.2. Електроди	54
2.3. Методика проведення електрохімічних вимірювань	55
2.4. Модифікація поверхонь електродів	56
2.4.1. Модифікація платиногового друкованого електрода (ПЕ)	56
2.4.2. Модифікація вуглецевого друкованого електрода (ВЕ).....	56
2.5. Морфологічний та елементний аналіз модифікованих поверхонь електродів	57
2.6. Імобілізація ферментів	58
2.6.1. Імобілізація ХОД в SiO ₂ на поверхні золотого друкованого електрода (ЗЕ)	58
2.6.2. Імобілізація аргініндеїмінази (АДІ) на поверхні ПЕ, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон.....	58

2.6.3. Імобілізація КДІ і уреазин на поверхні ВЕ, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон/Cu	59
2.6.4. Імобілізація ХОД з використанням багатошарових вуглецевих нанотрубок на поверхні золотих друкованих електродів.....	59
2.7. Вимірювання в реальних зразках.....	60
2.7.1. Вимірювання в зразках плазми і сироватки крові людей	60
2.7.2. Приготування зразків дитячого харчування та їх аналіз на вміст холіну	62
2.8. Статистична обробка даних	62
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛІНУ НА ОСНОВІ ЗОЛОТИХ ДРУКОВАНИХ ЕЛЕКТРОДІВ.....	63
3.1. Використання вуглецевих нанотрубок для іммобілізації ХОД в БСА мембрані	64
3.2. Імобілізація ХОД у SiO ₂ -плівці, осадженій на поверхню ЗЕ ...	68
3.3. Оптимізація параметрів електрохімічного нанесення та складу золь-гелю	71
3.4. Аналітичні характеристики біосенсора	73
3.5. Вивчення впливу інтерферуючих агентів на роботу біосенсора.	74
3.6. Визначення холіну у модельних розчинах і реальних зразках ...	77
3.7. Висновки	78
РОЗДІЛ 4. АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ СЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ L-АРГ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ТА КОМПОЗИТУ НАФІОН/ПОЛІАНІЛІН	80
4.1. Модифікація ПЕ композитом ПАНі/Нафіон та аналіз утвореної поверхні.....	81
4.2. Електрохімічні властивості утвореного композиту та чутливість ПАНі/Нафіон/ПЕ до іонів амонію	83
4.3. Імобілізація АДІ та робота біосенсора в модельному середовищі (ФБ рН 7,4)	85

4.4. Вимірювання L-Арг в фармацевтичних препаратах та зразках плазми крові людини	90
4.5. Висновки	93
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА АМОНІЙ-ЧУТЛИВОГО НАНОКОМПОЗИТНОГО СЕНСОРА НА ОСНОВІ ПАНІ/НАФІОН/Cu.....	94
5.1. Нанесення амоній-чутливого композиту на поверхню вуглецевого електроду.....	95
5.2. Електрохімічне визначення іонів амонію	102
5.3. Вплив інтерферентів на роботу хемосенсора	108
5.4. Вимірювання у реальних зразках	109
5.5. Висновки	110
РОЗДІЛ 6. БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ І СЕЧОВИНИ СТВОРЕНІ НА ОСНОВІ АМОНІЙ-СЕЛЕКТИВНОГО НАНОКОМПОЗИТУ ПАНІ/НАФІОН/Cu	112
6.1. Імобілізація ферментів	113
6.2. Робота біосенсорів у модельному середовищі (ФБ рН 7,4)	114
6.3. Хроноамперометричний аналіз	117
6.4. Порівняння характеристик представлених біосенсорів із існуючими аналогами	119
6.5. Визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людей	120
6.6. Висновки	123
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	127
ДОДАТОК А	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АДІ - аргініндеїміназа
- АСЕ – амоній-селективний електрод
- БСА - сироватковий альбумін бика
- БШВНТ - багатошарові вуглецеві нанотрубки
- БШВНТ-NH₂ – багатошарові вуглецеві нанотрубки функціоналізовані аміногрупами (аміновані)
- ВЕ – вуглецевий друкований електрод
- ГА – глутаровий альдегід
- ДМО – діацетил-(2,3-бутандіон) монооксим
- ДПВ – вольтаметричне вимірювання з диференційним пульсом
- ЗЕ – золотий друкований електрод
- СЕМ – скануючий електронний мікроскоп
- ЕІС – електрохімічна імпедансна спектроскопія
- ЕРС – енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія
- ЕХЛ – електрохемілюмінісценція
- ЕХН – електрохімічне нанесення
- КДІ – креатиніндеїміназа
- ЛДВ – лінійний діапазон визначення
- ММВ – мінімальна межа визначення
- ПАНі – поліанілін
- ПВП – полівінілпіролідон
- ПЕ – платиновий друкований електрод
- ПОК – пероксидаза
- РВК – реакція відновлення кисню
- РФС - рентгенівська фотоелектронна спектроскопія
- ТЕОС – тетраетоксисилан
- ФБ – фосфатний буферний розчин
- ХОД – холіноксидаза

ЦТАБ – цетилтриметиламоній бромід

ЦВ – циклічна вольтаметрія

ВСТУП

Актуальність теми. Протягом останніх десятиліть одним з пріоритетних напрямів розвитку молекулярних біотехнологій стали роботи з ідентифікації біомаркерів різних захворювань людини із застосуванням метаболомних підходів [1]. Реєстрація зміни концентрацій метаболітів в біологічних рідинах добре підходить для опису біохімічного стану організму [2], а також дає можливість діагностувати захворювання на ранніх стадіях або попередити процеси різкого загострення хвороби. Зокрема, своєчасний контроль за зміною концентрації креатиніну [3], сечовини [4], іонів амонію [5], L-аргініну та холіну [6, 7], які є комплексними біомаркерами для діагностики захворювань нирок та печінки, дає змогу підтримувати життєдіяльність пацієнтів, що страждають на хронічну хворобу нирок (ХХН) та цироз печінки. Такі клінічні стани характеризуються високим рівнем смертності [8], і тому, швидкість проведення та отримання результатів аналізу мають вирішальне значення. В цих випадках застосування стандартних методів визначення метаболітів (флуорометрії, газової хроматографії поєднаної з мас-спектрометрією, ядерного магнітного резонансу та прямої інфузійної мас-спектрометрії є незручним через складність, високу вартість, необхідність попередньої підготовки зразків та загальну тривалість процесу [9, 10].

Електрохімічні біосенсори ідеально підходять для експрес-визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах, завдяки високій чутливості, швидкому відгуку та вибірковості до цільових молекул, компактним розмірам, та відносно низькій вартості. Так, електрохімічні сенсорні прилади вже сьогодні є незамінними інструментами у клінічній діагностиці, зокрема при лікуванні та моніторингу клінічного стану пацієнтів, що страждають на цукровий діабет. Проте, на даний момент біосенсори для визначення глюкози становлять 85-90 % від всього світового ринку біосенсорів [11], тоді як експрес-системи для визначення рівня креатиніну, сечовини, іонів амонію, L-аргініну та холіну є дефіцитними або відсутніми взагалі.

На даний час існує ціла низка лабораторних прототипів електрохімічних (амперометричних, потенціометричних, кондуктометричних) хемо- та біосенсорів для визначення вищезгаданих метаболітів – комплексних біомаркерів для діагностики захворювань нирок та печінки. Проте, більшість даних прототипів біосенсорів мали ряд спільних недоліків. Так, у випадку біосенсорів для визначення холіну досі невирішеною залишилася проблема іммобілізації холіноксидази [12, 13], а також нейтралізації впливу аскорбінової кислоти за умов вимірювання у реальних зразках. Амперометричні сенсори для визначення іонів амонію та сечовини відзначалися низькою чутливістю, високою мінімальною межею визначення і низькою відтворюваністю сигналу [14]. Через відсутність високочутливого до іонів амонію композиту, в основі більшості розробок амперометричних біосенсорів для визначення креатиніну були мультиферментні каскадні комплекси (зокрема, креатиніназа + креатиназа + саркозиноксидаза [15]), іммобілізовані на золотих або платинових електродах з подальшим визначенням перекису водню. Внаслідок застосування трьох, а інколи чотирьох ферментів (деякі автори додавали у каскад ще й пероксидазу [16]) при визначенні креатиніну, чутливість біосенсора, а також стабільність іммобілізованих ферментів, була досить низькою, що ускладнювало використання таких прототипів за умов вимірювання у біологічних рідинах. Подібна проблема характерна і для більшості прототипів біосенсорів для визначення L-аргініну. Біоселективним елементом в даному випадку найчастіше були бі-ферментні комплекси, що складаються із ко-іммобілізованих аргінази I та уреазы [17, 18]. Авторам не вдалося забезпечити оптимальні умови функціонування для обох ферментів в одній мембрані, що позначалося на чутливості і стабільності сенсорів. Також, через використання уреазы за допомогою даних сенсорів неможливо проводити вимірювання у біологічних рідинах без попередньої обробки зразків.

Саме тому актуальним завданням є пошук ефективних підходів для формування високоспецифічних амоній- та пероксидчутливих нанокомпозитів, а також іммобілізації біорозпізнавальних молекул на поверхню електродів та

розробка на їх основі нових амперометричних сенсорних систем для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами.
Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалася у рамках бюджетної теми 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» (№ держ. реєстрації 012U004025; термін виконання: 2013-2017 рр.); проекту «Ідентифікація низькомолекулярних метаболітів сироватки крові як основа тест-систем для діагностики ішемічного ушкодження мозку та деяких дегенеративних захворювань» (№ держ. реєстрації 0115U002948; термін виконання: 2015-2019 рр.) цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства»; проекту «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору «Аргітест» для аналізу аргініну в клінічних зразках» (№ держ. реєстрації 0115U002952; термін виконання: 2015 р.) у рамках загальноакадемічного конкурсу науково-технічних проектів у 2015 р.; проекту «Розробка біоселективних мембран на основі вуглецевих наноматеріалів, функціоналізованих біомолекулами для створення аналітичних мікроприладів нового покоління» (№ держ. реєстрації 0110U006053; термін виконання: 2010-2014 рр.) у рамках Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали»; проекту для молодих вчених «Амоній-селективні композити як основа високочутливих тест-систем для визначення креатиніну, сечовини та аргініну – маркерів захворювань нирок» (№ держреєстрації 0113U007554; термін виконання: 2013-2014 рр.). Частина результатів дисертаційної роботи отримана в рамках міжнародних проектів НАТО «Наука заради миру» (NATO Science for Peace Program; № проекту СВР.NUKR.SFPP 984173; термін виконання: 2013-2016 рр.) та в рамках програми ЄС РП7 (№ проекту PIRSES-GA-2012-318053; термін виконання: 2013-2016 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи була розробка амперометричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення у біологічних рідинах низькомолекулярних метаболітів, зокрема холіну, іонів амонію, L-аргініну, сечовини та креатиніну.

Досягнення поставленої мети передбачало розв'язання таких завдань:

- ❖ розробка підходів для модифікації поверхонь комерційних друкованих електродів нанокompозитами на основі золь-гелів (на основі SiO_2), електропровідних полімерів (поліанілін), іономерів (нафіон), вуглецевих наноматеріалів (нанотрубки немодифіковані та модифіковані), наночастинок металів/оксидів металів (мідь/оксиди міді) за допомогою електрохімічних методів;
- ❖ розробка ефективних методів іммобілізації оксидоредуктаз та гідролаз на поверхні друкованих електродів різного походження (платина, золото, карбон);
- ❖ дослідження структурних (морфологія та компонентний склад) та аналітичних (чутливість, селективність, стабільність, діапазон вимірювання та ін.) характеристик нанокompозитних електродів;
- ❖ конструювання лабораторних прототипів моноферментних амперометричних сенсорів на основі нанокompозитів та іммобілізованих ферментів (холіноксидази, аргініндеімінази, креатиніндеімінази, уреаз) для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини; дослідження їх основних аналітичних характеристик;
- ❖ оптимізація характеристик створених нанокompозитних амперометричних біосенсорів для вимірювання метаболітів у реальних біологічних рідинах (сироватка та плазма людини) та їх порівняльний аналіз із стандартними методами.

Об'єкт дослідження – сукупність фізико-хімічних процесів під час формування та функціонування нанокompозитних елементів сенсорів на основі

оксидоредуктаз та гідролаз для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Предмет дослідження – амперометричні сенсорні системи із використанням ензимів для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Методи дослідження: електрохімічні (вольтаметрія, хроноамперометрія, хронокулонометрія, електрохімічна імпедансна спектрометрія), фізичні (оптична спектроскопія, скануюча електронна мікроскопія, рентгенівська фотоелектронна спектроскопія, енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія), біохімічні методи досліджень ферментативних реакцій, методи ковалентної та нековалентної іммобілізації ферментів, статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів.

- Виявлено особливості іммобілізації холіноксидази на поверхні золотих друкованих електродів в БСА мембрані за присутності амінованих багатошарових нанотрубок, а також за допомогою електронанесення в силікатному золі.
- Вперше розроблено моноферментний амперометричний сенсор на основі рекомбінантної аргініндеімінази та амоній-чутливого поліанілін/нафіон композиту, електроосадженого на друкований платиновий електрод, для визначення концентрації аргініну у зразках плазми крові людини.
- Вперше розроблено високочутливий до іонів амонію нанокompозит на основі електроосаджених частинок міді, нафіону та електрополімеризованого поліаніліну (ПАНі/Нафіон/Cu).
- Вперше нанокompозит ПАНі/Нафіон/Cu застосовано для розробки моноферментних сенсорів на основі креатиніндеімінази та уреазу для визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людини.

Практичне значення одержаних результатів. Створено лабораторні прототипи амперометричних біо/хемосенсорів для експрес-аналізу низькомолекулярних клінічно важливих метаболітів (холін, іони амонію, L-аргінін,

креатинін та сечовина) та успішно проведена їх апробація в реальних зразках (дитячі молочні суміші, фармацевтичні препарати, сироватка і плазма крові). Висока селективність і чутливість, а також простота запропонованих методів значно полегшують процедуру аналізу та можуть скласти конкуренцію традиційним низькоселективним хімічним та дорогим загальнозживаним методам.

Особистий внесок здобувача. Формування наукового напрямку та вибір об'єктів дослідження, визначення мети, розробку програми проведення експериментів було здійснено автором разом із науковим керівником. Експериментальну роботу виконано здобувачем особисто, або за його безпосередньої участі. Частину роботи щодо розробки амперометричних біосенсорів для визначення холіну було виконано спільно із іншими працівниками лабораторії біомолекулярної електроніки (ЛБМЕ) ІМБГ НАНУ, (Білоіван О.А.) та колегами із кафедри аналітичної хімії КНУ (Мазуренком Є., Тананайко О., Зайцевим В.). У тісному співробітництві із Цетром біосенсорів і біоелектроніки університету м. Лінчопінг (ЛіУ) (Швеція) в особі проф. Е. Тернера (А. Turner), М. Вагіна (М. Vagin), В. Бені (V. Beni) було проведено розробку амперометричних біосенсорів для визначення іонів амонію, креатиніну та сечовини. Розробку біосенсора для визначення L-аргініну проведено у співпраці із ЛіУ та Інститутом біології клітини (ІБК) НАНУ в м. Львів (Гончар М.). У процесі написання дисертаційної роботи автором самостійно проаналізовано наукові літературні джерела за темою дослідження. Разом із співавторами здобувачем проведено підготовку наукових статей до друку у профільних наукових виданнях, а також тез та стендових доповідей.

Практичне випробування біо/хемосенсорів проведено у ЛБМЕ ІМБГ НАНУ із використанням біоматеріалу, люб'язно наданого Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу та Центром переливання крові Київської міської лікарні «Феофанія».

Автор висловлює ширю подяку всім колегам і співавторам за допомогу у підготовці і проведенні експериментальних досліджень, обговоренні отриманих результатів та підготовці результатів до публікації.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертації доповідалися та були представлені на Міжнародній конференції “Recent Advances in Micro/Nano Sensors” (Київ, 2013); VII щорічній науковій конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2013); VIII щорічній науковій конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2014); 24-му Всесвітньому конгресі Biosensors-2014 (Мельбурн, Австралія, 2014); Міжнародній конференції “MADICA 2014” (Махдія, Туніс, 2014); 26-му Всесвітньому конгресі Biosensors-2016 (Гетеборг, Швеція, 2016).

Публікації за темою дисертації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових журналах та тези 5-ти доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із наступних частин: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини та обговорення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 153 сторінок. Робота містить 48 рисунків і 8 таблиць. Список літератури охоплює 255 найменувань, з них кирилицею – 3, латиницею – 252.

РОЗДІЛ 1

НОВІТНІ ДОСЯГНЕННЯ У РОЗРОБЦІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Світові тенденції щодо розробок електрохімічних біосенсорів

Добре відомо, що одним із найважливіших чинників соціально-економічного зростання будь-якого суспільства є розвиток високих технологій, зокрема аналітичних, чільне місце серед яких, безумовно, займають біо- та хемосенсорні технології.

У 60-х роках минулого сторіччя, коли Кларк та Ліон започаткували роботи над сенсорними системами, створивши перший у світі біосенсор для визначення глюкози [19], то навряд чи могли уявити собі, яким стане їхнє дітище лише через 50-ліття. Тільки одна електронна промисловість, яка є основою виробництва всіх відомих на сьогодні фізичних перетворювачів, що застосовуються при розробці сенсорних систем, пройшла за цей період чималий шлях – від макротехнологій до нанотехнологій. Щодо біологічних наук, то майже за цей самий проміжок часу пройдено шлях від відкриття структури ДНК до поглиблення розуміння процесів у живому організмі на молекулярно-квантовому рівні, чим, фактично, закладено підвалини всіх найсучасніших -омік – геноміки, протеоміки і метаболоміки.

Завдяки успіхам у біомедичних дослідженнях та розробці нових методів діагностики за останні 30 років вдалося підвищити середню тривалість життя людей на 5 років, а також зменшити в два рази смертність від найбільш поширених захворювань [20].

Проте, попри всі вагомі досягнення фундаментально-прикладних наук, останніми роками суттєво зросла і кількість ризиків, спричинених науково-технічним прогресом суспільства. Так, проблемними все ще залишаються рання діагностика значної кількості захворювань, контроль якості харчових продуктів та охорона довкілля. Високий рівень смертності від онкологічних, нейродегенеративних захворювань, акумулювання важких металів – це ті проблеми, що потребують якісно нових аналітичних підходів щодо забезпечення надійності діагностики даних недуг на ранніх стадіях.

Проте, імовірність виявлення лише однієї, так званої «золотої молекули», що визначатиме розвиток того чи іншого захворювання, є практично нереальною, враховуючи, що більшість процесів у організмі людини мають мультирегуляторну природу. Тому, для певного захворювання потрібно знаходити унікальні набори низькомолекулярних компонентів, що характерні лише для кожного клінічного стану окремо (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Від моно- до мультицільової діагностики захворювань

Впродовж останнього десятиліття одним з ключових пріоритетів розвитку сучасних молекулярних та клітинних біотехнологій стали роботи з ідентифікації нових біомаркерів різних захворювань людини із застосуванням метаболомних підходів [1]. Це не є випадковим, оскільки зміна концентрацій метаболітів, зазвичай, більше підходить для опису біохімічного стану біологічних систем і, отже, може бути кращим мірилом функції генів у порівнянні з добре розвиненими

транскриптомними та протеомними підходами [2]. Значно простішими виглядають проведення досліджень з 6500-10000 базових метаболітів, аніж з 25000 генів, 100000 транскриптів і 1000000 білків [21, 22]. Проте, очевидним є також і факт, що встановлення повного компонентного складу метаболому є непростим завданням через необхідність визначення величезної кількості молекул, відмінних як за своїми фізико-хімічними властивостями, так і діапазонами концентрацій [23]. Серед найбільш вживаних підходів для дослідження профілів метаболітів людини (у нормі та патології) впродовж останніх 5 років стали методи газової хроматографії, поєднаної з мас-спектрометрією, ядерного магнітного резонансу та прямої інфузійної мас-спектрометрії [9, 10]. Проте, дані підходи є складними і дорогавартісними, вимагають наявності висококваліфікованого персоналу, як для проведення самого аналізу, так і для інтерпретації отриманих результатів, та потребують здійснення процедур попередньої підготовки проб.

Використання електрохімічних біологічних та хімічних сенсорів має ряд переваг порівняно з класичними аналітичними методами: низька вартість одиничного аналізу, висока точність, чутливість та швидкість, мала енерго- та ресурсозатратність, що забезпечуються, здебільшого, системністю у підходах щодо поєднання біо/хемо-розпізнавальних молекул із фізичними перетворювачами. Завдяки точності і простоті біорозпізнавання, що забезпечується використанням ензимів, а також відносно низькій собівартості виробництва всіх елементів біоелектрокаталітичних систем, вони ідеально підходять для кількісних аналізів у складних багатокомпонентних зразках, таких як біологічні рідини. Дані властивості електрохімічних діагностичних приладів вже на сьогодні зробили суттєвий внесок у розвиток децентралізованої клінічної діагностики та створили підґрунтя для персоналізованої медицини [24]. Застосування амперометричного визначення виявилось успішним за розробки комерційних недорогих приладів для віддаленої діагностики рівня глюкози у крові. Враховуючи поширеність захворювання на цукровий діабет та відмінні каталітичні властивості ферментів, що окислюють глюкозу, цілком прогнозовано, що біосенсиори для визначення глюкози в крові займають близько 85% від всього світового ринку біосенсиорів [11].

Домінування глюкозних сенсорів наочно свідчить, що ринок сенсорних систем для визначення інших клінічно важливих молекул в біологічних рідинах, зокрема, креатиніну, амінокислот, сечовини, іонів амонію і т.і., є практично не розвиненим. Загальновідомо, що компанії Abbott, Philips, Roche та ін., також ведуть активну розробку подібних пристроїв. Один з небагатьох комерційно доступних приладів є i-STAT від Abbott, в основі якого лежить електрохімічне визначення цілого ряду показників у 2-3 краплях капілярної чи венозної крові (всього 26 параметрів) [25]. Проте ціна близько \$20000 явно не відповідає запиту на доступні для широкого загалу аналітичні системи для персоналізованої медицини.

Більшість відомих на сьогодні біосенсорних систем не представлені навіть як промислово доступні зразки через складність їх конструкції. На даний момент потреба у нових та простих у використанні засобів персональної діагностики є досить великою. Стає очевидним, що сенсорні системи такого типу можуть значно знизити витрати на лікування [26].

В останні десятиліття серед розробників біосенсорних приладів прослідковується тенденція до мініатюризації пристроїв, що дає низку переваг: низьку собівартість компонентів за масового виробництва, суттєве спрощення логістики зберігання та розповсюдження готових приладів, покращення аналітичних характеристик, можливість виготовлення мультитаргетних сенсорів та проведення аналізу у зразках об'ємом кілька мікролітрів, що є надзвичайно важливим для біомедичного застосування [26].

В літературі описані розробки низки біосенсорних мікросистем, проте пристрої, в основі роботи яких лежить електрохімічна детекція сигналу сенсора, стали найбільш успішними та мають багатообіцяюче майбутнє [27]. Електрохімічний біосенсорний пристрій містить в своїй основі електрохімічну комірку (дво- або три-електродну систему, в якій хоча б один електрод є модифікований біорозпізнавальним елементом), та приймач електрохімічного сигналу [28]. Електроди, що є невід'ємною складовою будь-якого електрохімічного пристрою, можна легко зменшити у розмірах до мікро- чи навіть нанометрів [29-31]. Приймачі електрохімічного сигналу (потенціостати) також можливо суттєво

зменшити у розмірах за допомогою мікромашинних технологій, мікроелектромеханічних (МЕМС) та наноелектромеханічних (НЕМС) систем [32, 33]. Ще однією можливістю мініатюризації та спрощення біо/хемосенсорів є використання персональних електронних пристроїв, зокрема, смартфонів, смарт-годинників, фітнес браслетів, смарт-текстилю для реєстрації електрохімічних відгуків, їх обробки та аналізу [34, 35].

Проте, незважаючи на успіхи мікроелектронної галузі у виготовленні та мініатюризації як фізичних перетворювачів так і приладів в цілому, все ще невіршеними залишаються проблеми технологічності нанесення чутливих шарів та іммобілізації біорозпізнавальних молекул на поверхні електродів/мікроелектродів, а також їх поєднання з виготовленням електродів у єдиному технологічному циклі.

Одним із найважливіших етапів розробки сенсора є інтегрування каталітичних біомолекул з перетворювачем сигналу (трансд'юсером). Ефективність даного процесу в подальшому найбільше впливає на такі показники як активність біоселективного елементу сенсора, стабільність його роботи та аналітичні характеристики (динамічний діапазон, чутливість, час відгуку і т.і.). Дані аспекти є особливо важливими при розробці біосенсорних приладів для мультитаргетної детекції аналітів, де дуже гостро стоїть проблема ефективності обміну електронами між електродом і біоселективним елементом сенсора. Університетом м. Лінчопінг (Швеція) та компанією ACREO (м. Норчопінг, Швеція) вперше в світі розпочато виготовлення дослідних партій повністю друкованої біо(хемо)сенсорної платформи, до якої інтегровано 5 робочих електродів та системи збору, обробки та передачі даних (рис.1.2). Основним завданням цих робіт є забезпечення клінічних лабораторій новими, недорогими, точними та селективними аналітичними системами. Орієнтовна собівартість запропонованих тест-систем за умови масового виробництва не перевищуватиме 0,5 долара США. Створені тест-системи можуть також знайти застосування при проведенні моніторингу стану навколишнього середовища та контролі якості харчових продуктів.

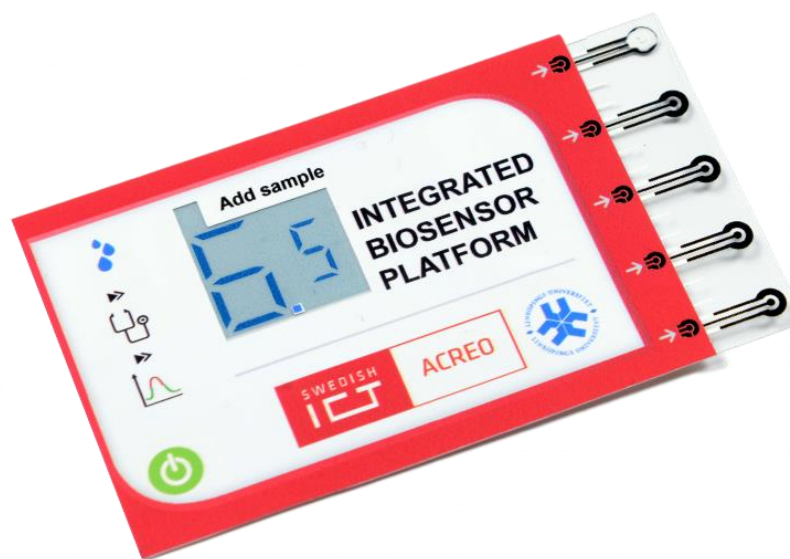


Рис. 1.2. Повністю друкована інтегрована електрохімічна біосенсорна платформа для одночасного визначення 5 аналітів. (Спільна розробка RISE Acreo, Швеція та Biosensor and Bioelectronics Centre, IFM, LiU, Швеція; www.acreo.se)

Таким чином, розробка нових біоелектрокаталітичних систем для мультитаргетного визначення клінічно важливих метаболітів є вкрай необхідною для забезпечення потреб сучасної медичної діагностики, як централізованої, так і персоналізованої.

В наступних розділах дисертації детально описані останні тенденції в розробках, а також запропоновані нові біосенсорні підходи для визначення низки низькомолекулярних метаболітів – іонів амонію, креатиніну, сечовини, L-аргініну та холіну, які є комплексними біомаркерами для ранньої діагностики та моніторингу перебігу захворювань печінки та нирок, зокрема цирозу печінки та хронічної хвороби нирок (ХХН).

1.2. Холін. Біосенсори для визначення холіну

Визначення вмісту холіну у тканинах, крові та продуктах харчування є досить важливим аналітичним завданням, оскільки холін є ключовим елементом метаболізму ссавців [36]. Так, холін включений в епігенетичну регуляцію експресії генів через метилювання ДНК [37], в біосинтез ліпопротеїнів і мембранних фосфоліпідів, бере участь у регуляції рівня інсуліну, в процесах транспортування жирів у клітинах печінки, а також є попередником нейротрансміттера ацетилхоліну [38]. Також, холін є необхідним для розвитку ембріонів та формування мозку [39-41].

В печінці і нирках холін окислюється до бетаїну. Проте, при потраплянні в кишечник холін використовується бактеріями для синтезу триметиламіну, який далі окислюється флавінмонооксигеназою-3 печінки до триметиламін-N-оксиду (ТМАО) – сильного токсину, що далі виводиться з організму здорових людей нирками [42]. Встановлено, що в пацієнтів, які страждають на ХХН, концентрація холіну в крові є підвищеною, що, враховуючи недостатню роботу нирок, призводить до акумулювання токсичного ТМАО [7].

Холін синтезується в організмі людини, проте, його додатковим джерелом можуть бути продукти харчування, включаючи дитячі суміші, дієтичні добавки та напої для спортсменів. Дефіцит холіну в організмі людини призводить до виникнення ряду захворювань [43]. Окрім того, холін є одним із маркерів нейродегенеративних захворювань, зокрема, хвороби Паркінсона та Альцгеймера [44, 45].

Для визначення холіну існує ряд методів: ферментно-спектрофотометричний [46], метод рідинної хроматографії [47], електрохімічно- і хімічно-люмінесцентний [48, 49].

Холін досить важко визначати оптично, оскільки молекула холіну не володіє поглинальними чи флуоресцентними властивостями. Проте, сенсорні оптичні методи детекції холіну досить широко описані в літературі [50-52].

Так, для оптичного визначення (поглинання в ультра-фіолетовому (УФ) діапазоні) холіну у розчинах запропоновано використовувати фермент холіноксидазу (ХОД), іммобілізований у шарі полі(3,4-етилендіокситіофену) (ПЕДОТ). У слабо-лужному електролітичному розчині (фосфатному буфері рН 8,0) спостерігали зменшення піку поглинання при 293 нм. Лінійний діапазон визначення (ЛДВ) становив від 0,001 до 0,050 мМ холіну [50].

В роботі McEntyre *et al.* запропоновано проводити обробку холіну 1-нафтилізоціанатом. Далі, утворений в результаті реакції стабільний катіонний ароматичний уретан вимірювали за допомогою ВЕРХ на катіон-обмінній колонці із наступним фіксуванням флуоресцентного відгуку. ЛДВ становив 0,009 – 0,06 мМ холіну [51].

Іншою групою опубліковано метод визначення холіну на основі ХОД та чутливих до H_2O_2 флуоресцентних квантових точок (КТ) CdTe. Визначення проводилося шляхом фіксації пригнічення флуоресценції КТ молекулами перекису водню. Мінімальна межа визначення (ММВ) становила 100 нМ, а ЛДВ – 0,005 – 0,15 мМ холіну [52].

Серед біосенсорних підходів для визначення холіну найпоширенішими стали методи електрохемілюмінесцентного (ЕХЛ) та електрохімічного (вольтамперометричного) визначення. В основі роботи більшості прототипів біосенсорів для визначення холіну лежить ферментативна реакція окислення холіну за допомогою ХОД (рис. 1.3), яка складається із низки послідовних напівреакцій окислення холіну до бетаїнового альдегіду, далі бетаїнового альдегіду до гліцинового бетаїну, кожна із яких супроводжується окисненням відновленого флавінаденіндинуклеотиду [53].

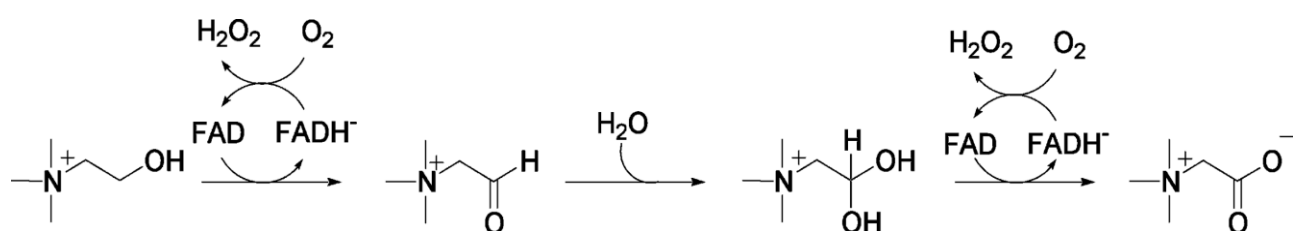


Рис. 1.3. Двохстадійне окислення холіну за допомогою ХОД [53]

Окрім ХОД також використовують холіндегідрогеназу (ХДГ) та холінмонооксигеназу (ХМО). Проте, на відміну від ХДГ і ХМО, тільки ХОД каталізує окислення холіну до гліцинового бетаїну [54].

ЕХЛ – один із видів люмінесценції, який характерний для рідких люмінофорів, зокрема, люмінолу, у електричному полі за обов'язкової наявності в розчині молекули-активатора – перекису водню. Як і в більшості біосенсорних підходів для визначення холіну, як біорозпізнавальну молекулу використовують ХОД.

В роботі Jin *et al.* описано застосування ферментного реактора (із ХОД) разом із ЕХЛ детектором для швидкого і чутливого визначення холіну у проточно-інжекційній системі [55]. Після проходження реакції ХОД у ферментному реакторі, утворений перекис водню транспортувався проточною системою в ЕХЛ комірку, в якій визначали ЕХЛ інтенсивність комплексу люмінол/ H_2O_2 за потенціалу +0,8 В проти електроду порівняння Ag/AgCl. ММВ становила 0,05 мкМ холіну, а динамічний діапазон визначення 0,05 – 2 мкМ холіну. Метод застосований для визначення холіну в сечі здорових людей.

З метою покращення аналітичних характеристик методу ЕХЛ для визначення холіну, в роботі Wu *et al.* представлено модифікацію поверхні карбонового електроду наноккомпозитом графен-Ау-хітозан, а як селективний елемент обрано біоккомпозит $Fe_3O_4-TiO_2$ -ХОД [56]. Встановлено, що дана модифікація сприяла інтенсифікації ЕХЛ люмінолу, завдяки чому вдалося отримати відмінні аналітичні характеристики біосенсора: лінійний діапазон визначення від 0,003 до 1120 мкМ холіну, ММВ – 0,001 мкМ. Метод застосований для визначення холіну в сироватці крові людей.

Групою Pal *et al.* було розроблено метод хемілюмінесцентного визначення холіну на основі наностержнів ZnO, модифікованих іммобілізованими ферментами ХОД і пероксидазою (ПОК) [57]. Розроблений ЕХЛ біосенсор для визначення холіну мав широкий динамічний діапазон (від 0,0005 до 2,0 мМ холіну, ММВ становила 0,0005 мМ холіну). Даний метод був застосований для визначення холіну в молоці.

Групою Marquette *et al.* розроблено біосенсорну систему для ЕХЛ визначення перекису водню, утвореного в результаті ферментної реакції ХОД. Так, при розробці елементу біосенсорної системи для визначення холіну, використано ХОД, іммобілізовану у фотополімерну матрицю ПВА-SbQ. Вимірювання проводили за потенціалу +0,85 В із використанням платинового псевдо-електроду порівняння. ММВ становила 0,002 мМ холіну, при ЛДВ від 0,002 до 0,2 мМ холіну [58].

Підсумовуючи огляд біосенсорів на основі ЕХЛ для визначення холіну, варто зазначити, що метод характеризується досить низькою ММВ (до 10^{-7} М), широким лінійним діапазоном визначення, а використання ферменту ХОД, дозволяє досягти високої селективності. Проте, складна процедура підготовки суміші для вимірювання, обов'язкова наявність речовини-ініціатора люмінесценції (наприклад, люмінолу), необхідність попереднього очищення зразків від аскорбінової та сечової кислот, які пригнічують інтенсивність люмінесценції, та відносно дороговартісне обладнання, є тими факторами, що не дозволяють даному підходу бути доступним рутинним аналітичним методом та придатним для розробки приладів для персоналізованої медицини.

Активний розвиток сфери персоналізованої медичної діагностики вимагав появи нових дешевих і доступних для широкого загалу методів [59]. У зв'язку із цим, за останні два десятиліття розроблено низку прототипів електрохімічних біосенсорів для визначення холіну. Оскільки вибір біоселективної молекули при розробці дизайну біосенсорів обмежувався у більшості випадків ХОД, то одним із основних завдань залишалася ефективна іммобілізація ХОД на поверхні електродів. Так, запропоновано іммобілізувати ХОД шляхом фізичної адсорбції на поверхні вуглецевих електродів [60, 61], проводити інкапсуляцію в електропровідних [62], непровідних [63], напівпровідних полімерних матрицях [64]. Використовувався також метод іммобілізації ензиму шляхом нанесення елементів біорозпізнавального композиту «шар-за-шаром» [13, 45, 65, 66], у матриці ZnO_2 [67], та зшивання за допомогою глутарового альдегіду [12, 44, 68]. Незважаючи на кількість існуючих лабораторних прототипів холінових біосенсорів, тільки окремі з них виявились придатні для визначення цього аналіту

в реальних зразках: яйцях, тісті, молоці, дієтичній їжі, дитячому харчуванні [68, 69], а також у біологічних рідинах [61].

Одними з найбільш перспективних стали методи іммобілізації ХОД у тонкій плівці золь-гелю з додаванням вуглецевих нанотрубок і наночастинок металів. Дана технологія була успішно застосована за розробки біосенсора для визначення фосфатидилхоліну у зразках сироватки крові [70, 71]. Завдяки використанню матриці золь-гелю вдавалося досягти високої стабільності іммобілізованої ХОД [72-74], оскільки синтез золь-гелю проходить при невисоких температурах, внаслідок чого полімерні кремнієві ланцюги утворюються навколо молекули ензиму і не пошкоджують просторову структуру ферменту [75, 76].

Отже, визначення концентрації холіну є важливою для ранньої діагностики низки небезпечних захворювань (зокрема, нейродегенеративних захворювань, діабеті, ожирінні, ХХН), а також для контролю якості продуктів харчування, включаючи суміші для немовлят. Більшість відомих на сьогодні біосенсорів для визначення холіну мають недоліки, основним з яких є низька стабільність ХОД (всього кілька годин після іммобілізації), як операційна так і під час зберігання. Розробка нового, високоефективного способу іммобілізації ферментів, має велике фундаментально-прикладне значення, як у розробці біосенсорів для холіну, так і для розвитку біосенсорної галузі загалом.

1.3. Аргінін. Аналітичні методи вимірювання та біосенсорні підходи

1.3.1. Аргінін як важливий маркер захворювань людини. Для здорових людей аргінін прийнято вважати заміною амінокислотою. Проте, під час деяких захворювань та після ушкоджень аргінін використовується організмом досить активно, що призводить до його дефіциту. В таких випадках, L-аргінін вважається ситуативно незамінною амінокислотою [6].

В організмі аргінін задіяний у цілому комплексі важливих фізіологічних процесів: бере участь у загоєнні поранень [77], покращує роботу імунної системи [78], впливає на протипухлинну активність Т-клітин [79], володіє антикатаболічним ефектом [80], а також є важливим елементом у циклі сечовини. L-Аргінін (L-Арг) служить попередником для біосинтезу багатьох біоактивних сполук, включаючи оксид азоту (NO), поліаміни, пептиди і білки [81, 82].

L-Арг є важливим біомаркером низки захворювань, пов'язаних із порушенням обміну аргініну, зокрема, гіпераргінінемії, викликаної генетичним дефектом в гені ARG1 (дефіцит аргінази I) [83]. L-Арг використовується в клініці для лікування деяких захворювань та входить до складу багатьох біодобавок для спортсменів.

Моніторинг вмісту L-Арг в плазмі крові здійснюють при довенному введенні L-Арг в процесі діагностики та експериментального дослідження захворювань ендокринної системи [84]. Рівень L-Арг в сечі є маркером гомозиготної цистинурії [85], а також обструктивної нефропатії новонароджених [86]. Існують дані, що визначення концентрації L-Арг у сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких захворювань, як артеріальна гіпертензія, гестоз вагітних та інші акушерські ускладнення [87], астму [88], обструктивні захворювання дихальних шляхів та муковісцидоз [89], запалення кишківника [90], а також агресивні гепатокарциноми, меланоми шкіри та колоректальний рак [91, 92].

Ефективний моніторинг рівня L-Арг у плазмі крові є необхідним для хворих на деякі форми раку при застосуванні метаболічної терапії на основі рекомбінантних ферментів деградації L-Арг. Відомо, що більшість протипухлинних хімотерапевтичних препаратів, які використовуються у сучасній медичній практиці, мають негативну побічну дію внаслідок значної загальної токсичності для клітин різних тканин і органів людини. Створення дефіциту окремих амінокислот в організмі, як метод метаболічної терапії, вважається одним із перспективних підходів, що відповідає цим критеріям. Відомо, що деякі типи пухлин є ауксотрофами за аспарагіном, метіоніном чи L-Арг та виявляють підвищену чутливість до голодування за цими амінокислотами. Це привернуло значний науковий і клінічний інтерес до терапії злоякісних пухлин на основі застосування ферментів, що розщеплюють індивідуальні амінокислоти – аспарагінази, метіонінази, аргініндеїмінази та аргінази [93-95].

Підвищена чутливість злоякісних клітин до дефіциту L-Арг, в порівнянні з нормальними клітинами організму, спричинена мутаційним статусом клітин пухлин, зокрема, особливостями регуляції експресії генів метаболізму L-Арг і специфікою функціонування сигнальних шляхів, що контролюють мітотичний цикл та синтез білка [95, 96]. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* (випробування на моделях лабораторних тварин та клінічні випробування з пегільованими (кон'югованими з PEG) формами ферментів) показано, що підходи ензимотерапії на основі голодування за L-Арг характеризуються селективною дією, спрямованою проти злоякісних клітин, та не є токсичними для організму в цілому [97-100]. Серед пухлин, чутливих до цієї ензимотерапії, є агресивні форми раку, для яких поки що не існує ефективних методів лікування: карциноми печінки, простати, підшлункової залози, нирки, меланоми, гліоми, карциноми шлунку, мезотеліоми та деяких типів лейкозів [95]. Однак, результати клінічних випробувань та досліджень *in vitro* вказують на необхідність розробки методів раціональної комбінаційної ензимотерапії на основі ферментів деградації L-Арг [101-103]. Такі дослідження вимагають ретельного тестування запропонованих підходів на лабораторних тваринах, а, отже, застосування ефективних методів моніторингу концентрації L-

Арг у кров'яному руслі та в злякисних клітинах. Наступні клінічні випробування також потребуватимуть високочутливого, надійного, швидкого та зручного експрес-методу для моніторингу L-Арг в крові пацієнтів, подібно до моніторингу вмісту глюкози в інсуліновій терапії цукрового діабету.

1.3.2. Існуючі методи визначення аргініну. На сьогодні визначення вмісту L-Арг проводиться методами флуориметрії [104], спектрофотометрії [105, 106], капілярного електрофорезу [107, 108], полярографії [109], проточно-інжекційного аналізу [110], ензиматичним методом [104, 111-113], високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) [114].

Застосування спектрофотометричних (СФ) методів визначення L-Арг у біологічних рідинах людини та ссавців (крові та сечі) обмежується їх низькою селективністю, спричиненою позитивною реакцією на гуанідинові сполуки високих концентрацій L-лізину, L-проліну, L-цитруліну, тощо [105, 115]. L-Арг у реальних зразках можна відокремлювати від інтерферуєючих сполук, застосовуючи іонообмінні смоли [116], проте, це ускладнює процедуру аналізу.

Найбільшого поширення набули хроматографічні методи кількісного аналізу L-Арг. Чутливий проточно-інжекційний хемілюмінесцентний (ХЛ) метод базується на взаємодії L-Арг з натрій гіпобромітом, але критичним моментом реакції є низька стабільність останнього реагенту [117]. Інший варіант проточно-інжекційного методу базується на реакції L-Арг із тріс-(2,2-біпіридил) рутенієм (III) при рН 10 із утворенням ХЛ продукту. Недоліком даної методики є неспецифічна взаємодія з іншими амінокислотами та необхідність попереднього відокремлення L-Арг на графітовому сорбенті [118]. Застосування методу ВЕРХ із попередньою дериватизацією L-Арг о-фталевим альдегідом дозволяє досягти ММВ на рівні 0,3 мкг/мл [119]. Метод ВЕРХ є автоматизованим, і його можна використовувати для серійного аналізу амінокислот у клінічних лабораторіях за наявності відповідного обладнання без особливого контролю з боку лаборанта. Метод достатньо чутливий, відтворюваний і дає весь набір амінокислот (15-20 мкл чистої плазми крові). Проте, метод має і низку недоліків, які обмежують його широке використання, насамперед

у експрес-діагностиці. Перш за все, ВЕРХ вимагає коштовного обладнання та реактивів, що робить відповідні аналізи дорогими для рутинного клінічного аналізу. Цей метод вимагає значної кількості органічних розчинників високої хроматографічної якості та дорогі дериватизуючі реагенти. Також, час підготовки та аналізу зразка є тривалим від моменту дериватизації до одержання кількісних даних: 1-2 доби. Щодо аналізу вмісту L-Арг у плазмі крові шляхом дериватизації з фенілізотіоціанатом (ФІТЦ), ММВ аналізу близько 1 мкМ аргініну, ЛДВ - від 1 до 2500 мкМ, мінімальна кількість зразку становить 15 мкл плазми крові.

L-Арг визначають також за допомогою лазерної флуоресцентної спектроскопії [120], але цей підхід не набув широкого розповсюдження у практиці, оскільки, як і більшість інших фізико-хімічних методів, потребує коштовного спеціального обладнання і операторів високої кваліфікації.

Для кількісного аналізу L-Арг розроблено ензиматичні методи за використання трьох ферментів – аргінази, уреази та глутаматдегідрогенази [121], або октопіндегідрогенази [122]. ММВ мультиферментного методу – від 2 мкМ L-Арг, ЛДВ від 0,002 до 0,47 мМ [121]. Недоліком цих ензиматичних методів є висока вартість аналізу, обумовлена використанням кількох комерційних ферментів.

Нещодавно в ІБК НАНУ було розроблено низку високо селективних ензиматично-хімічних методів кількісного аналізу L-Арг з використанням різних форм рекомбінантної аргінази І печінки людини та аргініндеїмінази (АДІ) [104, 111, 113]. Метод з використанням рекомбінантної аргінази І ґрунтується на ферментативному гідролізі L-Арг до L-орнітину та карбаміду [111]. Далі, карбамід взаємодіє із діацетил-(2,3-бутандіон) монооксимом (ДМО) на хімічній стадії реакції, із утворенням продукту, який кількісно оцінюється спектрофотометрично за оптичною густиною при $\lambda = 480$ нм (ММВ 5,0 мкМ; ЛДВ 7,0 – 100 мкМ) або флуориметрично при 510 нм із хвилею збудження 360 нм (ММВ 0,04 мкМ; ЛДВ 0,06 – 280 мкМ). Кінцевим продуктом хімічної реакції є (2Е)-бутан-2,3-діон-2-семікарбазон та інші сполуки, зокрема, циклічні. Застосування АДІ в ензиматичному методі визначення L-Арг забезпечує високоселективну та ефективну деградацію Арг до цитруліну [113]. Концентрацію кінцевого продукту

хімічної реакції визначали спектрофотометрично за оптичною густиною при $\lambda = 490$ нм (ММВ 2,5 мкМ; ЛДВ 4,4 – 280 мкМ) та флуориметрично при 515 нм із хвилею збудження 360 нм (ММВ 0,3 мкМ; ЛДВ 0,55 – 140 мкМ).

На основі вищезгаданих робіт, вперше в світі українськими вченими з ІБК та ІМБГ НАН України було виготовлено дослідну партію аналітичного набору для спектрометричного та флуориметричного визначення аргініну - «Аргітест» [123]. Жодного комерційно доступного сенсорного пристрою на сьогодні в світі не існує.

1.3.3. Біосенсори для визначення аргініну. Упродовж останніх років запропоновано кілька типів біосенсорів, які відрізняються як за природою чутливого елемента (клітини, ферменти) [124, 125], так і за типом перетворювача: потенціометричні (здебільшого, на основі рН-чутливих польових транзисторів та амоній-чутливих мембран) [126], кондуктометричні [127-129], амперометричні [18, 130]. Біоселективним елементом сенсорних систем для визначення L-Арг найчастіше є бі-ферментні комплекси, що складаються із ко-іммобілізованих аміноксидаз L- чи D-амінокислот та ПОК [131], або аргінази I та уреазу на поверхні електродів [17]; та уреазу [132].

Аргіназа I є найпоширенішим ферментом, що використовується при розробці біосенсорів для визначення аргініну. Даний фермент каталізує розщеплення L-аргініну до L-орнітину і сечовини [133].



Проте, в результаті реакції, що каталізується L-аргіназою не утворюється електроактивних продуктів, і тому даний процес неможливо зафіксувати електрохімічно. А отже, виникає необхідність додавання разом із аргіназою іншого ферменту – уреазу, яка каталізує гідроліз сечовини, що утворилася після розщеплення аргініну, до іонів амонію, які можна далі зареєструвати за допомогою кондуктометричних, потенціометричних чи амперометричних перетворювачів.

Розробки біосенсорів для визначення L-Арг на основі кондуктометричних перетворювачів активно велися в ЛБМЕ ІМБГ НАНУ [127-129]. Біоселективним елементом даних сенсорів були бі-ферментні комплекси із ко-іммобілізованих аргінази I та уреази. В ході даних робіт використовувались різні підходи щодо іммобілізації ферментів: додавання ГА безпосередньо в ферментну мембрану [127-129]; іммобілізація в полімерній матриці ПВА-SbQ [127]; додавання в ферментну мембрану амоній-селективного цеоліту [128]. Представлені в даних роботах біосенсори володіли низькою ММВ – $5 \cdot 10^{-7}$ М L-Арг [127], а також широким ЛДВ – від 0,01 до 6 мМ [128], але основним недоліком кондуктометричних біосенсорів є висока чутливість до іонної сили та рН робочого буферного розчину, що значно ускладнює вимірювання у зразках біологічних рідин (сироватка, плазма крові).

Запропоновано потенціометричні біосенсори для аналізу L-Арг із застосуванням електроактивних полімерів, уреази та аргінази [126, 134-139]. Такі біосенсорні системи характеризуються, зазвичай, високою операційною стабільністю та швидким часом відгуку на аналіт, але головним недоліком деяких із них є низька селективність до аргініну: позитивний сигнал генерується до низки амінокислот, зокрема, глютамінової кислоти та L-лізину. Нещодавно було застосовано АДІ, виділену з *Pseudomonas putida* МТСС 1313, як біоселективний елемент потенціометричного сенсора на основі АСЕ для вимірювання концентрації L-Арг в фруктових соках [140]. Проте, низка неточностей у представлених даних щодо кінетичних параметрів сенсора не дають можливості оцінити успішність даної розробки.

Науковою групою Stasyuk *et al.* в ІБК НАНУ представлено амперометричні біосенсори для кількісного визначення L-Арг із використанням аргінази (або дріжджових клітин – продуцентів аргінази), уреази та електроосажденного поліаніліну [18, 130]. Біосенсор відзначався високою селективністю (позитивний сигнал, крім аргініну, лише на канаванін – найближчий аналог аргініну), широким ЛДВ (0,07 – 0,6 мМ), низькою ММВ (0.038 мМ) та задовільною операційною стабільністю [18]. Проте, в даних підходах було реалізовано принцип двостадійного розщеплення аргініну, і авторам не вдалося забезпечити оптимальні

умови для функціонування обох ферментів в одній мембрані, що позначилося на чутливості і стабільності сенсорів. Так, в ході роботи було встановлено, що ефективність ферментної реакції на першій стадії (розщеплення аргініну до сечовини) становила 99,2%, в той час як ефективність в другій фазі (перетворення сечовини до аміаку) була лише 44,4%. Також слід зазначити, що перед вимірюванням зразки потрібно додатково очищувати від сечовини, що вимагає додаткових реактивів (уреази), та часу.

На сьогодні існує незначна кількість повідомлень щодо розробки хімічних сенсорів для визначення L-Арг [141, 142]. Безферментні підходи базуються в основному на використанні електрокаталітичних матеріалів. Так, Martinez-Perinan *et al.* представили комбіноване електрохімічно-ВЕРХ визначення L-Арг, L-орнітину та L-цитруліну в сечі та сироватці крові людей з використанням вуглецевих нанотрубок модифікованих наночастинками гідроксиду нікелю ($Ni(OH_2)$) [143]. Проте, даний метод є ефективним тільки при визначенні групи амінокислот (аргінін-орнітин-цитрулін), і не є селективним до L-Арг окремо.

Отже, визначення вмісту L-Арг є важливим для клінічної діагностики, моніторингу процесу лікування та оцінки якості фармацевтичних препаратів. Однак, більшість відомих методів визначення L-Арг має низку недоліків, основні із яких: низька селективність, громіздкість та коштовність апаратури і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. З огляду на це, розробка нових високоселективних та чутливих біосенсорів для визначення вмісту L-Арг є дуже актуальною.

1.4. Креатинін і сечовина. Основні досягнення з розробки біосенсорних систем

Концентрації креатиніну і сечовини (рис. 1.4) у крові є основними параметрами при діагностуванні порушень роботи нирок, печінки, розвитку дистрофії м'язів, та навіть інфаркти міокарду, що робить дані метаболіти одними із найважливіших у медичній діагностиці. Хронічна хвороба нирок (ХХН) є захворюванням із високим рівнем смертності. Американська національна служба за контролем здоров'я і харчування встановила, що в 2010 році близько 16% населення країни страждало на ХХН [8]. Одним із основних наслідків, що може спричинити ХХН, є істотне підвищення рівня токсичних метаболітів в крові, а також сечовини та креатиніну, які в здоровому організмі виводяться нирками з сечею [144]. У пацієнтів, що страждають на ХХН, рівні сечовини і креатиніну можуть десятикратно підвищуватися у порівнянні зі здоровими людьми: від 1.7-8.1 мМ до 50-70 мМ для сечовини [4, 145], і від 40-150 мкМ до 1-1.4 мМ для креатиніну [3].

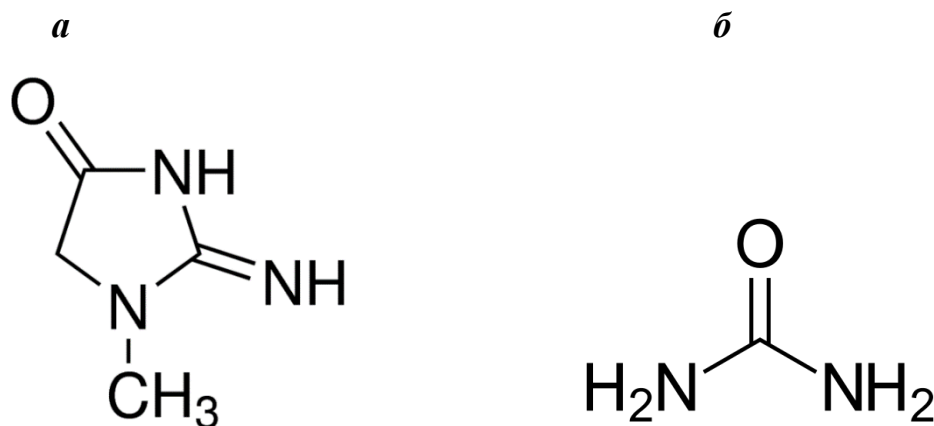


Рис. 1.4. Структурні формули креатиніну (а) та сечовини (б)

Таким чином, своєчасний моніторинг концентрації креатиніну та сечовини разом із можливістю швидкого отримання результатів вимірів є нагальною потребою, особливо для пацієнтів, що страждають на захворювання нирок [146].

1.4.1. Існуючі аналітичні методи для визначення креатиніну. Біосенсори для визначення креатиніну. Концентрація креатиніну у сироватці крові вище 106 мкМ чи нижче 40 мкМ може бути показником фізіологічного стану організму та індикатором певних патологічних станів, зокрема вона зростає при дисфункції нирок, або різко знижується при втраті м'язової маси [147].

Вперше креатинін кількісно почали вимірювати в кінці ХІХ століття, після появи методу Яффе [148]. Однак, даний підхід є досить складним, вимагає багато часу на проведення виміру і не відзначається високою точністю. Згодом було кілька спроб підвищити селективність методу Яффе, поєднуючи його із хроматографічними підходами [149]. Проте, вирішити проблему утворення забарвлених комплексів між пікриновою кислотою та цілою низкою інтерферентів, зокрема глюкозою, фруктозою, кетонними тілами, аскорбіновою кислотою та цефалоспоринами, так і не вдалося.

Розробки зручного та доступного лабораторного методу для визначення креатиніну у комплексних зразках ведуться і понині. Так, нещодавно запропоновано колориметричний підхід визначення креатиніну в сечі, в основі якого лежить синергічна координація креатиніну і сечової кислоти із іонами ртуті Hg^{2+} на поверхні золотих наночастинок. При утворенні даного комплексу за присутності креатиніну дослідний розчин змінює своє забарвлення із червоного на синій. Дану зміну фіксують за довжини хвилі 650 нм [150].

Постійна потреба в простому у використанні, зручному для клінічного застосування та дешевому аналітичному приладі для визначення креатиніну спричинила бурхливий розвиток галузі зі створення аналітичних пристроїв нового покоління – біо- та хемосенсорів.

Електрохімічні сенсори/біосенсори чутливі до креатиніну можна умовно розділити на потенціометричні та вольтаметричні/амперометричні ферментні сенсори, і безферментні сенсори [149].

Перший прототип потенціометричного біосенсора для визначення креатиніну запропонований Meyerhoff та Rechnitz, в якому використано фермент креатиніндеїміназу (КДІ), нанесений на амоній-селективний газовий електрод

[151]. В подальшому, дана концепція була удосконалена низкою наукових груп [152-155]. Удосконалення стосувалися як способу іммобілізації біорозпізнавальних компонентів, так і використання нових типів перетворювачів. Так, групою вчених з ЛБМЕ ІМБГ НАН України була створена низка сенсорів на основі КДІ та рН-чутливих іон-селективних польових транзисторів [156, 157], з можливістю використання для контролю гемодіалізу [158]. Проте, вищезгадані прототипи біосенсорів мали ряд недоліків, що притаманні більшості потенціометричних сенсорів: чутливість до інтерферуючих іонів, відносно довгий час очікування аналітичного відгуку, а також недостатній ліміт визначення аналіту при роботі з біологічними рідинами [159].

На початку 80-х розпочато роботи над створенням сенсорів для креатиніну, що використовували як перетворювач кисневий електрод Кларка [160]. В конструкції таких біосенсорів було застосовано мультиферментний комплекс, що складався із креатинінази, креатинази та оксидази (саркозиноксидази чи глутаматоксидази). В результаті ферментативної активності оксидаз із вимірювального середовища активно поглинався кисень, а зменшення концентрації кисню, в свою чергу, фіксувалося амперометрично. Проте, використання зміни концентрації кисню як аналітичного параметру детекції креатиніну суттєво обмежувало чутливість сенсорів та впливало на точність їх роботи у зв'язку з інтерферуючим впливом атмосферного кисню.

Tsuchida і Yoda використали комбінацію трьох ферментів (креатинінази (КА), креатинази (КІ) та саркозиноксидази (СО)) для амперометричного визначення креатиніну на платиновому електроді (рис 1.5) [15]. Робота цих авторів стала своєрідним каталізатором розвитку зі створення амперометричних біосенсорів для визначення креатиніну, де дослідники сконцентрувалися на вирішенні двох найбільш критичних проблем: створення підходів до ефективної іммобілізації мультиферментного комплексу на поверхні електродів і покращення аналітичних характеристик сенсорів.

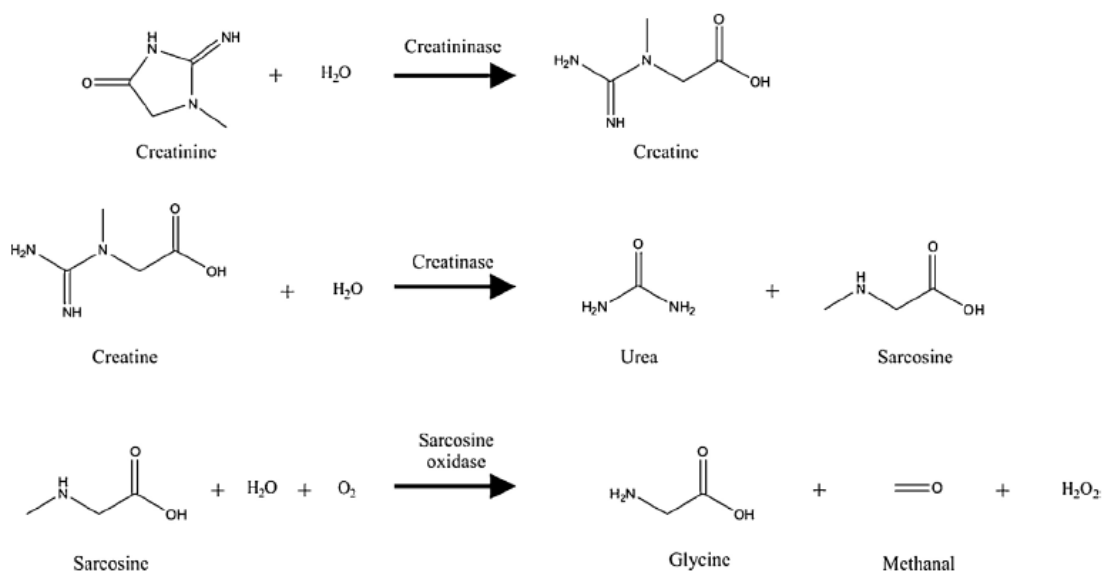


Рис 1.5. Схема ферментативних реакцій для визначення концентрації креатиніну [160]

Вищеописана мультиферментна система пізніше була використана Nguyen *et al.* у поєднанні із кисневим електродом Кларка [161]. У роботах Schneider *et al.* [162] та Erlenkotter *et al.* [163] запропоновано використовувати полі(карбамоїл)сульфонатний (ПКС) гель для іммобілізації три-ферментного комплексу. За даними дослідників, у ПКС гелі значно підвищувалась стабільність ферментів (до 3 місяців при 8 °C), а також розширювався динамічний діапазон визначення. Пізніше, для покращення роботи мультиферментних сенсорів для визначення креатиніну дослідники стали активно використовувати електроди на основі нанокомпозитних матеріалів із застосуванням наночастинок оксиду цинку, оксиду феруму та вуглецевих наноматеріалів [149], а також використовували медіатори різного походження для пришвидшення процесу перенесення електронів з ферменту на електрод при низькому прикладеному потенціалі. Ramanavicius *et al.* [164] одними із перших застосували ферроціанід як медіатор в ході розробки сенсора для визначення креатиніну, використавши первинні дані Taniguchi *et al.* та Turner *et al.* [28, 165], щодо перенесення електронів від саркозиноксидази до поверхні електроду за допомогою медіатора. Ще однією спробою покращення

роботи вищезгаданого каскаду з трьох ферментів було залучення четвертого ензиму, ПОК [16].

В роботі Chen *et al.* авторам вдалося іммобілізувати креатиніназу, креатиназу та саркозиноксидазу в композитній пасті на основі поліетиленгліколю (ПЕГ), кремнієвої пудри і гідроксиетилцелюлози [166]. Таку композитну суміш можна було друкувати безпосередньо на поверхню карбонових електродів, що забезпечило високу стабільність створеного сенсора (щонайменше 6 місяців), проте стовідсоткова ефективність трансформації креатиніну до кінцевого продукту так і не була забезпечена.

Протягом останнього десятиліття набули популярності методи безферментного електрохімічного визначення креатиніну. Було запропоновано використання хімічної взаємодії Cu^{2+} із аміногрупою креатиніну [167, 168]. Однак, використання даного підходу не дало авторам можливості забезпечити високу селективність в цілому та ставить під сумнів доцільність використання такого сенсора для аналізу складних реальних зразків (сеча, сироватка, плазма, діалізна рідина).

В результаті багаторічної праці низки дослідницьких груп, деякі із вищеописаних розробок стали комерційними продуктами: ABL800 FLEX (Radiometer As), iSTAT (iSTAT) і Stat Profile Critical Care Xpress (Nova Biomedica). Серед них Stat Profile Critical Care Xpress є найближчим до рівня повноцінного віддаленого діагностичного пристрою (Point of Care device (POC)), що забезпечує децентралізований моніторинг кількох клінічних параметрів, включаючи рівень креатиніну в крові. Проте, даний прилад є досить дорогим, та має ще один суттєвий недолік - об'єм зразка (110 мкл), що аналізується є значно більшим у порівнянні із звичайною краплею, що утворюється після проколювання шкіри пальця скарифікатором [169].

1.4.2. Біосенсори для визначення сечовини. Сечовина (карбамід, карбоніл діамід) є основним кінцевим метаболітом серед азотовмісних речовин у ссавців [170]. Утворення сечовини відбувається виключно у печінці, звідки вона потрапляє

з током крові до нирок і виводиться з організму разом із сечею. Оскільки рівень сечовини в організмі є індикатором здоров'я нирок і печінки, визначення сечовини у біологічних рідинах є одним з найчастіших завдань у клінічних лабораторіях. Також, моніторинг рівня сечовини у крові є досить важливим при проведенні гемодіалізу [171].

Для кількісного визначення сечовини існує цілий ряд методів [170, 172, 173], кожен з яких має свої переваги і недоліки, в залежності від сфери застосування. Одними із найбільш вживаних методів для кількісного аналізу сечовини є колориметричні, в основі яких лежить реакція Ферона - пряме визначення продуктів реакції між сечовиною і ДМО за присутності сірчаної кислоти [174], і є основою комерційних автоматизованих аналізаторів [173].

Методи на основі поглинання в УФ діапазоні, у поєднанні із хроматографічним [175], чи електрофоретичним розділенням [176], а також інфрачервона спектрометрія (ІЧС), є досить поширеними способами для визначення сечовини у мультикомпонентних середовищах. ІЧС технологія, наприклад, використовується в промисловості для аналізу молока [172, 177]. Проте, при використанні спектрометричних методів для аналізу рівня сечовини у складних багатокомпонентних зразках слід враховувати вплив інтерферентів, спектр поглинання яких часто перекриває спектр поглинання сечовини [174].

Не дивлячись на різноманіття методів прямого визначення сечовини за допомогою спектроскопії/колориметрії, в клінічних лабораторіях перевагу надають аналітичним тест-системам на основі ферментів та колориметричним чи електрохімічним визначенням продуктів реакції.

Уреаза є нікель-залежним металоензимом, який каталізує гідролітичне розщеплення сечовини до аміаку і вуглекислого газу (рис. 1.6) [178]. Найчастіше даний фермент виділяють із бобів сої *Canavlia ensiformis* і бактерій *Bacillus pasteurii*. Також, для роботи у середовищах, рН яких становить 3.0 – 4.0 (наприклад, для розщеплення сечовини у винах, щоб попередити утворення етил карбамату [179]), часто використовують так звану «кислу уреазу», виділену із бактерій *Lactobacillus fermentum* [174].

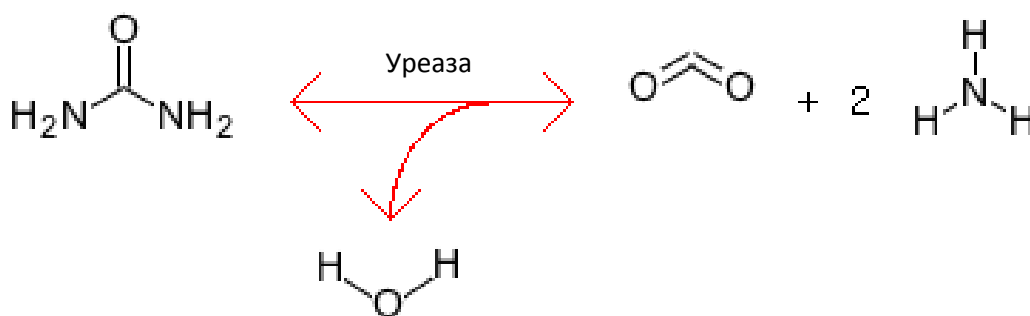


Рис 1.6. Схема ферментативного гідролізу сечовини під дією уреаз

Використання уреаз як біорозпізнавального елемента стало основою для розвитку біосенсорних підходів кількісного аналізу сечовини. Під час розробки перших прототипів ферментних сенсорів для визначення сечовини були використані потенціометричні перетворювачі: CO_2 електроди [180], АСЕ [181], іон-селективні польові транзистори (ІСПТ) [182, 183], у комбінації із іммобілізованою на їхній поверхні уреазою. Науковцями Guilbault і Montalo вперше було запропоновано ензимний потенціометричний сенсор для визначення сечовини на основі катіон-селективного скляного електроду [180, 181]. В такій конфігурації сенсор зберігав стабільність протягом трьох тижнів за кімнатної температури. Згодом, з метою покращити селективність сенсора, скляний електрод замінили на АСЕ [4, 145]. Оскільки ферментний гідроліз сечовини призводить також до зміни рН середовища, для її визначення стали широко використовувати ІСПТ [182, 183]. Так, даний підхід знайшов застосування у науковців ЛБМЕ ІМБГ НАНУ. В роботі Soldatkin *et al.* було продемонстровано лабораторний прототип біосенсора на основі ІСПТ та рекомбінантної уреаз, іммобілізованої в фотополімерній мембрані ПВА/SbQ [184]. Авторами було використано уреазу із генетично модифікованим активним центром, через що фермент мав знижену афінність до сечовини та значно вище значення K_M (200 мМ). Завдяки цьому, а також вдалому методу іммобілізації, авторам роботи вдалося розробити біосенсор, що володів досить широким динамічним діапазоном визначення сечовини (від 1 до 80 мМ). Подальші розробки потенціометричних сенсорів стосувалися в основному удосконалення методів

іммобілізації уреазу на поверхні фізичних перетворювачів для покращення стабільності та зниження порогової чутливості сенсорів [185]. Оскільки всі потенціометричні підходи мають ряд загальних недоліків (див. розділ 1.4.1), протягом останніх років ряд дослідницьких груп розпочали активно працювати над створенням амперометричних біосенсорів.

Стрімкий розвиток в розробці амперометричних біосенсорів для визначення сечовини почався із використанням електропровідних полімерів та композитів на їхній основі, таких як ПАНі, поліпірол (ППі), політіофен, та ін. Adeloju *et al.* одні з перших опублікували дані про використання уреазу, іммобілізованої в ППі матрицю, для створення амперометричного біосенсора для визначення сечовини [186, 187]. Лінійний діапазон визначення для цього сенсора становив від 50 до 250 мкМ, проте даний біосенсор був непридатний для роботи з біологічними рідинами, і вимагав попередньої складної обробки зразків для усунення інтерферентів [188].

Композити на основі ПАНі-Нафіон, осаджені на золоті [14], а також платинові електроди [18] також використовували для розробки амперометричних біосенсорів для вимірювання сечовини [189]. Експериментальні роботи останньої декади показали, що плівки з електроосадженим на металічні електроди (золоті, платинові) ПАНі у комбінації з іономером (нафіон) є високочутливими до іонів амонію [190]. Здатність ПАНі-Нафіон композиту електрохімічно взаємодіяти із іонами амонію успішно реалізована для створення амперометричних біосенсорів для визначення сечовини [14, 18, 189, 190].

Однак, електропровідні полімери використовували не тільки як амоній-чутливий шар. Так, дослідниками Hamilton і Breslin запропоновано метод одностадійної іммобілізації ферменту в плівці ППі, використовуючи сульфонований β -циклодекстрин як допант [191, 192]. В ході досліджень характеристик біосенсора авторами було виявлено, що в результаті ферментативної реакції значно зростає загальний рівень заряду біокомпозиту, а його збільшення є прямо пропорційним до концентрації сечовини у розчині, в діапазоні від 3 до 10 мМ. ММВ становила $1 \cdot 10^{-10}$ М сечовини. Проте, даний біокомпозит був досить нестабільним, оскільки втрати чутливості вже після першого вимірювання

становили 25 %, а отже даний сенсор був непридатний для багаторазового використання.

Збереження стабільності ферментів на поверхні електродів, а також забезпечення прямого перенесення електронів, що утворюються в ході ферментативної реакції, на електрод, є ще одним із основних завдань біосенсорики. Для ефективної іммобілізації уреазі авторами Ahmad *et al.* запропоновано використовувати нано-стержні оксиду цинку, синтезовані безпосередньо на поверхні вкритого шаром срібла скляного електроду [193]. На модифіковану таким чином поверхню електроду, наносили суспензію уреазі. Запропонований механізм роботи сенсора передбачав перенесення електронів, утворених в ході гідролізу сечовини, на робочий електрод. Представлений вольтаметричний біосенсор демонстрував досить високу чутливість ($41 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$), широкий ЛДВ (0,1 – 24 мМ), а також високу стабільність при зберіганні (92 % після 20 тижнів зберігання в розчині електроліту при 4°C). Проте, ММВ становила 10 мкМ, що є досить суттєвим недоліком при визначенні мікромолярних концентрацій сечовини. В роботі Dervisevic *et al.* представлено розробку амперометричного сенсора на основі фероцен-поліамідоамінного композиту, БШВНТ та уреазі [194]. Завдяки використанню БШВНТ авторам вдалося досягти високих показників чутливості ($1 \text{ мА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$) та лінійності відгуків (0,2 – 1,8 мМ сечовини). Проте, через вибраний метод іммобілізації уреазі шляхом адсорбції ферменту на поверхню електроду, сенсор різко втрачав стабільність (вже через кілька вимірювань), а ММВ становила 0,05 мМ сечовини.

Оскільки в більшості запропонованих прототипів біосенсорів саме стабільність роботи ферменту є основним лімітуючим фактором, в останні кілька років почастишали спроби створити безферментний електрохімічний сенсор для визначення сечовини. В роботі Ansari *et al.* запропоновано використовувати алюмінієвий електрод, модифікований нано-сферами оксиду олова (SnO_2) для безферментного вольтаметричного вимірювання сечовини [195]. В результаті катодного відновлення сечовини утворювався пік при -0,8 В, величина якого була пропорційна до концентрації сечовини в діапазоні від 1 до 20 мМ. Проте, даний

сенсор не відзначався високою селективністю, а ММВ становила 0,6 мМ, що не підходить для аналізу складних багатокomпонентних розчинів. Групою Nguyen *et al.* запропоновано іншу модель безферментного сенсора, в основі якого лежить електрохімічне окислення сечовини на поверхні наночастинок оксиду нікелю в лужному середовищі [196]. Представлений сенсор володів високою чутливістю ($166 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$), особливо при додаванні у склад композиту БШВНТ ($685 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ [197]). Проте, вузький лінійний діапазон (0,06 – 0,3 мМ), а також сильний інтерферуючий вплив глюкози на роботу сенсора [196], робить неможливим його використання у реальних біологічних зразках.

Таким чином, не дивлячись на стрімкий розвиток у розробці безферментних сенсорів для визначення сечовини, на даний момент представлені методи не можуть забезпечити рівень селективності ферментних біосенсорів.

Нещодавно з'явилися спроби (Reflotron Plus від компанії Roche) створити комерційно доступний прилад для персоналізованої діагностики рівня сечовини в крові людини. Даний прилад створений на основі спектрометра Boehringer Mannheim і призначений для роботи із зразками венозної крові, сироватки чи плазми об'ємом до 30 мкл [170]. Діапазон концентрацій сечовини для вимірювання даним приладом становив від 3,3 до 50 мМ. Проте, розміри (30x35x21 см), вага (5,3 кг) та висока ціна не дозволили Reflotron Plus стати масовим продуктом. Компанією Abaxis (США) в приладі Piccolo Point-of-Care Chemistry System реалізовано інший підхід, що дозволяв проводити одночасне визначення 12 речовин у 100 мкл капілярної крові. Концентрація сечовини визначалася за допомогою уреазо-глутаматдегідрогеназної реакції. Проте, як і у випадку з Reflotron Plus, даній системі притаманні аналогічні недоліки [174].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Реактиви

У роботі використовувались наступні ферменти і реактиви:

1. *Холіноксидаза* (ЕС 1.1.3.17) виділена з *Alcaligenes species*, з активністю 13,1 од.акт./мг, виробництва Sigma (Німеччина);
2. *Аргініндеіміназа* (ЕС 3.5.3.6) виділена з *Mycoplasma hominis*, з активністю 30-35 од.акт./мг; фермент отримано і очищено в Інституті біології клітини НАН України, м. Львів.
3. *Креатиніндеіміназа* (ЕС 3.5.4.21), виділена з мікроорганізмів, з активністю \geq 25 од.акт./мг, виробництва Sorachim (Іспанія);
4. *Уреаза* (ЕС 3.5.1.5), виділена із *Canavalia ensiformis* (Jack Beans), з активністю \geq 600 од.акт./мг, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
5. *Бичачий сироватковий альбумін* (БСА, фракція V) виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
6. *Тетраетилортосилікат* (ТЕОС, 98%), виробництва Fluka (Швейцарія);
7. *Хлорид холіну*, виробництва Fluka (Швейцарія);
8. *Цетилтриметиламоній бромід* (ЦТАБ), виробництва Sigma (США);
9. *Сечовина*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
10. *Креатинін* (ангідрид), виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
11. *Хлоридна кислота*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
12. *Нітрат купруму*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
13. *Нітратна кислота*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);

14. 5% *Nafion*® *perfluorinated resin solution*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
15. *Глутаральдегід* (ГА) (50% м/о водний розчин), виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
16. *Етиловий спирт* (98%), виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
17. *D-лактитол моногідрат*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
18. *Гліцерин*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
19. *Анілін*, виробництва „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина);
20. *Хлорид амонію*, виробництва Fluka (Швейцарія);
21. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,5%) виробництва Merck (Німеччина);
22. KH_2PO_4 (99,9%) виробництва Prolabo (Франція);
23. *БШВНТ-NH₂* - виробництва “Unidym, Inc.” (США);
24. *Полівінілпіролідон (ПВП)* - виробництва фірми Merck (Німеччина);

Інші реагенти, що використовувались у роботі, були вітчизняного виробництва із ступенем чистоти “х.ч.” і “ч.д.а.”.

Як робочий (електролітний) розчин використовували 1 – 200 мМ фосфатний буферний розчин (ФБ) (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) в залежності від експерименту. В окремих експериментах до складу ФБ також включали 1 – 20 мМ хлорид натрію.

2.2. Електроди

В роботі використовувалися друковані електроди (ДЕ), виготовлені з використанням вуглецевої (DS C110), золотої (C220 AT-type) чи платинової (DS C550) чорнильної пасти, виробництва DropSens (Іспанія) (рис. 2.1). Діаметр робочого електрода у всіх ДЕ становив \varnothing 4 мм. Кожен ДЕ також містив срібний електрод порівняння та вуглецевий (C110), золотий (C220) чи платиновий (C550) допоміжні електроди.

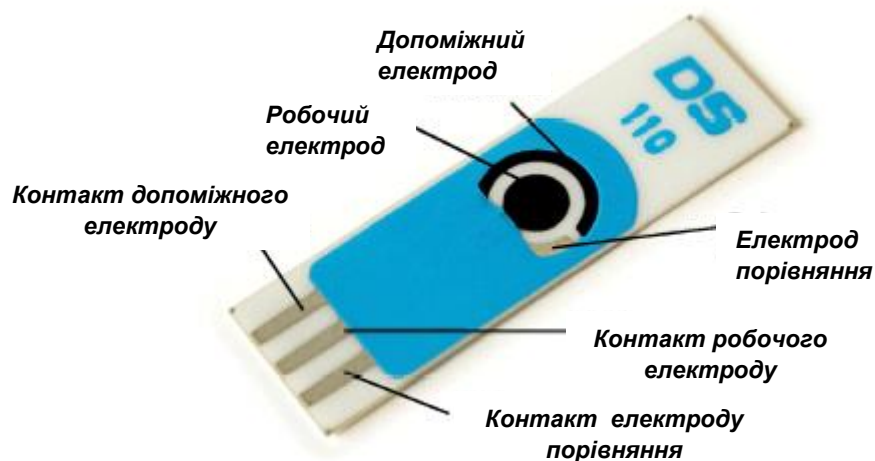


Рис. 2.1. Зовнішній вигляд вуглецевого друкованого електрода DS C110 (DropSens) (www.dropsens.com)

2.3. Методика проведення електрохімічних вимірювань

Амперометричні та вольтаметричні (циклічна вольтаметрія (ЦВ)) експерименти проводили на портативному біпотенціостаті/гальваностаті μ Stat 400 (DropSens, Іспанія), з використанням програмного забезпечення DropView 2.0 (DropSens, Іспанія) згідно інструкції виробника. Амперометричні дослідження проводили при фіксованому значенні потенціалу проти інтегрованого срібного електрода порівняння ДЕ, в комірці об'ємом 2-7 мл, наповненій буферним розчином, при постійному активному перемішуванні за допомогою магнітної мішалки ІКА (Німеччина).

Диференційне пульс-вольтаметричне вимірювання (ДПВ) проводили на приладі Autolab model PGSTAT 30 (потенціостат/гальваностат), з використанням програмного забезпечення General Purpose Electrochemical System (Eco Chemie, Нідерланди), згідно такого протоколу:

- зрівноважування: 300 с при $-0,3$ В;
- діапазон вимірювання: $0,6 - -0,5$ В;

- час модуляції: 0,15 с;
- інтервал: 0,6 с;
- крок вимірювання: 0,004 В;
- амплітуда модуляції: 0,01 В.

Імпедансний спектроскопічний аналіз проводили на приладі Autolab model PGSTAT 30 з використанням програмного забезпечення General Purpose Electrochemical System. Під час вимірювань електрохімічна комірка, заповнена електролітом, знаходилася у закритій клітці Фарадея. Експеримент проводили за постійного потенціалу від 0 до -0,45 В, в діапазоні частот від 0,1 Гц до 100 кГц, за температури 20-22 °С.

Усі вимірювання повторювали щонайменше три рази з подальшим статистичним врахуванням похибки вимірювання.

2.4. Модифікація поверхонь електродів

2.4.1. Модифікація платинового друкованого електрода (ПЕ).

Модифікація ПЕ композитом ПАНі-Нафіон проводилася таким чином: (i) на поверхню ВЕ наносили 2 мкл 2% нейтралізованого розчину нафіон (приготованого шляхом змішування 5% нафіон і 90% етанолу) і сушили 15 хв за температури 20-22 °С; (ii) шар ПАНі електроосажували на модифіковану нафіоном поверхню ПЕ у розчині аніліну (0,2 М анілін у 0,5 М НСІ) за допомогою вольтаметрії (7 циклів, -0,4 – 1,0 В за швидкості розгортання 0,02 В·с⁻¹). ПЕ, модифікований композитом ПАНі-Нафіон, ретельно промивали де-іонізованою водою та сушили на повітрі за температури 20-22 °С.

2.4.2. Модифікація вуглецевого друкованого електрода (ВЕ).

Модифікація ВЕ композитом ПАНі-Нафіон/Cu проводилася таким чином: (i) ВЕ

модифікували шаром міді за допомогою циклічної вольтаметрії (10 циклів, $-0,9 - 0,7$ В за швидкості розгортання $0,05$ В с^{-1}) у $0,05$ М нітраті міді (II), приготованому у $0,1$ М HNO_3 . (ii) ВЕ, модифікований шаром міді, промивали де-іонізованою водою та висушували кімнатної температури протягом 15 хв, а далі наносили 2 мкл 2% нейтралізованого розчину нафіону (приготованого шляхом змішування 5% нафіон і 90% етанолу) та повторно висушували протягом 15 хв за кімнатної температури. (iii) На модифіковану Нафіон/Cu поверхню електроду наносили ПАНі шляхом електроосадження із розчину аніліну ($0,2$ М анілін у $0,5$ М HCl) за допомогою циклічної вольтаметрії (10 циклів, $-0,4 - 1,0$ В за швидкості розгортання $0,05$ В с^{-1}). ВЕ, модифікований композитом ПАНі-Нафіон/Cu, ретельно промивали де-іонізованою водою та висушували на повітрі при кімнатній температурі 15 хв.

2.5. Морфологічний та елементний аналіз модифікованих поверхонь електродів

Морфологічний аналіз модифікованих поверхонь електродів на всіх стадіях проводили за допомогою скануючого електронного мікроскопа (SEM) JEOL JSM 6390 LV (Jeol Ltd., Японія), застосовуючи різну кратність збільшення і підвищуючи напругу (із зворотнім розсіюванням електронів і вторинним зображенням).

Визначення кожного елементу у зразках проводили за допомогою енергодисперсного рентгено-спектрального (ЕРС) мікроаналізатора Inca x-act (Oxford Instruments, Велика Британія).

Експерименти із вивчення процесів фотоemisії проводились використовуючи спектрометр Scienta ESCA 200 (Scienta Omicron, Німеччина) в надглибокому вакуумі під тиском 10^{-10} мбар. Для рентгенної фотоелектронної спектроскопії (РФС) комірка для вимірювань була оснащена монохромним джерелом Х-променів, що забезпечував генерацію фотонів з $1486,6$ еВ. Дослідження РФС були проведені за рахунок прив'язки до піку $4f_{7/2}$ -рівня чистого Au з напівшириною $0,65$

eВ. Всі спектри були записані при куті фотоemisії 0° (нормальна emisія) при кімнатній температурі.

2.6. Імобілізація ферментів

2.6.1. Імобілізація ХОД в SiO_2 на поверхні золотого друкованого електрода (ЗЕ). Силікатну плівку, що містила ХОД, осаджували на поверхню ЗЕ електрохімічно, за методикою, описаною раніше [198, 199], із незначними модифікаціями: гідроліз ТЕОС проводили за активного перемішування суміші такого складу: ТЕОС, H_2O і 0,01 М HCl у об'ємному співвідношенні 1,4:1:1,73 протягом 8 год. До 50 мкл приготованого золю почергово додавали певну кількість ЦТАБ (більш детально у розділі з результатами), 30 мкл 67 мМ ФБ (рН 6,0) і 10 мкл розчину ХОД ($10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Після ретельного і обережного перемішування, 80 мкл отриманої суміші наносили на поверхню ЗЕ, таким чином, щоб покрити всі три електроди (робочий, допоміжний і електрод порівняння). Для завершення процесу формування золь-гель плівки, до ЗЕ прикладали потенціал -1,1 В протягом 20 с (Рис. 3.1).

Після утворення плівки, вкриті золев електроди залишали на 5 хв, після чого обережно промивали деіонізованою водою та висушували за кімнатної температури протягом 15 хв. Модифікований таким чином електрод (ЗЕ- SiO_2 -ХОД) зберігали до використання у 100 мМ ФБ (рН 7,5) при $+4^\circ\text{C}$.

2.6.2. Імобілізація аргініндеімінази (АДІ) на поверхні ПЕ, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон. Для створення L-Арг-селективної мембрани готували суміш, що містила 18 мкл розчину АДІ (300 од.акт./мл АДІ у 1 М NaCl і 20 мМ ФБ, рН 7,2) та 2 мкл 50 % БСА у 20 мМ ФБ, рН 7,2. 2 мкл утвореного розчину АДІ-БСА наносили на поверхню ПАНі-Нафіон/ПЕ та залишали у насичених випарах ГА на 35 хв., після чого висушували протягом 1 год. при 4°C .

Після висушування готові біоелектроди промивалися щонайменше 3 рази 20 мМ ФБ, рН 7,4 для очищення від можливих залишків ГА у АДІ-БСА мембрані. Модифіковані біо-селективними мембранами електроди зберігали до використання у 50 мМ ФБ, рН 7,4 при 4 °С.

2.6.3. Імобілізація КДІ і уреазу на поверхні ВЕ, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон/Cu. Вихідні розчини ферментів, що використовували у роботі, готували на 20 мМ ФБ, рН 7,4, і містили 10 % уреазу і 20% креатиніндеїміназу (КДІ), відповідно. Далі розчин відповідного ферменту змішували у відповідній пропорції із сумішшю, що містила розчинений у 20 мМ ФБ БСА, лактитол і гліцерол до таких кінцевих концентрацій компонентів у сумішах: 5% КДІ чи 2% уреазу, 5 % БСА, 2% лактитол, 5% гліцерол. 2 мкл відповідної ферментної суміші наносили на поверхню робочого електроду, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон/Cu, та витримували у ексікаторі з насиченими випарами ГА (25% м/о) протягом 25 хв. для завершення процесу імобілізації, а потім висушували протягом 1 год при 4 °С та промивали 20 мМ ФБ рН 7,4 щонайменше 3 рази. До використання біофункціоналізовані електроди зберігались у 20 мМ ФБ рН 7,4 у холодильній камері (4 °С).

2.6.4. Імобілізація ХОД з використанням багат шарових вуглецевих нанотрубок на поверхні золотих друкованих електродів. Чутливу матрицю біосенсора формували шляхом нанесення 1,7 мкл відповідної вихідної суміші на поверхню ЗЕ. Імобілізацію проводили у насичених парах ГА протягом 35 хв. після чого залишали не менше ніж на 1 годину при 4°С для стабілізації структури мембран. Після цього мембрани тричі відмивали 25 мМ ФБ (рН 7,9).

Суміш для синтезу мембран містила 0,5% ХОД, 8% БСА, 5% гліцерину, 0,2% декстрану, 2% лактітолу, БШВНТ-NH₂ (0-2%). Для експериментів застосовували такі суміші для синтезу мембран:

БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(2%): 5 мкл БСА (28,5 мг/50 мкл); 4,5 мкл БШВНТ-NH₂ (4%); 3,6 мкл декстрану (2 мг/100 мкл); 3,6 мкл лактітолу (20 мг/100 мкл); 13,9

мкл фосфатного буферу (25 мМ, рН 7,9); 3,6 мкл ХОД (2,5 мг /50 мкл); 1,75 мкл гліцерину.

БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(0,5%): 5 мкл БСА (28,5 мг/50 мкл); 2,25 мкл БШВНТ- NH_2 (4%); 3,6 мкл декстрану (2 мг/100 мкл); 3,6 мкл лактитолу (20 мг/100 мкл); 16,15 мкл фосфатного буферу (25 мМ, рН 7,9); 3,6 мкл ХОД (2,5 мг/50 мкл); 1,75 мкл гліцерину.

БСА-ХОД-Д-Л-ПВП: 5 мкл БСА (28,5 мг/50 мкл); 3,6 мкл декстрану (2 мг/100 мкл); 3,6 мкл лактитолу (20 мг/100 мкл); 13,9 мкл фосфатного буферу (25 мМ, рН 7,9); 4,5 мкл ПВП; 3,6 мкл ХОД (2,5 мг/50 мкл); 1,75 мкл гліцерину.

БСА-ХОД-Д-Л: 5 мкл БСА (28,5 мг/50 мкл); 3,6 мкл декстрану (2 мг/100 мкл); 3,6 мкл лактитолу (20 мг/100 мкл); 18,4 мкл фосфатного буферу (25 мМ, рН 7,9); 3,6 мкл ХОД (2,5 мг/50 мкл); 1,75 мкл гліцерину.

БСА-ХОД: 5 мкл БСА (28,5 мг/50 мкл); 25,6 мкл фосфатного буфера (25 мМ, рН 7,9); 3,6 мкл ХОД (2,5 мг/50 мкл); 1,75 мкл гліцерин.

БСА-Д-Л: 5,5 мкл БСА (28,5 мг /50 мкл); 3,6 мкл декстрана (2 мг /100 мкл); 3,6 мкл лактитола (20 мг/100 мкл); 21,2 мкл фосфатного буфера (25 мМ, рН 7,9); 1,75 мкл гліцерин.

До використання функціоналізовані ХОД електроди зберігали у 100 мМ ФБ рН 7,9 при 4°C.

2.7. Вимірювання в реальних зразках

2.7.1. Вимірювання в зразках плазми і сироватки крові людей. Зразки плазми крові здорових волонтерів отримано у відділі Переливання крові, лікарні Феофанія (м. Київ). Зразки сироватки крові пацієнтів, що страждають на ХХН, надані Київським дослідницько-практичним центром нефрології і гемодіалізу (Київ, Україна) з дотриманням правил і норм етики у науці, та захисту персональних даних згідно відповідних Законів та підзаконних актів України,

принципами, що викладені в Гельсінській декларації, та інструкціями Етичного Комітету Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

2 мл венозної крові забирали в охолоджену пробірку і поміщали в центрифугу для осадження клітин крові (1500 g протягом 10 хв). Вільний від клітин крові супернатант відібирали в чисту пробірку і зберігали в холодному контейнері з льодом протягом всієї процедури забору зразків та вимірювань.

Аналіз зразків сироватки на вміст креатиніну чи сечовини за допомогою виготовлених амперометричних біосенсорів проводили за кімнатної температури, використовуючи метод стандартних додавань. Амперометричні відгуки сенсора фіксували у потенціостатичному режимі при значенні потенціалу -0,35 В проти Ag/AgCl електроду порівняння. Зразок сироватки додавали безпосередньо у вимірювальну комірку в такій пропорції, щоб досягти розведення зразка в 100-500 разів під час визначення рівнів креатиніну, 1000-2000 разів під час вимірювання концентрації сечовини. При вимірюванні концентрації L-аргініну в зразках плазми крові розведення було в 10-100 разів. Концентрацію аналітів в розведеному зразку сироватки крові розраховували шляхом продовження отриманої калібрувальної кривої до точки, в якій значення вісі Y є рівним 0. Точка, в якій калібрувальна крива перетинає вісь X відповідає значенню концентрації, утворених в результаті ферментативної реакції, іонів амонію у розведеному зразку сироватки (C_{DS} , мМ). Щоб розрахувати реальну концентрацію креатиніну/сечовини в зразку сироватки крові (C_{RS} , мМ), використовували таке рівняння:

$$C_{RS}, \text{ мМ} = C_{DS}, \text{ мМ} \times n,$$

де n – це коефіцієнт розведення зразка.

Порівняльні дані щодо концентрації креатиніну/сечовини в досліджуваних зразках сироватки крові отримано комерційною медичною лабораторією (використано стандартні ферментні колориметричні методи на основі креатиніназної, креатинамідогідролазної і саркозиноксидазої ензимних реакцій для визначення креатиніну, та уреазної реакції для аналізу сечовини). Порівняльні дані

щодо концентрації L-аргініну у зразках плазми крові отримано за допомогою аналітичного флуориметричного набору «Аргітест» [123].

2.7.2. Приготування зразків дитячого харчування та їх аналіз на вміст холіну. Виділення холіну, та очищення харчової суміші від білків молока проводили за методом, опублікованим в роботі Wollard *et al.* [46]. Зразок масою 4 г поміщали у хімічну склянку, в яку поступово додавали 20 мл 1 М НСІ. Склянку накривали предметним скельцем і гріли на водяній бані протягом 4 годин при температурі 60-70 °С. Після охолодження суміш фільтрували за допомогою фільтрувального паперу. Фільтрат титрували 1 М NaOH до значення рН 2,0-3,0. До отриманої суміші вносили 50 мг MnO₂ та перемішували протягом 15 хв на магнітній мішалці. Отриману суспензію центрифугували при 3000 об./хв протягом 5 хв, а отриману надосадову рідину переливали у 50 мл мірну колбу і доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Кількість холіну в отриманому розчині визначали амперометрично методом стандартних додавань (Див. Розділ 2.7.1).

2.8. Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних виконували з використанням програмного забезпечення Origin 8 (OriginLab, США) та Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Експериментальні дані представлені як середні арифметичні значення із зазначенням стандартної похибки середнього значення.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛІНУ НА ОСНОВІ ЗОЛОТИХ ДРУКОВАНИХ ЕЛЕКТРОДІВ

Одним із найважливіших етапів під час розробки ферментного біосенсора є інтегрування ферменту з перетворювачем сигналу (трансд'юсером). Ефективність здійснення даного процесу в подальшому найбільше впливає на такі показники як активність ферменту в мембрані, стабільність роботи біосенсора і його аналітичні характеристики, такі як динамічний діапазон, чутливість, час відгуку. В останні десятиліття для підвищення ефективності біоаналітичних приладів все частіше застосовують наноматеріали. Так, наночастинки оксидів металів, вуглецеві нанотрубки стали невід'ємною складовою нанокompatитних електродів, що дало змогу покращити роботу біосенсорних приладів [200]. Таким чином, вдалося проводити вимірювання окислення перекису водню на електроді при низьких значеннях потенціалу [149], завдяки збільшенню питомої площі поверхні та каталітичним властивостям наноматеріалів. Висока біосумісність вуглецевих наноматеріалів дозволяє застосовувати їх як структурний елемент для іммобілізації біомолекул в біосенсорній матриці.

Використання силікатних композитів як структурних елементів біоселективних мембран також відкриває нові можливості покращення аналітичних характеристик амперометричних біосенсорів [72, 74]. Використовуючи золь-гель і метод електрохімічного нанесення (ЕХН), можна досягти високих показників активності для іммобілізованих ферментів (без

надмірного пошкодження структури ферменту), витративши при цьому мінімальну кількість часу і реактивів.

Таким чином, для створення високочутливого та стабільного біосенсора для визначення холіну нами застосовано два різні підходи щодо іммобілізації ХОД (рис. 3.1): *а*) використання БШВНТ-NH₂ як структурного елементу БСА-ХОД мембрани; *б*) іммобілізація ХОД у силікатній плівці за допомогою ЕХН.

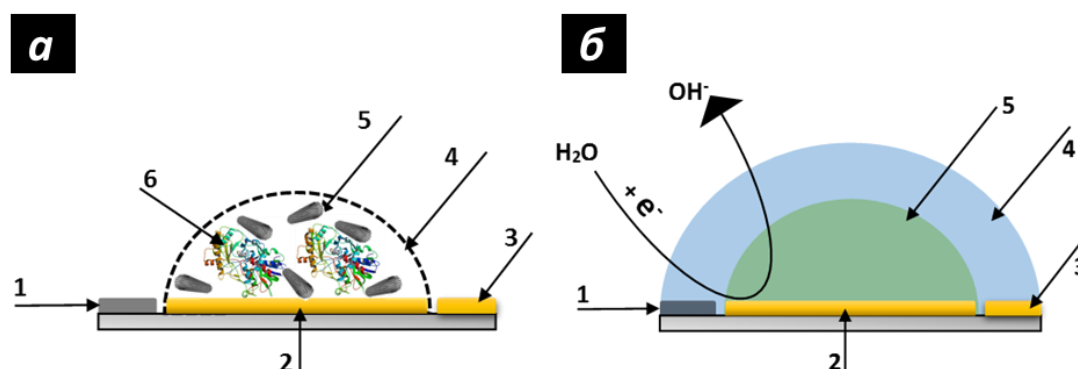


Рис. 3.1. Схематичне зображення процесів іммобілізації ХОД на поверхні ЗЕ: *а* – схема ферментної мембрани з іммобілізованою у ГА випарах ХОД за присутності БШВНТ-NH₂ (1 – срібний псевдо-електрод порівняння; 2 – ЗЕ; 3 – золотий допоміжний електрод; 4 – БСА мембрана; 5 - БШВНТ-NH₂; 6 - ХОД); *б* – схема процесу ЕХН на поверхні ЗЕ (1 – срібний псевдо-електрод порівняння; 2 – ЗЕ; 3 – золотий допоміжний електрод; 4 – силікатний золь-гель; 5 – зона високого рН)

Ефективність методів іммобілізації, а також робота виготовлених біосенсорів, досліджувались шляхом вимірювання таких показників як чутливість, лінійний діапазон, ММВ, стабільність при зберіганні.

3.1. Використання вуглецевих нанотрубок для іммобілізації ХОД в БСА мембрані

Нещодавно в нашій лабораторії розроблено метод суспендування БШВНТ-NH₂ в ПВП [201]. Отримана суспензія успішно використовувалася для модифікації

ферментної суміші глюкозооксидази (ГОД) і подальшої іммобілізації ГОД у випарах ГА на поверхні золотих електродів. Встановлено, що завдяки використанню амінованих нанотрубок в ферментній біоматриці відбувається полегшене перенесення електронів. Встановлено, що оптимальною концентрацією БШВНТ у мембрані є 1-2%. Концентрація БШВНТ вище 2% в мембрані сприяло зростанню величини амперометричного сигналу, але водночас значно зростали фонові шуми, що негативно впливало на точність результатів та ускладнювало вимірювання низьких концентрацій глюкози.

В даному розділі представлені результати досліджень впливу БШВНТ-NH₂ у складі біорозпізнавальної мембрани на основі ХОД, декстрану (Д) і лактитолу (Л) на чутливість та стабільність біосенсора. Методами циклічної вольтаметрії та амперометрії проведено дослідження характеристик біосенсорів на основі ЗЕ та мембран БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(2%), БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(0,5%), БСА-ХОД-Д-Л-ПВП, БСА-ХОД-Д-Л, БСА-ХОД. Встановлено (рис. 3.2 *а*), що включення БШВНТ-NH₂ в склад мембрани призводить до зростання загального рівня струму і чутливості біосенсора, що може бути пов'язано із збільшенням активної площі електроду. Внесення холіну у вимірювальну комірку (рис. 3.2 *б*) не спричиняло зміни катодного струму, але при цьому суттєво зростає анодний струм в діапазоні від 0,4 до 0,8 В, зумовлений окисленням перекису водню.

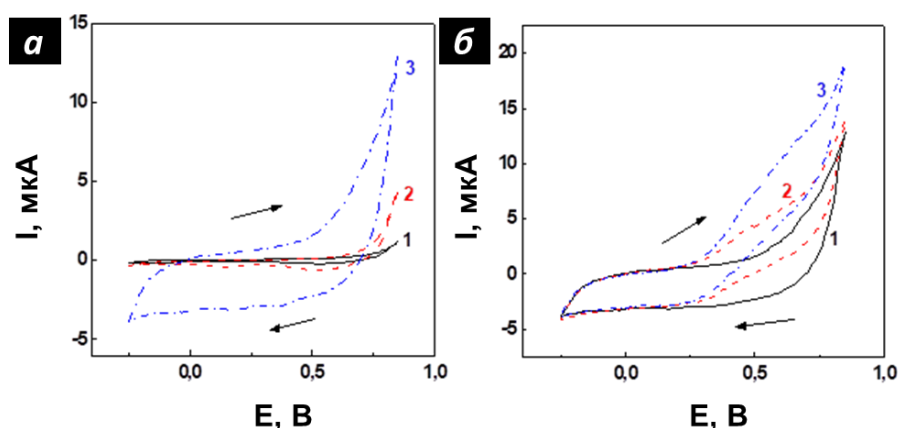


Рис. 3.2. Циклічна вольтаметрія ЗЕ на різних стадіях модифікації: *а* – ЗЕ (1); ЗЕ-БСА-ХОД (2); ЗЕ-БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ-NH₂(2%) (3); *б* – ЦВ відгук ЗЕ-БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ-NH₂(2%) (1) на додавання 0,1 мМ (2) і 0,2 мМ (3) NH₄Cl

На рис. 3.3 наведено калібрувальні криві визначення холіну, побудовані на основі даних амперометричних вимірювань. Найнижчий рівень амперометричних відгуків на холін спостерігали на ЗЕ-БСА-ХОД, оскільки така конфігурація не дозволяє забезпечити активність та стабільність ХОД. Додавання декстрану та лактитолу у склад ферментної мембрани призводить до суттєвого зростання чутливості біосенсора завдяки стабілізуючим властивостям цих сполук щодо оксидоредуктаз [202]. За присутності ПВП – основного компонента для суспендування БШВНТ-NH₂, – відгуки біосенсора для визначення холіну різко знижуються до рівня мембран БСА-ХОД, що свідчить про деструктивний вплив ПВП на ХОД. Додавання БШВНТ-NH₂(0,5%) в склад ХОД-мембрани не впливає на роботу біосенсора в порівнянні із ЗЕ-БСА-ХОД-Д-Л-ПВП. Проте, при збільшенні концентрації БШВНТ-NH₂ до 2% чутливість біосенсорів зростає до рівня БСА-ХОД-Д-Л. Так, чутливість ЗЕ модифікованих БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ-NH₂(2%) складала $523 \pm 34 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^2$, ММВ становила 5 мкМ, а ЛДВ – від 0,03 до 0,2 мМ. В даному випадку, завдяки більшій концентрації БШВНТ-NH₂ вдалося нейтралізувати вплив ПВП та максимально зберегти нативну структуру ХОД.

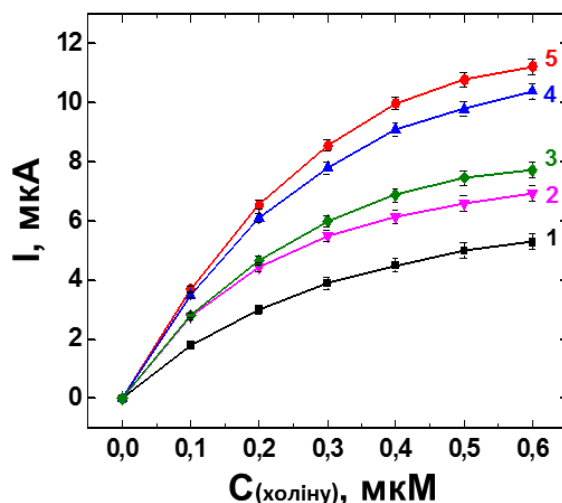


Рис. 3.3. Калібрувальні криві визначення холіну для біосенсорів на основі ЗЕ та ХОД: 1) БСА-ХОД; 2) БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(0,5%); 3) БСА-ХОД-Д-Л-ПВП, 4) БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(2%), 5) БСА-ХОД-Д-Л. Виміри проводили у 25 мм ФБ, рН 7,9, за кімнатної температури. $E = 0,68 \text{ В}$

Не зважаючи на те, що чутливість біосенсорів, біорозапінзавальні мембрани яких містили лактитол і декстран, та не містили нанотрубок чи ПВП, була дещо вищою, проте, вони виявилися нестабільними. Так, протягом двох тижнів біосенсори втрачали близько 80% чутливості при зберіганні у фосфатному буфері (25 мМ, рН 7,9) за температури 4°C (рис. 3.4).

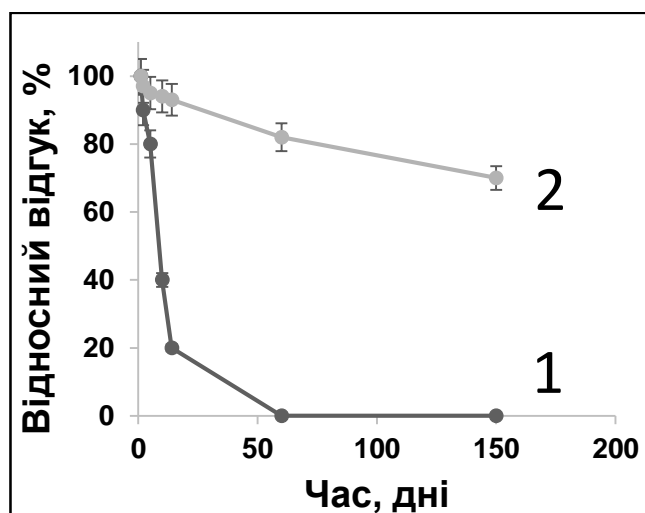


Рис. 3.4. Стабільність біосенсорів на основі БСА-ХОД-Д-Л (1), БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ(2%) (2). Відгуки біосенсорів на додавання 0,3 – 0,6 мМ хлориду холіну. Умови зберігання: 25 мМ ФБ рН 7,9 при +4°C. Умови під час вимірювань: $E = 0,68$ В проти Ag/AgCl у 25 мМ ФБ рН 7,9

В той самий час, мембрани, що містили нанотрубки, зберігали стабільність та не втрачали чутливості впродовж 14 днів, а також зберігали близько 70% чутливості після 5 місяців зберігання (рис. 3.4). Операційна стабільність становила 50 вимірювань. Отримані дані свідчать, що застосування БШВНТ-NH₂ як структурного елементу біоселективної мембрани сприяє суттєвому підвищенню її стабільності, що, імовірно, може бути пов'язане із збільшенням кількості ковалентних (NH₂-NH₂) зв'язків в мембрані та зменшенню набрякання мембран в буфері, що перешкоджає вимиванню ферменту в процесі зберігання.

Слід, щоправда, зазначити, що, не зважаючи на відмінні показники стабільності і чутливості, отримані біосенсори характеризувалися досить вузьким лінійним діапазоном. Використання нанотрубок також призводило до збільшення

фонового шуму під час вимірювань, що ускладнювало визначення холіну в концентраціях нижче 10^{-5} М.

3.2. Імобілізація ХОД у SiO_2 -плівці, осадженій на поверхню ЗЕ

З метою подолання недоліків вищеописаних способів імобілізації ХОД проведено низку експериментів із використанням силікатних золь-гелів і методу ЕХН для імобілізації ХОД і розробки амперометричного біосенсора для визначення холіну.

На рис. 3.1 б представлено схематичне зображення процесу електрохімічного нанесення золь-гелю на робочий електрод. Робочий, допоміжний та електрод порівняння, локалізовані на невеликій площі радіусом 4 мм, було повністю покрито SiO_2 золем об'ємом 80 мкл. За даних умов електроди фактично закорочені в електропровідній золь-матриці, що дозволяє проводити електроліз. В результаті електролізу на поверхні робочого електроду утворювалася тонка гомогенна плівка золь-гелю. Варто зазначити, що поверхня допоміжного електроду завжди залишалася незмінною – золь-гель на поверхню допоміжного електроду не осаджувався. Електрохімічні характеристики немодифікованих і модифікованих золь-гелем ЗЕ досліджено за допомогою ЦВ (рис. 3.5).

Холін окислюється до бетаїнового альдегіду активним центром ХОД, який, в свою чергу, відновлюється за рахунок розчиненого у електроліті кисню з наступним утворенням перекису водню. Кількість використаного кисню чи утвореного перекису водню можна використати для оцінки ферментативної активності ХОД, імобілізованої в золь-гель. Визначення кількості утвореного перекису водню є найбільш зручним аналітичним підходом. Крива 1 на рис. 3.5 а відображає циклічну вольтамограму, отриману при вимірюванні на немодифікованому ЗЕ. При значенні потенціалу $-0,26$ В утворювався пік відновлення кисню.

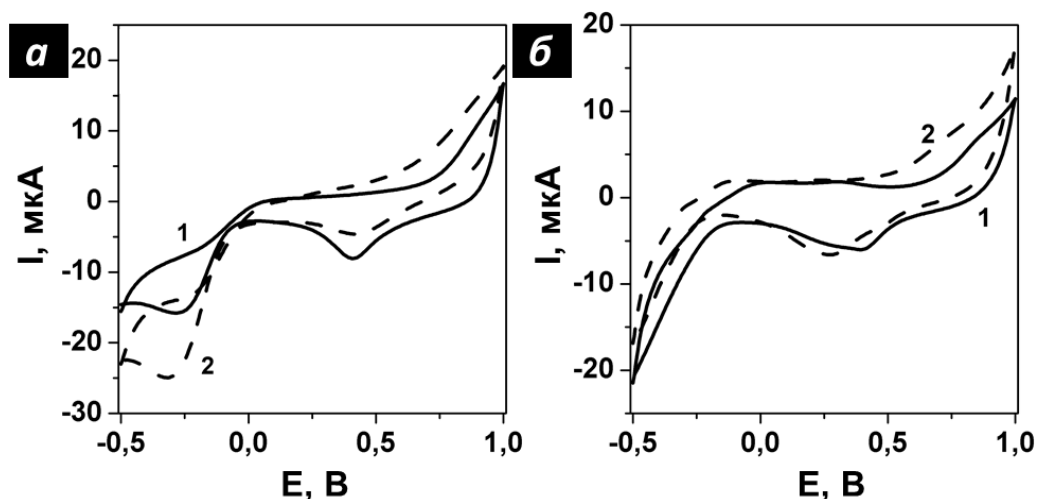


Рис. 3.5. Циклічні вольтамограми ЗЕ: **а** – немодифікований ЗЕ за відсутності (1) та присутності (2) 1 мМ H_2O_2 ; **б** – ЗЕ- SiO_2 -ХОД за відсутності (1) та присутності (2) 1 мМ холіну. Умови під час вимірювань: ФБ рН 7,5, шв. скан. $0,05 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$

При подальшому анодному скануванні до 1 В спостерігалася зміна струму в зв'язку із процесами електролізу розчину та окислення поверхні ЗЕ. Під час зворотного сканування відбувалося відновлення оксиду золота при 0,4 В. Після модифікації поверхні електроду, позиції піків відновлення оксиду золота під час ЦВ суттєво не змінювались (рис. 3.5 **а** та **б**, криві 1, пік відновлення при 0,4 В). Даний факт свідчить про те, що електрод порівняння не зазнав змін під час модифікації поверхні ЗЕ. Також варто зазначити, що утворення оксидів золота неможливо уникнути, і вони, в свою чергу, відіграють важливу роль у процесі окислення перекису водню [203]. Після додавання перекису водню у вимірювальну комірку спостерігалася зростання катодного та анодного струмів у зв'язку із відновленням та окисленням H_2O_2 , відповідно.

На рис. 3.5 **б** представлено електрохімічний відгук ЗЕ- SiO_2 -ХОД електроду за відсутності (крива 1) та присутності (крива 2) 1 мМ холіну. Дані вольтамограм свідчать, що осаджена SiO_2 -плівка істотно не впливала на провідність та роботу електроду завдяки своїй незначній товщині та пористості, що раніше також було продемонстровано для інших типів електродів [198, 199, 204, 205]. Через наявність

золь-гель біокомпозиту на поверхні ЗЕ, пік відновлення кисню зміщувався вліво (крива 1). Дане зміщення спричинене зміною структури поверхні електроду.

Внесення холіну до вимірювальної комірки спричиняє зростання анодного струму у діапазоні від 0,3 до 1,0 В (рис. 3.5 б, крива 2), що зумовлено окисленням H_2O_2 , який утворюється в ході ферментативної реакції. Струм, що відповідає процесу відновлення кисню, знижується внаслідок споживання останнього під час реакції ХОД.

При амперометричному вимірюванні на ЗЕ-SiO₂-ХОД після додавання холіну спостерігався чіткий і стабільний відгук пропорційний до концентрації холіну у розчині (рис. 3.6, крива 2).

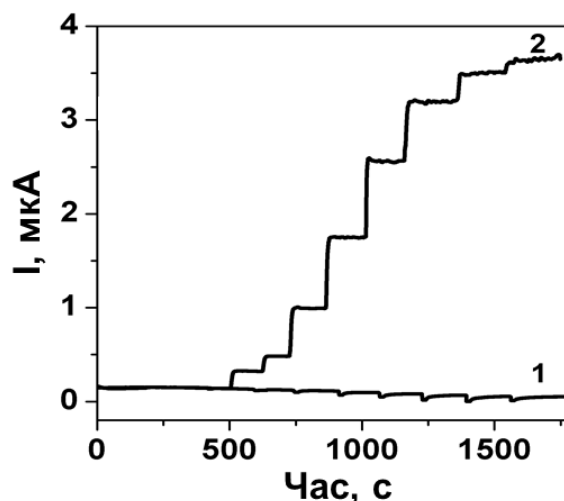


Рис. 3.6. Амперометричний відгук ЗЕ-SiO₂ (1) та ЗЕ-SiO₂-ХОД (2) у відповідь на внесення холіну. Концентрації холіну у послідовності внесення: 0,01; 0,02; 0,06; 0,14; 0,30; 0,62; 1,26; 2,06 мМ. $E = 0,7$ В

При вимірюваннях на електроді, модифікованому у такий же спосіб, але без ферменту (ЗЕ-SiO₂), жодної зміни струму за присутності холіну не відбувалося (рис. 3.6, крива 1). Дані результати свідчать також про збереження активності ХОД під час іммобілізації.

3.3. Оптимізація параметрів електрохімічного нанесення та складу золь-гелю

Відомо, що потенціал, прикладений до електродів під час формування SiO_2 -плівок шляхом ЕХН, впливає на швидкість генерації гідроксид-іонів (призводить до суттєвої зміни рН), а також на швидкість поліконденсації прекурсора і структуру плівки. Нами досліджено вплив величини прикладеного потенціалу під час ЕХН за незмінної тривалості процесу (20 с) [199] на відгук ЗЕ- SiO_2 -ХОД до холіну. Найвищий відгук ЗЕ- SiO_2 -ХОД зафіксовано при значеннях потенціалу від -1,1 до -1,2 В ($6 - 10 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1}$). Менше значення потенціалу при ЕХН ($< -1,0 \text{ В}$) призводило до значно нижчого відгуку електроду (більше ніж на один порядок у порівнянні із плівкою, утвореною при -1,1 В). Даний ефект був спричинений недостатньою швидкістю генерації гідроксид-іонів на поверхні електроду, що призводило до занадто повільної поліконденсації силану і малоефективної іммобілізації ферменту (недостатньо осадженого золь-гель матеріалу). Більш високе значення потенціалу під час ЕХН (до -1,3 В) також призводило до різкого зниження відгуку біосенсора ($1,25 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1}$), що пояснюється утворенням великої кількості гідроксид-іонів, в результаті чого формувалася досить щільна і нерівномірна SiO_2 -плівка, а також відбувалося сповільнення дифузії та зниження чутливості сенсора. Отже, оптимальним значенням потенціалу при ЕХН SiO_2 -плівки визначено -1,1 В, і дане значення використовувалося в усіх наступних експериментах. Основним недоліком запропонованого біосенсора (ЗЕ- SiO_2 -ХОД) було зниження відгуку на холін після кількох годин вимірювань. Причинами цього могли стати витік ферменту із біокомпозитної плівки або втрата активності ХОД. Механічна стабільність плівки та її адгезія до поверхні електроду також були незадовільними через утворення тріщин на поверхні плівки. Раніше встановлено, що поверхнево-активні речовини катіонної природи (наприклад, ЦТАБ) в розчині для ЕХН значно покращують морфологічні характеристики та адгезію SiO_2 -плівок до металічних субстратів [206]. Також відомо, що ЦТАБ впливає на пористість силікатної плівки, що

призводить до утворення мезопористої плівки із гомогенною структурою [205]. В даному випадку амфіфільні молекули ЦТАБ діють як розчинник, що допомагає отримати рівномірне поширення молекул ферменту всередині силікатної плівки. Беручи до уваги вищеописані дані, було досліджено вплив ЦТАБ на стабільність та електрохімічні характеристики ЗЕ-SiO₂-ХОД. Показано, що додавання ЦТАБ значно підвищує стабільність SiO₂-ХОД плівки (табл. 3.1), а його оптимальна концентрація складає 12±1 мМ. За таких умов біосенсор зберігав більше 50% від початкової активності впродовж 3 тижнів безперервних вимірювань, тоді як плівки, виготовлені із вищими або нижчими концентраціями ЦТАБ, втрачали до 80% активності вже впродовж 8 днів. За наявності у плівці ЦТАБ, операційна стабільність біосенсора становила 30 вимірювань, стабільність при зберіганні без втрат чутливості – 3 доби.

Таблиця 3.1.

Відносний відгук ЗЕ-SiO₂-ХОД до холіну після 21 дня в залежності від концентрації ЦТАБ у силікатному золі, $n = 4$

№	Концентрація ЦТАБ, мМ	Відносний відгук, S, %
1	0	< 1
2	6±0.5	10
3	12±1	53
4	21±2	19
5	42±2	9

Примітка. * - відносний відгук розраховано як $S = (S_{21}/S_1) \times 100\%$, де S_1 – відгук електроду до субстрату після модифікації (мкА·мМ⁻¹); S_{21} – відгук електроду до субстрату через 21 день після модифікації (мкА·мМ⁻¹)

Оптимальним значенням рН для виготовленого біосенсора є 7,5 – 7,8, що відповідає значенню рН, при яких ХОД має найвищу активність у розчині [46, 207]. Фермент, іммобілізований у SiO₂-плівці, зберігав свою активність значно краще,

ніж у буферному розчині, де втрата активності становила майже 50% протягом 10 годин за кімнатної температури.

3.4. Аналітичні характеристики біосенсора

Імобілізована у SiO_2 -плівку ХОД демонструвала кінетичні властивості типові до механізму Міхаеліса-Ментен, із насиченням сигналу у відповідь на внесення високої концентрації холіну. Позірну константу Міхаеліса-Ментен ($K_M^{\text{поз}}$) розраховували із рівняння Лайнуівера-Берка, враховуючи показники зміни струму, спричинені ферментативною активністю. Встановлене значення $K_M^{\text{поз}} = 0,22$ мМ. Дане значення є дещо нижчим за попередньо отримані для ХОД, імобілізованої у плівці ПДДА (0,42 мМ) [13] чи в ГА-ПВА (0,78 мМ) [12] і значно нижче ніж значення для ХОД у розчині (0,87 мМ) [207]. Отримані дані свідчать, що ХОД, імобілізована у SiO_2 -плівці, має кращу афінність до субстрату, а калібрувальна крива була лінійною в діапазоні концентрацій холіну від 0,02 до 0,6 мМ (рис. 3.7).

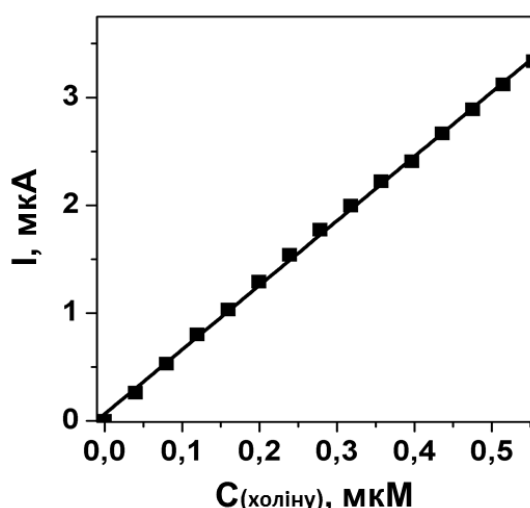


Рис. 3.7. Калібрувальна крива визначення холіну для 3E-SiO₂-ЦТАБ-ХОД. $E = 0,7$ В, $n = 3$

Рівняння лінійної регресії: ΔI (мкА) = (0,06±0,01) + (5,97±0,05) C (мМ)

Коефіцієнт кореляції R^2 був рівним 0,998. ММВ становила 6 мкМ, чого цілком достатньо для вимірювання вмісту холіну у зразках їжі та крові.

Відтворюваність методу модифікації електроду була досить високою, оскільки відносна стандартна похибка відгуків біосенсора на внесення 0,1 мМ холіну не перевищувала 8% серед 4 різних електродів, виготовлених в різний час.

3.5. Вивчення впливу інтерферуючих агентів на роботу біосенсора

З метою вивчення впливу потенційних інтерферентів на відгук біосенсора вибрано речовини, що можуть бути присутні разом з холіном у зразках крові та продуктах харчування. Так, встановлено, що десятикратні концентрації глюкози, сахарози, фруктози та сечової кислоти, а також стократні концентрації лактози і сечовини не впливають на величину відгуку на 1 мМ холіну. Беручи до уваги те, що у дитячому харчуванні часто міститься цілий ряд компонентів, включаючи іони металів, проведено аналіз їх впливу на відгуки біосенсорів. Встановлено, що мідь (II), цинк (II), манган (II), залізо (III) не впливали на сигнал до холіну в тих концентраціях, в яких вони присутні в зразках дитячих харчових сумішей (в основному від 2 до 10 разів нижча за концентрацію холіну). Як і очікувалось, лише аскорбінова кислота була сильним інтерферентом за визначення холіну, оскільки її пряме окислення на поверхні золотих електродів відбувається за того ж потенціалу. Аскорбінова кислота навіть у концентраціях нижчих у 10 разів за концентрацію холіну призводила до подвоєння величини електрохімічного відгуку.

Відомо кілька можливих шляхів щодо зменшення інтерферуючого впливу аскорбінової кислоти, зокрема застосування додаткових напівпроникних мембран [208, 209]. Проте, такий підхід є причиною зниження чутливості біосенсорів [210]. Іншим багатообіцяючим підходом є попереднє окислення інтерферентів на мембрані [211]. Склад таких мембран може бути досить різним, проте, одним з

найкращих оксидантів для даного підходу є MnO_2 [212, 213]. Однак, основним недоліком таких мембран є низька відтворюваність та тривалий час відгуку, а також досить складна процедура модифікації електроду.

З метою спрощення процедури модифікації електроду, було обрано метод попередньої обробки зразків, що містять одночасно холін та аскорбінову кислоту, порошком MnO_2 [214]. Такий метод попередньої обробки можна застосовувати для експрес аналізів в мікроструменевому аналітичному приладі.

Для визначення ефективності даного методу, проведено амперометричне вимірювання окислення аскорбінової кислоти за допомогою золотого електроду перед і після обробки MnO_2 . Аскорбінова кислота досить легко окислювалась на поверхні ЗЕ модифікованого SiO_2 -плівкою, що не містила ХОД. При цьому відбувалося різке, нестабільне підвищення анодного струму ($E = 0,7 \text{ В}$) (рис. 3.8 *a*, крива 1, додавання *b*). Даний факт свідчив, що SiO_2 -плівка не здатна відмежувати аскорбінову кислоту від поверхні електроду. Проте, після контакту $0,1 \text{ мМ}$ аскорбінової кислоти із $11,5 \text{ мМ}$ MnO_2 протягом 15 хвилин, рівень відгуку, викликаний окисленням аскорбінової кислоти, суттєво знизився (рис. 3.8 *a*, крива 2, додавання *b*).

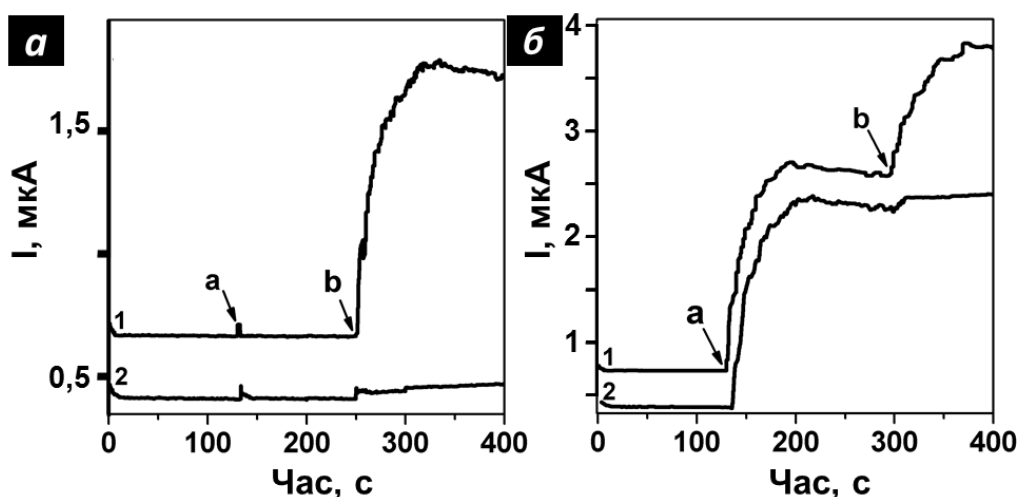


Рис. 3.8. Амперометричні відгуки ЗЕ на внесення 1 мМ холіну (*a*) і $0,1 \text{ мМ}$ аскорбінової кислоти (*b*) перед (1) і після (2) обробки MnO_2 : *a* – ЗЕ- SiO_2 ; *б* – ЗЕ- SiO_2 -ХОД. Час контакту – 15 хв. Електроліт: ФБ рН 7,5; $E = 0,7 \text{ В}$

Щоб перевірити можливий вплив MnO_2 на ХОД, такий самий експеримент було проведено із електродом модифікованим SiO_2 -ХОД (рис. 3.8 б). Спостерігалось зростання струму після додавання холіну, завдяки ферментативній реакції (рис. 3.8 б, додавання а), після якого вносили аскорбінову кислоту (рис. 3.8 б, додавання б). Після обробки зразків MnO_2 відгук на внесення аскорбінової кислоти зменшувався більше ніж в 10 разів (рис. 3.8 б, крива 2), у порівнянні із зразком, який не містив MnO_2 (рис. 3.8 б, крива 1). Отримані результати підтверджують, що MnO_2 суттєво знижує інтерферуючий вплив аскорбінової кислоти у зразку, а його оптимальна кількість розрахована на основі даних стехіометрії реакції та часу взаємодії. Максимального зниження впливу аскорбінової кислоти на величину відгуку біосенсора (щонайменше на 95% від початкового значення) вдалося досягнути після 15-хвилинного контакту зразка, що досліджувався, із 11,5 мМ MnO_2 .

Результати визначення холіну у модельних розчинах, що містили аскорбінову кислоту за допомогою ЗЕ- SiO_2 -ХОД представлені в табл. 3.2. Попередня обробка зразків MnO_2 повністю нейтралізує інтерферуючий вплив аскорбінової кислоти, при цьому не впливає на результати визначення холіну.

Таблиця 3.2.

Результати амперометричного визначення холіну у модельних розчинах, $n = 3$

№	Склад розчину	Знайдено холіну, мМ
1	Холін	0.81 ± 0.06
2	Холін після обробки MnO_2	0.81 ± 0.06
3	Холін + аскорбінова кислота	0.91 ± 0.09
4	Холін + аскорбінова к-та, після обробки MnO_2	0.81 ± 0.07

Примітка. Концентрації: холін 0,8 мМ, аскорбінова кислота 0,1 мМ, MnO_2 11,5 мМ

3.6. Визначення холіну у модельних розчинах і реальних зразках

За допомогою створених біосенсорів було проведено вимірювання концентрації холіну у зразках дитячого харчування, та здійснено їх порівняння із результатами, отриманими за допомогою спектрофотометричного методу (табл. 3.3). Дані, отримані біосенсорним методом, добре корелювали (коеф. кореляції = 0,99) із даними, вказаними виробником дитячого харчування ($1,0 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$), а також із результатами спектрофотометричного аналізу [215]. Концентрація холіну, визначена спектрофотометричним методом, виявилась дещо нижчою, в зв'язку із зменшенням концентрації холіну під час обробки зразка.

Таблиця 3.3.

Результати визначення холіну у модельних розчинах і зразках дитячого харчування (n = 3)

Зразок	Вміст холіну, мМ		ВСП
	Додано	Знайдено	
ФБ	0.50	0.51 ± 0.06	0.05
	1.30	1.28 ± 0.08	0.03
	Вміст холіну, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$		
Суха суміш дитячого харчування "Vebi"	0	0.95 ± 0.14	0.06
	0	$0.83 \pm 0.16^*$	0.08
	1.12	1.99 ± 0.19	0.04

Примітка. * – дані спектрофотометричного аналізу [215]

Таким чином, метод ЕХН є досить перспективним для розробки амперометричних біосенсорів на основі друкованих електродів. ХОД,

імобілізована у композитній SiO_2 -плівці, є набагато стабільнішою ніж у розчині, а також в порівнянні із іншими, представленими в літературі методами. Запропонований метод інкапсуляції ХОД є перспективним, простим, швидким і відтворюваним. ЗЕ, модифіковані SiO_2 -ХОД, є перспективними біосенсорами для визначення холіну.

3.7. Висновки

За результатами даного розділу, можемо зробити висновки, що в даній роботі вперше запропоновано використовувати БШВНТ- NH_2 для збереження стабільності ферментних мембран на основі БСА-ХОД. Досліджено аналітичні характеристики розроблених біосенсорів. Чутливість ЗЕ модифікованих БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ- NH_2 (2%) складала $523 \pm 34 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^2$, ММВ становила 0,005 мМ, ЛДВ – від 0,03 до 0,2 мМ. Встановлено, що за наявності 2% БШВНТ- NH_2 у мембрані, що містить ХОД, біосенсори зберігають стабільність протягом 2 тижнів зберігання і операційну стабільність протягом 50 вимірювань. Після 5 місяців зберігання біосенсори зберігали ~70% чутливості.

Встановлено, що метод ЕХН є ефективним підходом для розробки амперометричних біосенсорів для визначення холіну на основі друкованих золотих електродів та SiO_2 -ХОД біокомпозитної плівки. Досліджено вплив параметрів ЕХН (час нанесення, потенціал, склад розчину) на роботу амперометричних біосенсорів. Встановлено, що присутність 12 мМ ЦТАБ у складі розчину для ЕХН значно покращує стабільність і чутливість біокомпозиту, осадженого на поверхню ЗЕ. Чутливість ЗЕ- SiO_2 -ХОД до холіну становила $480 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^2$, ЛДВ – від 0,02 до 0,6 мМ, а ММВ – 0,006 мМ холіну. Біосенсор на основі SiO_2 -ХОД зберігав операційну стабільність протягом 30 вимірювань, а стабільність при зберіганні протягом 3 днів. Середня похибка становила 8%.

Для усунення інтерферуючого впливу аскорбінової кислоти на роботу біосенсора на основі SiO_2 -ХОД оптимізовано спосіб попередньої обробки зразків MnO_2 . Встановлено, що 15-хвилинної обробки зразків 11,5 мМ MnO_2 є достатньо для повного окислення аскорбінової кислоти. Розроблені біосенсори для визначення холіну на основі SiO_2 -ХОД використали для вимірювання холіну в зразках дитячого харчування. Результати, отримані біосенсорним методом, добре корелювали із результатами спектрофотометрії (коефіцієнт кореляції = 0,99).

Результати даного розділу викладені у наступних публікаціях:

Белоиван О.А., Дуда Т.И., Васильев А.А, Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Шкотова Л.В., **Жибак М.Т.**, Бойчук Ю.В., Бардаков Б.В., Корпан Я.И. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в биосенсорной технологии // Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине / Редкол.: А.Г. Наумовец (глав. ред.); НАН Украины. – К.: Академперіодика, 2014. – 768 с., – ISBN 978-966-360-260-8. – С. 541-545.

Mazurenko E., Tananaiko O., Biloivan O., **Zhybak M.**, Pelyak I., Zaitsev V., Etienne M., Walcarius A. Amperometric biosensor for choline based on gold screen-printed electrode modified with electrochemically-deposited silica biocomposite // Electroanalysis. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 1685-1692.

Biloivan O., **Zhybak M.**, Boychuk Y., Vasil'ev O., Duda T., Muratov V., Korpan Y. Carbon nanomaterial based three-dimensional enzyme membranes for amperometric sensors // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 12.

РОЗДІЛ 4

АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ СЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ L-АРГ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ТА КОМПОЗИТУ ПОЛІАНІЛІН/НАФІОН

В основі роботи більшості представлених на сьогодні ферментних сенсорів для визначення аргініну лежить використання бі-ферментних каскадів (аргіназа I + уреаза) у комплексі із амоній-чутливим фізичним перетворювачем [126, 127]. Проте, L-Арг може бути розщеплений до амонію в ході лише однієї ферментативної реакції під дією аргініндеїмінази (АДІ). АДІ володіє високою афінністю до аргініну і каталізує незворотне гідролітичне розщеплення аргініну до L-цитруліну і амонію. АДІ належить до нової суперродини ферментів, що модифікують гуанідинову групу [216]. Використання АДІ для розробки моноферментної аналітичної системи для визначення аргініну дало б змогу вирішити низку проблем, що притаманні для мульти-ферментних систем. Нещодавно, АДІ було успішно застосовано для флуориметричного визначення L-Арг у напоях [113].

В даному розділі описано розробку високочутливого, селективного та стабільного амперометричного моно-ферментного біосенсора для визначення L-аргініну (рис. 4.1). В ході даної розробки було використано амоній-чутливий шар ПАНі, електрополімеризований на вкритий нафіоном платиновий друкований електрод (ПЕ) [14, 18]. Далі, рекомбінантну АДІ, виділену із *Mycoplasma hominis*, наносили на поверхню ПАНі/Нафіон/ПЕ, з наступним формуванням біорозпізнавальної мембрани під дією поперечного зшивання у насичених випарах ГА.

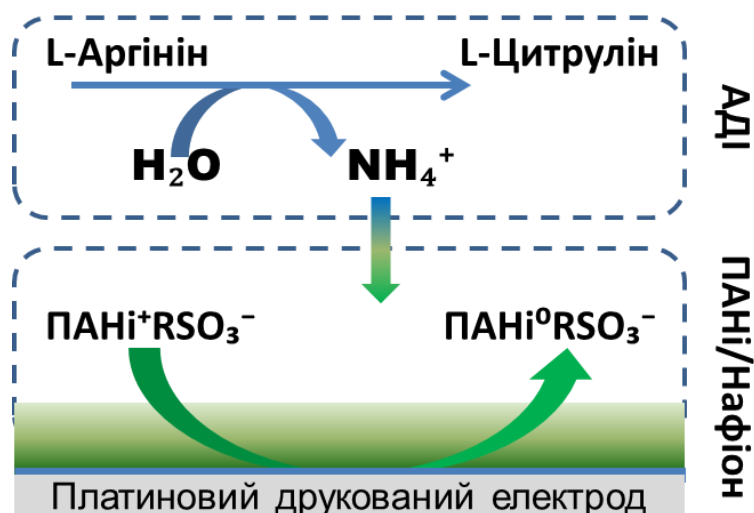


Рис. 4.1. Схематичне зображення запропонованої моделі біосенсора. PANI^+ і PANI^0 – окислена і відновлена форми PANI ; RSO_3^- - нафiон [18]

4.1. Модифікація ПЕ композитом PANI /Нафiон та аналіз утвореної поверхні

Для модифікації поверхні ПЕ шаром PANI обрано метод електрохімічної полімеризації через електро-окислення аніліну. Перед осадженням PANI на поверхню ПЕ наносили розчин нафiону. Так, відомо, що за присутності нафiону, іммобілізовані сульфонатні групи нафiону відіграють роль компенсаторів заряду під час анодної полімеризації аніліну [189]. Після висушування нафiонної плівки полімеризацію аніліну на поверхні ПЕ проводили у водному розчині 0,5 М HCl (рис. 4.2). Усі параметри процесу електрополімеризації: значення потенціалів, швидкість сканування, кількість циклів, - підбирали емпірично, з метою отримати оптимальні умови. Параметри, при яких утворювалися найкращі зразки, застосовувалися для всіх подальших експериментів.

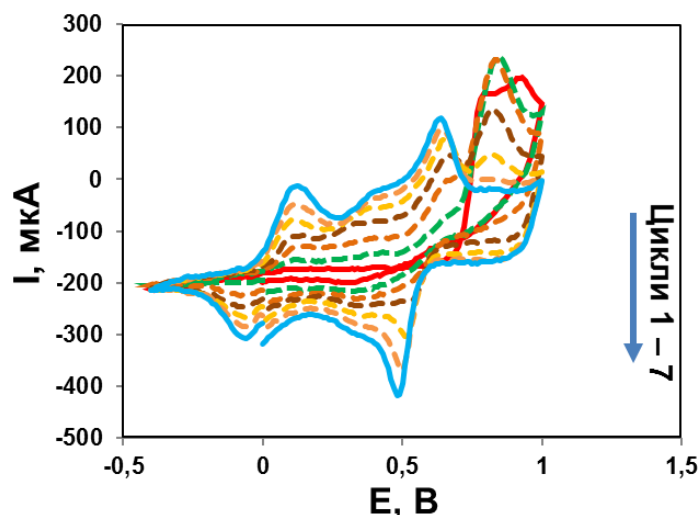


Рис. 4.2. Електрохімічна полімеризація ПАНі на покритому нафіоном платиновому електроді (0,5 М НСl, 0,2 М анілін, швидкість сканування $0,02 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ проти Ag/AgCl електроду порівняння)

Вольтамограми, отримані під час електронанесення ПАНі на поверхню Нафіон/ПЕ, були досить подібними до опублікованих у літературі раніше [18, 130]. Єдиною відмінністю було катодне зміщення утворених піків на 0,15 В, що пояснюється використанням друкованих електродів порівняння. Анодне сканування першого циклу характеризувалося утворенням високого піку окислення мономеру (0,9 В). При зворотному скануванні утворювалася петля нуклеації, імовірно, в зв'язку із формуванням нової фази, за якою слідувало утворення широкого катодного відгуку. В ході наступних циклів піки окислення мономеру ставали все нижчими, аж до повного зникнення на сьомому циклі, що пояснюється практично повним використанням молекул аніліну у процесі утворення олігомерних чи полімерних ланцюгів. Під час циклів 2-7 чітко зафіксовано два окисно-відновних процеси: при 0,00-0,15 В (формування емеральдину), та при 0,50 – 0,65 В (формування перніграніліну). На даних відрізках спостерігалося підвищення струму та утворення піків, що відповідало процесам нарощування композиту ПАНі на поверхні Нафіон/ПЕ. Появу шару ПАНі також підтверджено візуально, – змінювався колір поверхні ПЕ із сірого на темно-зелений, притаманний емеральдину.

4.2. Електрохімічні властивості утвореного композиту та чутливість ПАНі/Нафіон/ПЕ до іонів амонію

Електрохімічні властивості ПАНі/Нафіон/ПЕ вивчалися за допомогою ЦВ (рис. 4.3 *a*). За відсутності іонів амонію у вимірювальному розчині не спостерігалось окисних чи відновних піків зміни струму. Після додавання амоній хлориду у вимірювальну комірку, заповнену ФБ рН 7,4, відбувалося підвищення катодного струму між -0,20 В і -0,40 В (проти Ag/AgCl).

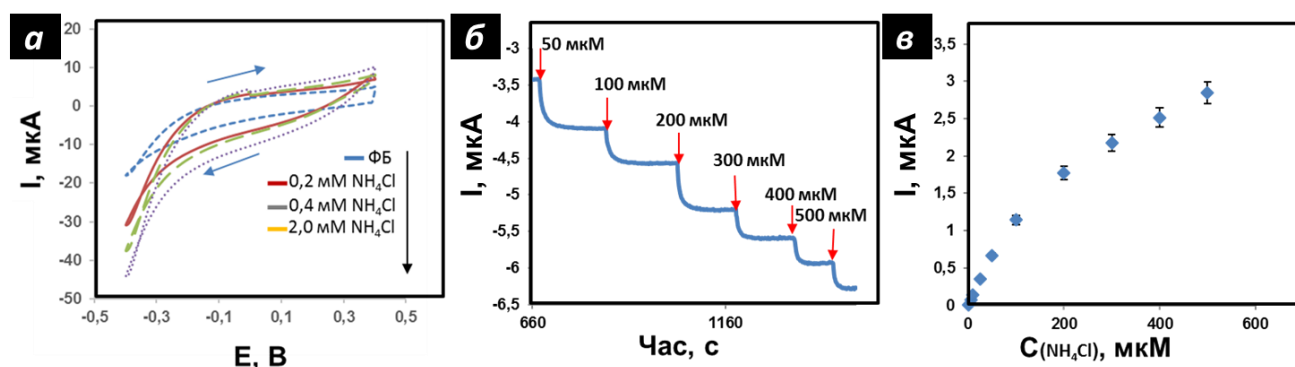


Рис. 4.3. Електрохімічне визначення іонів амонію за допомогою ПАНі/Нафіон/ПЕ: *a* – циклічні вольтамограми, записані до і після додавання у вимірювальну комірку NH_4Cl (ФБ рН 7,4, швидкість сканування $20 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$); *б* – амперометричний відгук ПАНі/Нафіон/ПЕ у відповідь на додавання NH_4Cl ($E = -0,35 \text{ В}$, ФБ рН 7,4); *в* – калібрувальна крива визначення іонів амонію на ПАНі/Нафіон/ПЕ ($n=3$)

Іони амонію досить швидко дифундують до шару ПАНі/Нафіон, де спричиняють процес відновлення ПАНі на поверхні ПЕ до лейкоемеральдинової форми. Імобілізовані сульфонатні групи нафіону затримують проникнення аніонів у композит ПАНі/Нафіон, в той час як проникнення катіонів амонію стає необхідним для проходження окисно-відновних процесів ПАНі. При катодній поляризації композиту ПАНі/Нафіон зміни катодного струму є пропорційними до концентрації іонів амонію у розчині [190].

Для визначення оптимального значення потенціалу для амперометричного вимірювання іонів амонію проводили визначення NH_4Cl при різних значеннях потенціалів (рис. 4.4). При значеннях потенціалу від -0,20 до -0,40 В максимальне зростання катодного струму зафіксовано при -0,35 В. Таким чином, для амперометричного вимірювання концентрації іонів амонію за допомогою ПАНі/Нафіон/ПЕ в подальших експериментах використовували значення потенціалу -0,35 В (рис. 4.3 б). В результаті поступового підвищення концентрації NH_4Cl у вимірювальній комірці пропорційно зростає рівень катодного струму (рис. 4.3 в). За тих же умов ПАНі/Нафіон/ПЕ був повністю нечутливий до L-Арг.

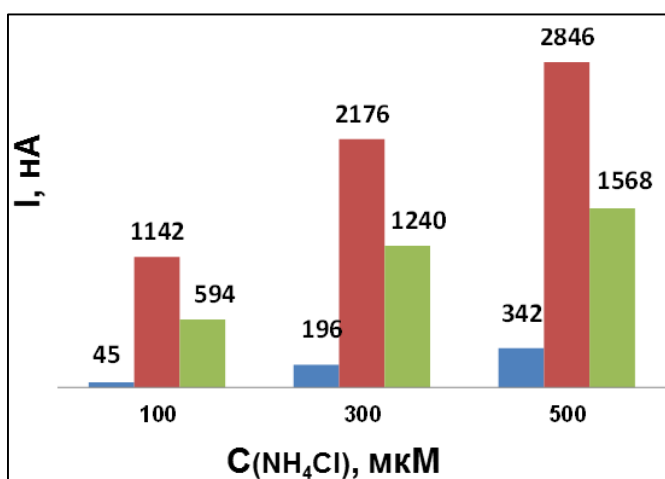


Рис. 4.4. Вибір оптимального значення потенціалу для амперометричного вимірювання іонів амонію. Умови вимірювання: 20 мМ ФБ, рН 7,4, $t = 22$ °С; значення прикладеного потенціалу: ■ – -200 мВ проти Ag/AgCl; ■ – -350 мВ проти Ag/AgCl; ■ – -400 мВ проти Ag/AgCl

Досліджено аналітичні характеристики ПАНі/Нафіон/ПЕ. Робота сенсора відзначалася швидким зростанням струму у відповідь на підвищення концентрації NH_4Cl , за яким слідувала фаза зрівноваження відгуку через 15-30 с. Також досягнуто високого рівня операційної стабільності роботи ПАНі/Нафіон/ПЕ (100 вимірювань без втрати чутливості). Із калібрувальної кривої, побудованої на основі результатів амперометричного дослідження (рис. 4.3 в), встановлено лінійний

діапазон визначення (від 0,003 до 0,2 мМ NH_4Cl), чутливість в межах лінійного діапазону ($701 \pm 33 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$), ММВ (0,001 мМ NH_4Cl).

4.3. Імобілізація АДІ та робота біосенсора в модельному середовищі (ФБ рН 7,4)

АДІ іммобілізували на поверхні ПАНі/Нафіон/ПЕ за допомогою методу поперечного зшивання із БСА в насичених випарах ГА. Завдяки присутності БСА вдалося забезпечити високу стабільність ферменту і тривале зберігання максимальної ферментативної активності під час роботи біосенсора. Оптимальним значенням рН для найвищої активності АДІ є 7,2. Проте, розробка даного прототипу біосенсора орієнтована на клінічні дослідження, тому всі умови експериментів були максимально оптимізовані до фізіологічних значень рН. Найвищий рівень струму при визначенні L-Арг зафіксовано у 20 мМ ФБ рН 7,2 (рис. 4.5), тоді як відгуки на аналогічні концентрації L-Арг у ФБ рН 7,4 були дещо нижчими.

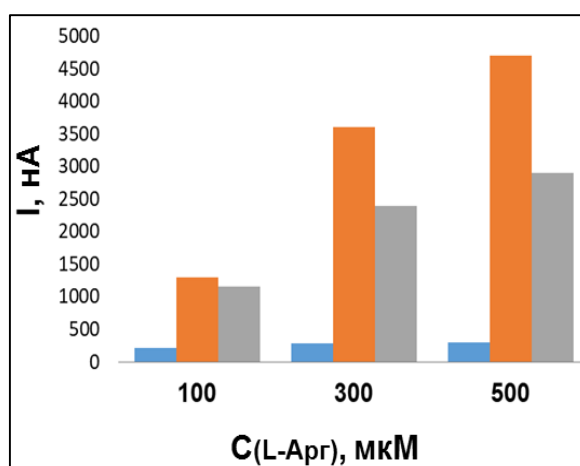


Рис. 4.5. Вибір оптимального значення рН для амперометричного визначення L-Арг ($E = -0,35 \text{ В}$ проти Ag/AgCl , 20 мМ ФБ, 22 °С). Значення рН: ■ – 6,2; ■ – 7,2; ■ – 7,4

Беручи до уваги незначні відмінності у відгукках між вимірюваннями у ФБ рН 7,2 і рН 7,4, особливо для концентрацій в межах лінійного діапазону (до 0,2 мМ L-Арг), ФБ рН 7,4 було обрано у якості основного для визначення концентрацій L-Арг.

Циклічні вольтамограми для АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ зображені на рис. 4.6 *а*. Так, після додавання L-Арг до вимірювальної комірки спостерігалось різке зростання катодного струму між -0,2 і -0,4 В (проти Ag/AgCl).

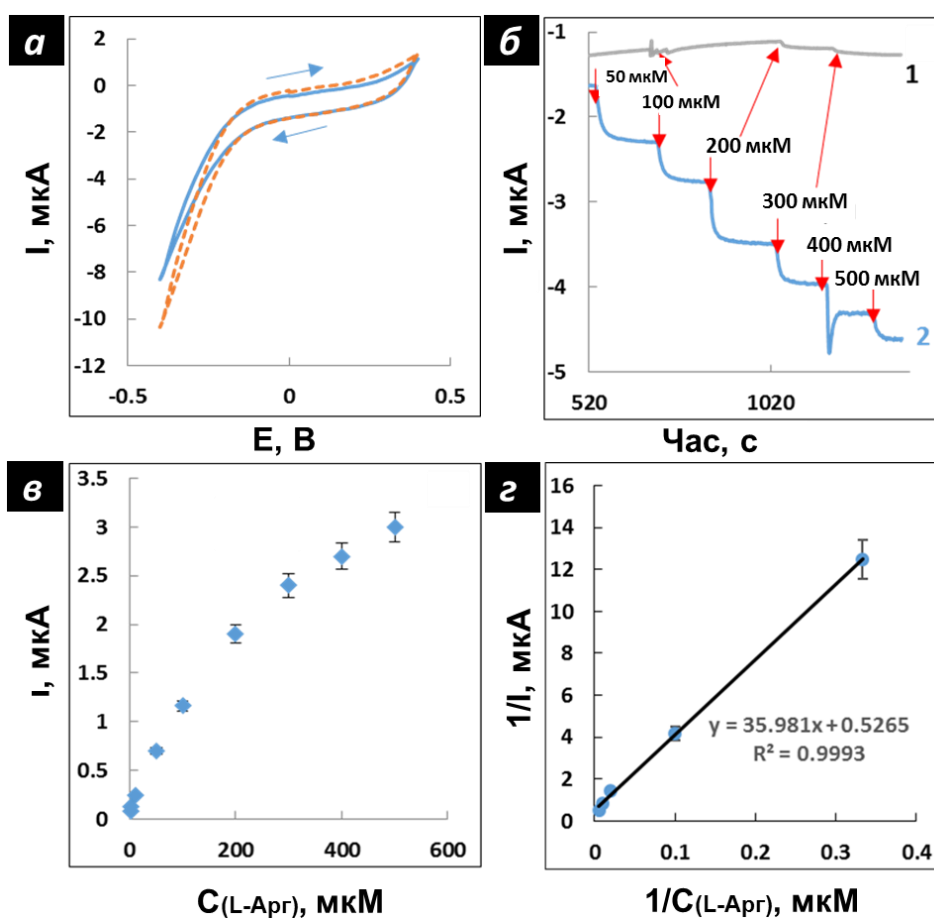


Рис. 4.6. Електрохімічне визначення L-Арг на АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ: *а* – циклічні вольтамограми, записані до (—) і після (---) додавання у вимірювальну комірку 0,5 мМ L-Арг (ФБ рН 7,4, швидкість сканування $20 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$); *б* – амперометричний відгук ПАНі/Нафіон/ПЕ (1) і АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ (2) у відповідь на додавання L-Арг ($E = -0,35 \text{ В}$, ФБ рН 7,4); *в* – калібрувальна крива визначення L-Арг на АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ ($n=3$); *г* – крива Лайнуївера-Берка для калібрувальної кривої

Згідно результатів ЦВ, а також беручи до уваги дані визначення іонів амонію, амперометричне визначення L-Арг проводили при $-0,35$ В. Як видно із хроноамперограми (рис. 4.6 б), катодний струм поступово зростає у відповідь на підвищення концентрації L-Арг у вимірювальному розчині. Динамічний діапазон (рис. 4.6 в) був лінійним між $0,003$ та $0,2$ мМ L-Арг (рис. 4.6 г), чутливість складала 684 ± 32 А·М⁻¹·м⁻², ММВ становила $0,001$ мМ. Створений біосенсор відзначався швидким відгуком на внесення L-Арг (15 с). Позірна константа Міхаеліса-Ментен ($K_M^{\text{поз}}$), розрахована з калібрувальної кривої, становила 0.31 ± 0.05 мМ L-Арг.

Ефективність ферментативної реакції розраховували із значень $I_{\text{max}}/2$, отриманих під час амперометричного визначення іонів амонію та L-Арг (рис. 4.3 в та 4.6 в), і встановили, що рівень перетворення L-Арг до цитруліну та іонів амонію був $97,6$ %. Майже максимальний рівень перетворення L-Арг є свідченням того, що вибраний спосіб іммобілізації АДІ на поверхні ПАНі/Нафіон/ПЕ є одним з найбільш вдалих, і активні сайти та просторова структура АДІ не зазнали суттєвих ушкоджень під час іммобілізації. Біосенсор зберігав стабільність протягом 35 днів зберігання при $+4^\circ\text{C}$ (рис. 4.7). Операційна стабільність становила 100 вимірювань (СП = $6,5\%$).

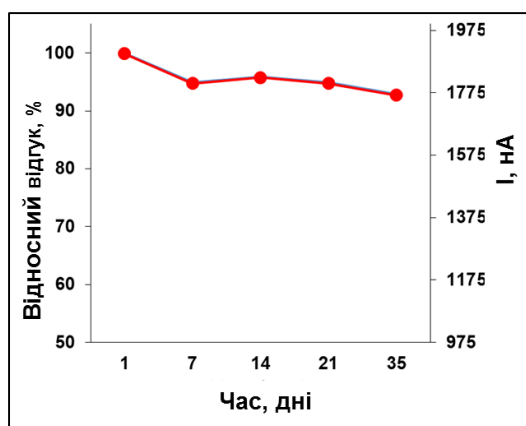


Рис. 4.7. Стабільність АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ. Умови зберігання: 50 мМ ФБ рН $7,4$ при $+4^\circ\text{C}$. Умови під час вимірювань: $E = -0,35$ В проти Ag/AgCl ; 20 мМ ФБ рН $7,4$; $0,2$ мМ L-Арг

В результаті порівняння аналітичних характеристик АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ із уже існуючими біосенсорними системами для визначення L-Арг (табл. 4.1) встановлено, що сконструйований нами біосенсор володіє низкою переваг.

Таблиця 4.1.

Аналітичні характеристики біосенсорів для визначення L-Арг

Тип реєстрації сигналу	Біокомпонент	ММВ, мМ	ЛДВ, мМ	Час відгуку (95%), хв	Стабільність, діб
Потенціометрія, АСЕ*	Кліт. бакт. [124]		0.05 – 1.0		
Потенціометрія, NH ₃ газовий сенсор	У/А** [17]		0.03 – 3.0	5.0	
Потенціометрія, АСЕ	У/А [136]	0.01	0.1 – 30	1.5 – 4.0	21
Потенціометрія, рН	У/А [217]		0.025 – 0.31	10	
Потенціометрія, АСЕ	У/А [126]	0.1	0.12 – 40	1.5 – 5.0	15
Кондуктометрія	У/А [127]	0.0005	0.01 – 4.0	2.0	45
Амперометрія	У/А [18]	0.038	0.07 – 0.6	0.17	3
Амперометрія	Уреаза/Кл. дріжджів. [130]	0.085	0.085-0.6	1	3
Амперометрія	АДІ [218]	0.001	0.003 – 0.2	0.25	35

Примітка. * – АСЕ (амоній-селективний електрод); ** – У/А (уреаза і аргіназа)
 І)

Одна із найнижчих ММВ, а також широкий лінійний діапазон та висока стабільність є тими властивостями, що добре підходять для вимірювання L-Арг в біологічних рідинах людей (60-100 мкМ у крові дорослої людини [219]).

Інтерферуючий вплив амінокислот (L-ізолейцину, L-лізину, L-треоніну, L-орнітину, L-серину, L-валіну, L-цистеїну та L-цитруліну) на роботу ПАНі/Нафіон/ПЕ досліджений та опублікований в роботі Stasyuk *et al.* [18]. Так, встановлено, що наявність у вимірювальному розчині амінокислот не впливає істотно на роботу композиту ПАНі/Нафіон. У нашій роботі також було перевірено можливий інтерферуючий вплив амінокислот на роботу створеного біосенсора (рис. 4.8). Додавання двократних концентрацій L-лізину і ГАМК (у порівнянні із концентрацією L-Арг) не призвело до появи відгуків (рівень значимості $< 5\%$).

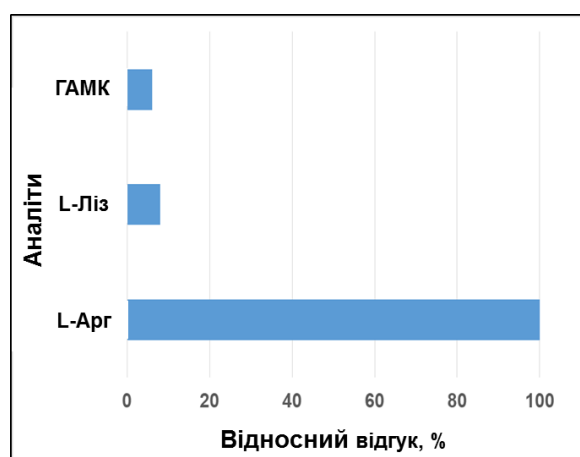


Рис. 4.8. Вплив деяких можливих інтерферуючих сполук на роботу АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ. Умови вимірювання: $E = -0,35$ В проти $Ag/AgCl$; 20 мМ ФБ рН 7,4; 22 °С. Концентрація сполук у розчині: 0,1 мМ L-Арг, 0,2 мМ L-Ліз, 0,2 мМ ГАМК

Раніше встановлено, що канаванін, субстрат аргінази людини I, взаємодіє також і з АДІ [220]. Проте, канаванін є практично відсутній у біологічних рідинах (крові, сироватці, сечі), а тому його вплив при вимірюванні L-Арг є незначним. Варто також зазначити, що високі концентрації хлорид-аніону (вище 50 мМ) у вимірювальному розчині призводять до зниження струму відгуку (рис. 4.9), оскільки відбувається зміщення потенціалу внутрішнього електроду порівняння біосенсора.

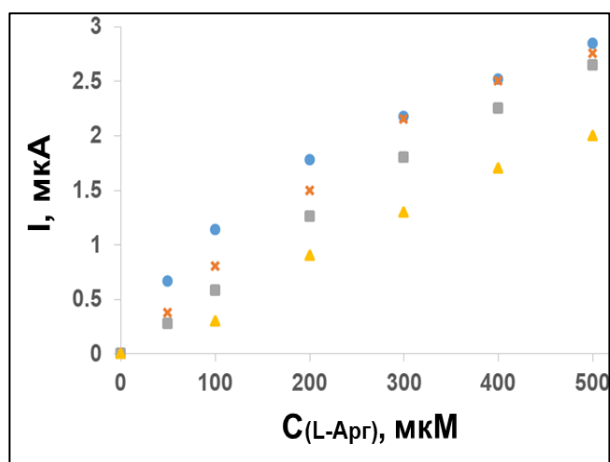


Рис. 4.9. Вплив хлориду натрію на відгуки АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ. Концентрації NaCl: ● – 0 мМ; ✕ – 20 мМ; ■ – 50 мМ; ▲ – 100 мМ

Дане спостереження добре узгоджується із даними, отриманими групою Strehlitz *et al.* [190].

4.4. Вимірювання L-Арг в фармацевтичних препаратах та зразках плазми крові людини

Для демонстрації можливості вимірювати вміст L-Арг за допомогою створеного біосенсора в реальних зразках було відібрано та проаналізовано L-Арг-вмісний препарат «Аміноплазмаль 10% Е» В. Braun Melsungen AG (Німеччина), а також зразки плазми крові людини. Результати порівнювалися із даними, задекларованими виробником (у випадку із фармпрепаратом), або отриманими за допомогою флуориметричного ферментного методу на основі реакції ДМО і сечовини [111].

Вимірювання концентрації L-Арг в комерційному фармацевтичному препараті «Аміноплазмаль 10% Е» здійснювали амперометрично на портативному потенціостаті μ Stat 400, із використанням методу стандартних додавань (рис. 4.10).

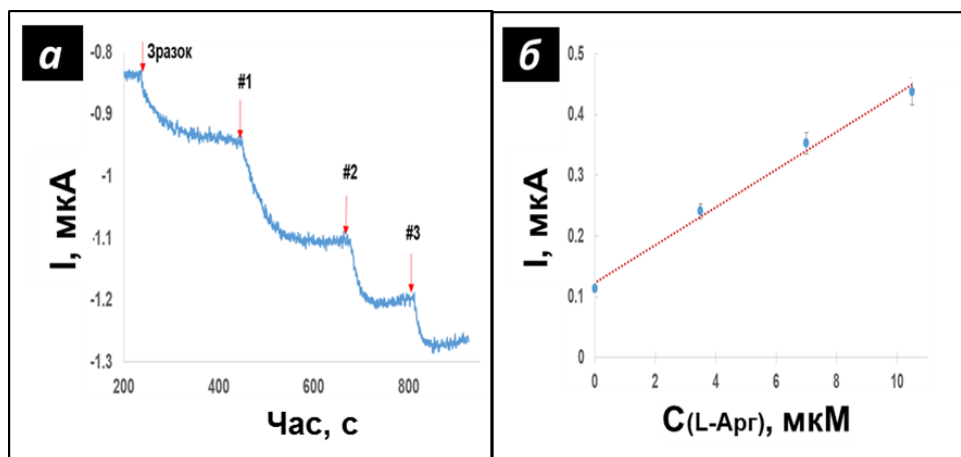


Рис. 4.10. Визначення L-Арг у фармацевтичному препараті «Аміноплазмаль 10% Е» за допомогою АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ методом стандартних додавань: *a* – амперометричний відгук АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ зразок препарату «Аміноплазмаль 10% Е» (розведення 1:2000) та на наступні стандартні додавання (#1; #2; #3) L-Арг (-0,35 В, ФБ рН 7,4); *б* – калібрувальна крива визначення L-Арг в зразку препарату «Аміноплазмаль 10% Е»

В якості L-Арг-вмісного препарату використовували “Аміноплазмаль 10% Е”, оскільки окрім L-Арг він містить цілу низку інших амінокислот, електролітів та добавок. Результати аналізу вмісту L-Арг в препараті “Аміноплазмаль 10% Е” порівнювали із даними, задекларованими виробником. Відмінність у результатах становила менше 2,5 % (n=3).

АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ також випробували для вимірювання L-Арг в зразках плазми крові здорових людей, а також пацієнтів, що страждали на захворювання печінки, використовуючи метод стандартних додавань (СП - 14%, n=3) (табл. 4.2). Беручи до уваги той факт, що в крові здорової людини рівні L-Арг і ендогенного амонію є досить близькими (60-100 мкМ і 20-50 мкМ, відповідно) [5, 219], концентрацію іонів амонію в зразках плазми було додатково виміряно амперометрично з використанням ПАНі/Нафіон/ПЕ. Концентрацію L-Арг в плазмі розраховували як різницю між сигналами АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ і ПАНі/Нафіон/ПЕ.

Таблиця 4.2.

Вимірювання L-Арг в реальних зразках за допомогою АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ

Зразок	L-Арг + NH ₄ ⁺ , мМ	NH ₄ ⁺ , мМ	L-Арг, мМ	L-Арг порівн. метод, мМ
	Виміряно АДІ/ПАНі/ Нафіон/ПЕ	Виміряно ПАНі/Нафіон /ПЕ	Розраховано	
<i>Фарм. преп.</i>	7.8±0.3	-	7.8±0.3	8.0**
<i>Плазма #1</i>	0.157±0.022	0.07±0.01	0.087±0.014	0.082±0.008***
<i>Плазма #2</i>	0.127±0.018	0.047±0.006	0.079±0.012	0.071±0.007***
<i>Плазма #3*</i>	0.392±0.051	0.23±0.02	0.162±0.021	0.144±0.015***
<i>Плазма #4*</i>	0.445±0.063	0.25±0.03	0.195±0.03	0.179±0.018***

Примітка. * – зразки взяті у пацієнтів із захворюванням печінки; ** – задекларовано виробником; *** – флуориметричний ферментний аналіз

Отримані дані добре корелюють (коефіцієнт кореляції = 0,99) із даними референсного методу для визначення L-Арг за допомогою флуориметрії (ВСП - 10 %). Рівень L-Арг в зразках плазми крові здорових донорів був у 1,5-2 рази нижчим ніж у пацієнтів із захворюванням печінки. Результати визначення L-Арг, представлені у табл. 4.2, є досить близькими за значенням до опублікованих раніше для здорових дорослих людей [219, 221], та пацієнтів з розладами печінки [6]. Отримані результати є чітким свідченням того, що створений лабораторний прототип біосенсора для визначення L-Арг може бути застосований для швидкого і ефективного визначення L-Арг в простих (фармацевтичні препарати) і складних багатокomпонентних (плазма крові) розчинах.

4.5. Висновки

Таким чином, нами вперше сконструйовано та оптимізовано амперометричний сенсор для визначення L-Арг на основі рекомбінантної АДІ. Створений біосенсор володіє наступними властивостями: низьким потенціалом роботи (-0,35 В), швидким відгуком на цільову сполуку (15 с), широким лінійним діапазоном (0,003 - 0,2 мМ), високою селективністю та чутливістю ($684 \pm 32 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$), низькою ММВ (0,001 мМ) та високою стабільністю при зберіганні (>35 діб). Представлений амперометричний біосенсор демонструє передові аналітичні властивості - не вимагає складного приготування зразків перед вимірюванням (окрім розведення), оскільки в його основі лежить одностадійне розщеплення L-Арг за допомогою АДІ. Цього неможливо досягнути, використовуючи біоферментні (аргіназа I + уреаза) і моно-ферментні (інгібування уреазу) сенсорні системи, описані в літературі раніше, оскільки для їх коректної роботи потрібно попередньо очищувати зразки плазми, сироватки, сечі, від ендогенної сечовини. Результати вимірювань в реальних зразках (фармацевтичні препарати та плазма крові людини) за допомогою створеного біосенсора добре корелюють із флуориметричним ферментним методом.

Результати даного розділу викладені у наступних публікаціях:

Zhybak M.T., Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184, № 8. – P. 2679–2686.

Zhybak M., Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M., Sibirny A., Dempsey E., Korpan Y. Novel L-arginine-selective amperometric sensor based on recombinant arginine deiminase and platinum screen-printed electrodes // Book of Abstracts “MADICA 2014”. – Mahdia, Tunisia, 5-7 November, 2014. – P. B23.

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА АМОНІЙ-ЧУТЛИВОГО НАНОКОМПОЗИТНОГО СЕНСОРА НА ОСНОВІ ПАНІ/НАФІОН/Cu

Протягом останнього десятиріччя для розробки амоній-чутливих електродів почали широко використовувати полімерні напівпровідники, зокрема, поліанілін (ПАНі). Згідно з результатами експериментальних робіт низки авторів, електрохімічно осаджений ПАНі на золотому або платиновому електродах, які були попередньо покриті негативно зарядженою полімерною катіонообмінною мембраною (наприклад нафіоном), демонстрували чутливість до іонів амонію при використанні вольтаметричних методів. Проте, на вуглецевій поверхні чутливість електроосадженого ПАНі була зазвичай на 2-3 порядки нижчою [190].

Незважаючи на широкий спектр підходів щодо визначення іонів амонію, більшість доступних методів не характеризуються високою чутливістю та селективністю аналізу.

В даному розділі описано розробку лабораторного прототипу високочутливого до іонів амонію електроду на основі нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu, з використанням технології пошарового електроосадження. Згідно запропонованої концепції, іони амонію дифундують з розчину, в якому ведеться вимірювання, в нанокompозит ПАНі/Нафіон/Cu, внаслідок чого відбувається формування амонійних комплексів міді (I). Амонійні сполуки Cu (I) проявляють каталітичну дію щодо реакції відновлення кисню при значенні потенціалу -0,45 В проти Ag/AgCl електроду порівняння.

5.1. Нанесення амоній-чутливого композиту на поверхню вуглецевого електроду

Розроблено оптимальну технологію модифікації вуглецевих електродів (ВЕ) наночастинками міді та поліаніліновою мембраною. В ході експериментальних досліджень встановлено, що найкращим способом для електроосадження міді на поверхню ВЕ є циклічна вольтаметрія з 50 мМ розчину нітрату міді у 100 мМ азотній кислоті. Для порівняння ефективності запропонованого методу використовували також електронанесення міді шляхом хроноамперометрії та хронокулонометрії при заданому значенні потенціалу. В обох альтернативних випадках було помічено істотний недолік – складність контролювати товщину і кількість нанесених наночастинок міді, а також рівномірність їх поширення на поверхні ВЕ. У випадку електронанесення міді шляхом циклічної вольтаметрії (10 циклів; -0,9 - +0,7 В), мідь наносилась більш рівномірно, а виготовлені електроди володіли однаковими властивостями, що підтверджувало надійність і відтворюваність методу. Дана процедура проводилась на портативному потенціостаті DropSens μ Stat400, а також стаціонарних потенціо-гальваностатах Autolab PGSTAT 30 та IviumStat. В усіх випадках відтворюваність методу підтвердилась.

На рис. 5.1а представлено вольтаметричні відгуки ВЕ, отримані під час циклічної вольтаметрії у нітратному розчині іонів Cu^{2+} . Анодні піки, що утворювались під час прямого сканування, відповідали утворенню іонів Cu^{2+} з частинок металічної міді, які осаджуються при катодному потенціалі. Кожен наступний цикл під час ЦВ супроводжувався зміщенням анодного піку, що свідчить про зміну властивостей поверхні електроду. Під час зворотного сканування спостерігали утворення хвилі відновлення, що відповідала формуванню металічної міді [222].

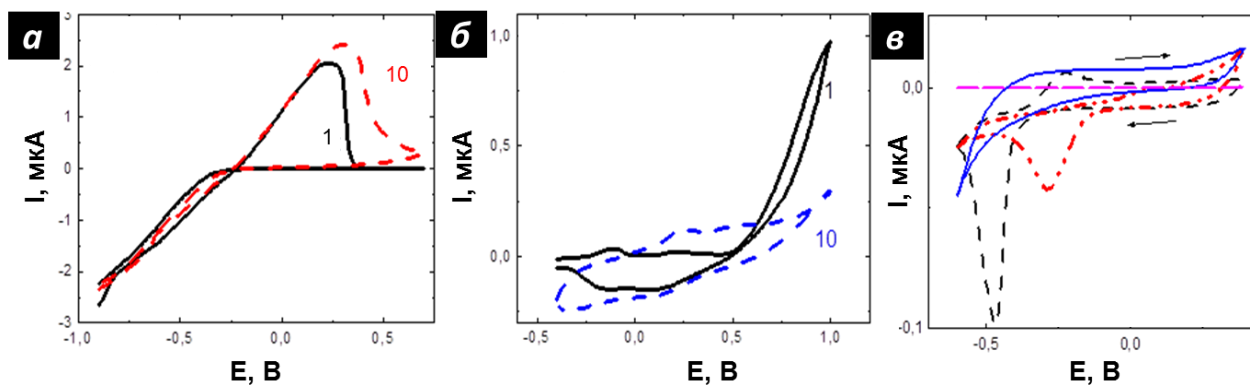


Рис. 5.1. Конструкція ПАНі/Нафіон/Cu композиту на поверхні ВЕ: **а** – електроосадження міді (100 мМ HNO_3 ; 50 мМ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$; швидкість сканування $50 \text{ мВ}\cdot\text{с}^{-1}$). Порядок циклів: **—** – 1-й; **- - -** – 10-й; **б** – електрохімічна полімеризація ПАНі на поверхню Нафіон/Cu/ВЕ (0,5 М HCl ; 0,2 М анілін; швидкість сканування $50 \text{ мВ}\cdot\text{с}^{-1}$). Порядок циклів: **—** – 1-й; **- - -** – 10-й; **в** – вольтамперичний відгук електроду на різних стадіях модифікації у ФБ рН 7,4. Стадії модифікації електроду: **- - -** – ВЕ; **—** – Cu; **- - -** – Нафіон/Cu; **—** – ПАНі/Нафіон/Cu

Зміни в морфології поверхні електроду, спричинені модифікацією, досліджували за допомогою СЕМ (рис. 5.2).

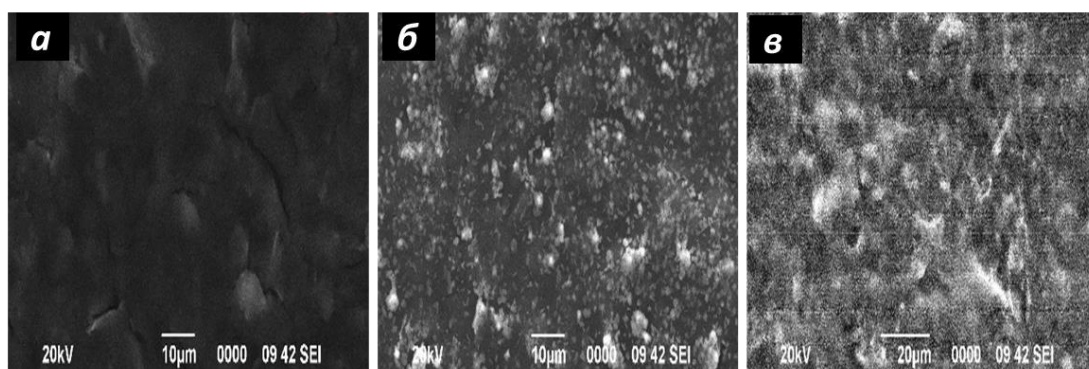


Рис. 5.2. Мікрофотографії поверхонь ВЕ на різних стадіях модифікації, отримані за допомогою СЕМ: **а** – чистий ВЕ; **б** – Cu/ВЕ; **в** – ПАНі/Нафіон/Cu/ВЕ

Зміни у хімічному складі композиту досліджували за допомогою ЕРС (рис. 5.3).

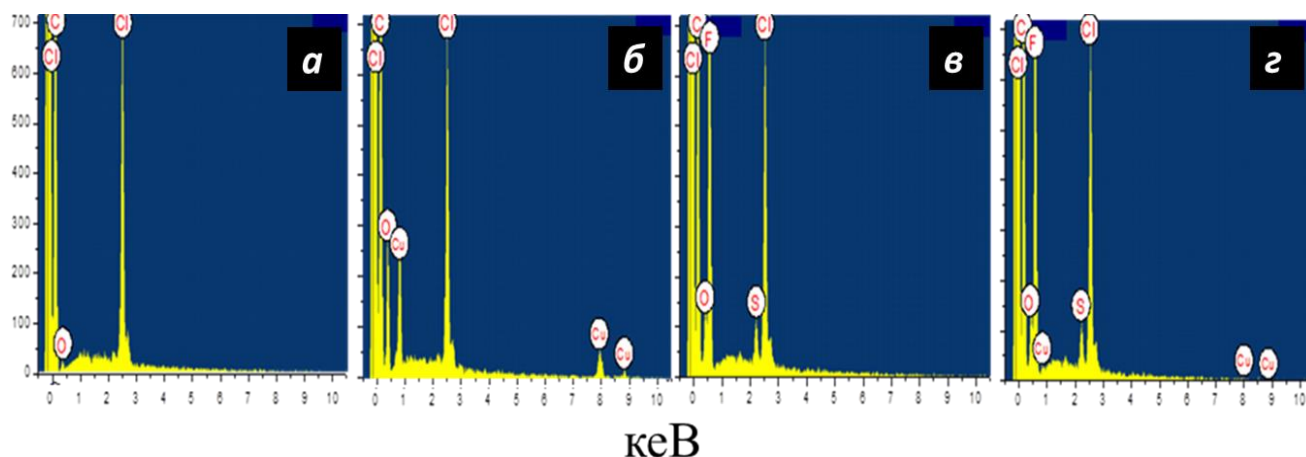


Рис. 5.3. EDS спектри поверхні ВЕ на різних стадіях модифікації: *a* – чистий ВЕ; *б* – Cu/ВЕ; *в* – ПАНІ/Нафіон/ВЕ; *г* – ПАНІ/Нафіон/Cu/ВЕ. Позиції піків: Cl – 0.2 і 2.6 кеВ; S – 2.3 кеВ; O – 0.55 кеВ; F – 0.65 кеВ; C – 0.25 кеВ; Cu – 1, 8.05 кеВ і 8.9 кеВ

Чиста немодифікована поверхня ВЕ (рис. 5.2 *a*) характеризувалася високою жорсткістю. СЕМ-знімки засвідчили рівномірне осадження мідних наночастинок (рис. 5.2 *б*) з діаметром до 100 нм, а також їхніх угруповань на поверхні електроду. Процес електронанесення міді було зупинено в крайній катодній точці (-0,9 В), що відповідає утворенню частинок металічної міді на поверхні ВЕ. Наявність осаджених мідних частинок підтверджено за допомогою РФС (рис. 5.4), а також при візуальному огляді поверхні електроду (колір поверхні ВЕ змінювався із матово-чорного на оранжево-коричневий).

З метою запобігання прямого контакту між частинками міді та аніліном, а також компенсування заряду під час електрополімеризації ПАНі, модифікована міддю поверхня ВЕ була вкрита шаром 2% розчину нафіону (в 96% етанолі). Раніше встановлено, що наявність нафіонового шару значно посилює стабільність композитів [14, 18, 223]. Нафіонова плівка забезпечує катіонний обмін за допомогою іммобілізованих сульфонатних груп, які в свою чергу перешкоджають дифузії аніонів всередину композиту. Після висушування нафіонової плівки було проведено електрохімічну полімеризацію аніліну.

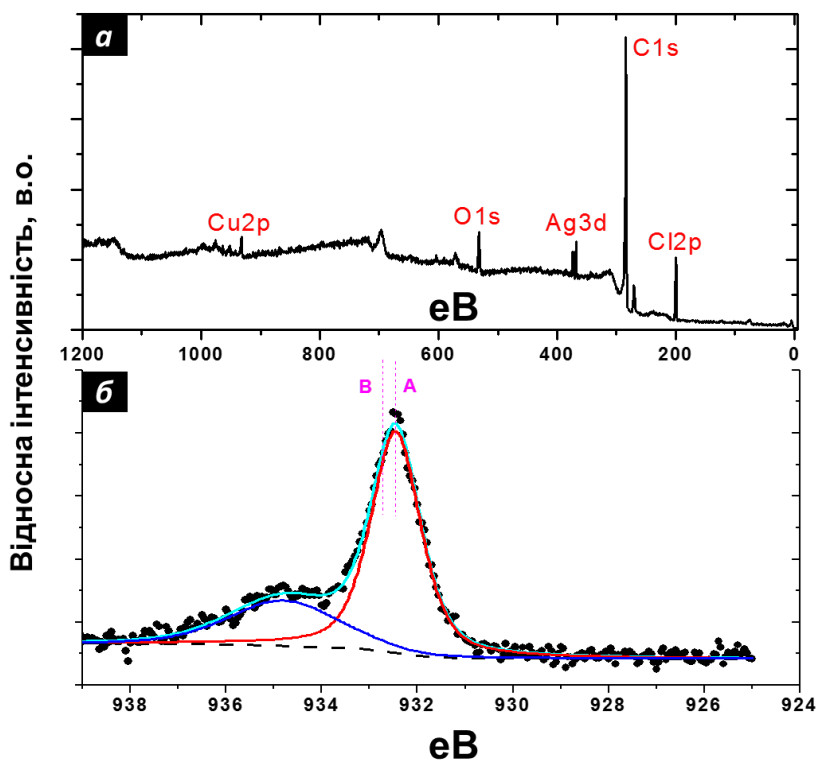


Рис. 5.4. РФС дослідження поверхні ВЕ, модифікованої частинками міді: *a* – широкий спектр; *б* – сигнали осаджених частинок міді при високому розширенні. (● – експериментальні дані; — — — крива, на основі експериментальних даних; — — — базова лінія; — — — пік Cu(I); — — — пік Cu(II))

ПАНі електрополімеризували на поверхню ВЕ, попередньо модифікованого частинками міді і нафіоновою мембраною, шляхом циклічної вольтаметрії. Експериментально встановлено, що оптимальними параметрами для нанесення поліаніліну є: 10 циклів (-0,4 - +1,0 В) із 0,2 М розчину аніліну в 0,5 М НСІ (рис. 5.1 б).

Анодне сканування першого циклу характеризувалося утворенням невеликого гострого піку окислення при -0,12 В, що відповідав окисленню частинок срібла, які, імовірно, потрапили під час виробництва ВЕ із інтегрованого електроду порівняння на поверхню робочого електроду.

При 0,9 В утворювався високий пік окислення мономеру аніліну [224]. Зворотне сканування супроводжувалося утворенням петлі, що відповідала процесу формування нової фази. Кожен вольтаметричний цикл характеризувався наявністю двох окисно-відновних процесів при 0,2 В і 0,5 В, та супроводжувався зростанням

величини піків в даних точках, що є свідченням росту ПАНі-плівки на поверхні Нафіон/Cu/BE. Зміна поверхні також підтверджувалася візуально: колір поверхні електроду змінювався на темно-зелений. Модифікацію електроду шаром ПАНі підтверджували також за допомогою СЕМ (рис. 5.2 *в*), ЕРС (рис. 5.3 *з*) та РФС (рис. 5.5).

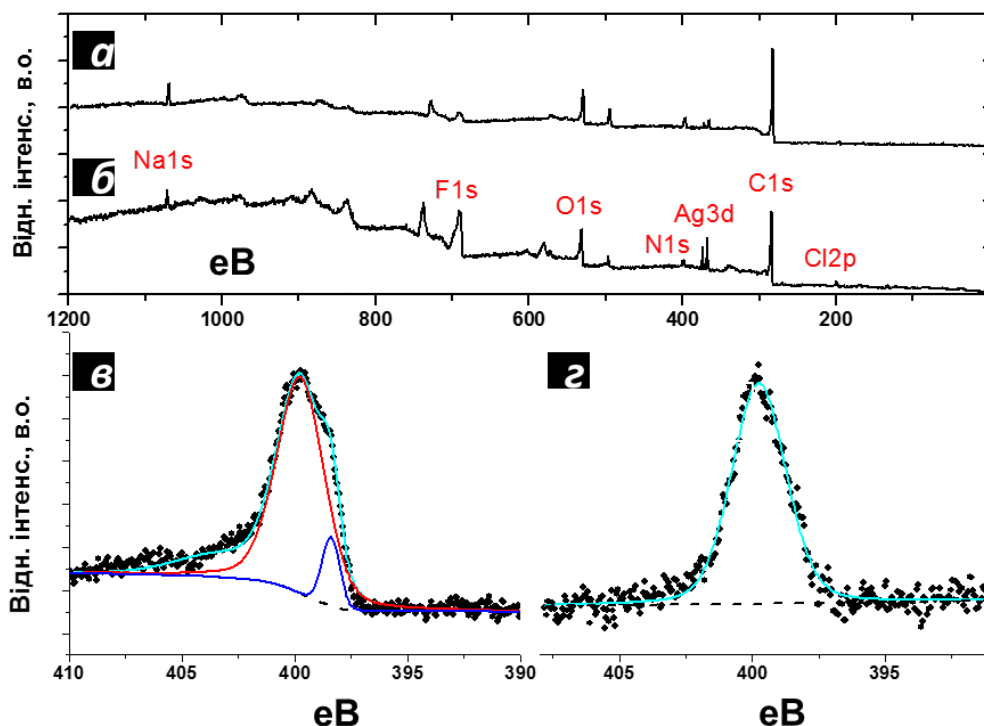


Рис. 5.5. РФС дослідження поверхні ПАНі/ Нафіон/Cu-композиту перед (*а, в*) і після (*б, г*) взаємодії із іонами амонію: *а, б* – широкий спектр; *в, г* – сигнали азоту при високому розширенні. (● – експериментальні дані; — — крива, на основі експериментальних даних; — — базова лінія; — — пік N; — — пік N⁺)

Як видно на спектрах РФС (рис. 5.5) для поверхні композиту ПАНі/Нафіон/Cu присутні піки вуглецю і кисню, що відповідають карбоновій поверхні електроду та адсорбованому кисню. Піки срібла з'явилися, імовірно, через частинки срібла, що потрапили із інтегрованого електроду порівняння. Сигнали міді були порівняно слабкими на фоні інших елементів і тому не виділені на даних спектрах. Піки фтору підтверджують наявність плівки нафіону у композиті. Поява піків азоту свідчить про присутність ПАНі на поверхні електроду.

В ході детального вивчення РФС спектрів ПАНі/Нафіон/Cu-композиту виявлено два типи атомів азоту, представлені на спектрі широким плечем, яке умовно можна розділити на три окремі піки при 398.54 eV, 399.8 eV і 403 eV (рис. 5.5 в). Проте, на спектрі, отриманому для композиту після взаємодії із іонами амонію, виявлено тільки один широкий пік азоту при 399.8 eV (рис. 5.5 з), що свідчить про наявність одного типу азоту. Дані спостереження свідчать про присутність зарядженого і нейтрального атомів азоту у щойно полімеризованому ПАНі (тобто, електропровідного ПАНі). Проте, вимірювання у ФБ при -0,45 В призводять до нейтралізації ПАНі і, власне, втрати електропровідності.

В результаті електрополімеризації аніліну на поверхні Нафіон/ВЕ, що не містила попередньо осадженого мідного шару, утворювався «класичний» вольтаметричний відгук ПАНі (рис. 5.6).

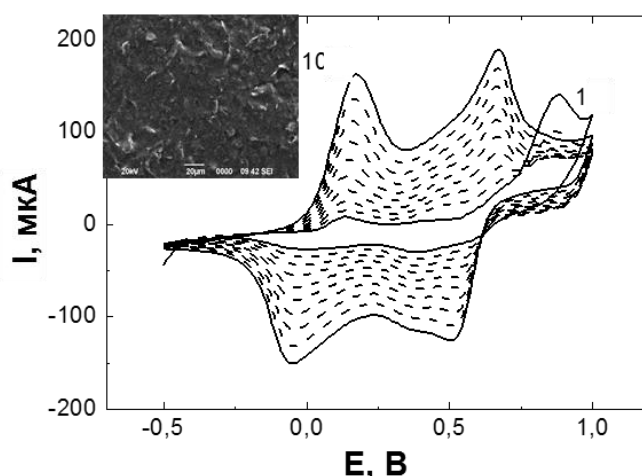


Рис. 5.6. Електрохімічна полімеризація ПАНі на поверхні Нафіон/ВЕ (0,5 М HCl; 0,2 М анілін; швидкість сканування $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$)

Модифіковану поверхню досліджено за допомогою СЕМ (рис. 5.6(вкладка)). Отриманий ПАНі-композит, що не містив мідних частинок, володів низькою чутливістю до іонів амонію. Присутність міді під час полімеризації аніліну призводила до значних змін властивостей полімеру. Під час першого сканування полімеризації аніліну на поверхні ВЕ, попередньо модифікованій мідними частинками, анодний струм був у 6 разів вищий у порівнянні із вільним від міді

процесом полімеризації. Даний ефект може бути пов'язаний із електрокаталітичною полімеризацією аніліну, ініційовану іонами Cu (II) і Cu (III). Дані іони є сильними неспецифічними окисниками органічних молекул і завжди утворюються під час окислення міді, чи модифікованих мідними частинками електродів при високих анодних потенціалах [225-230].

На кожній стадії модифікації поверхні ВЕ проводились вольтаметричні дослідження (рис. 5.1 *в*) та електрохімічна імпедансна спектроскопія (рис. 5.7) у ФБ рН 7,4.

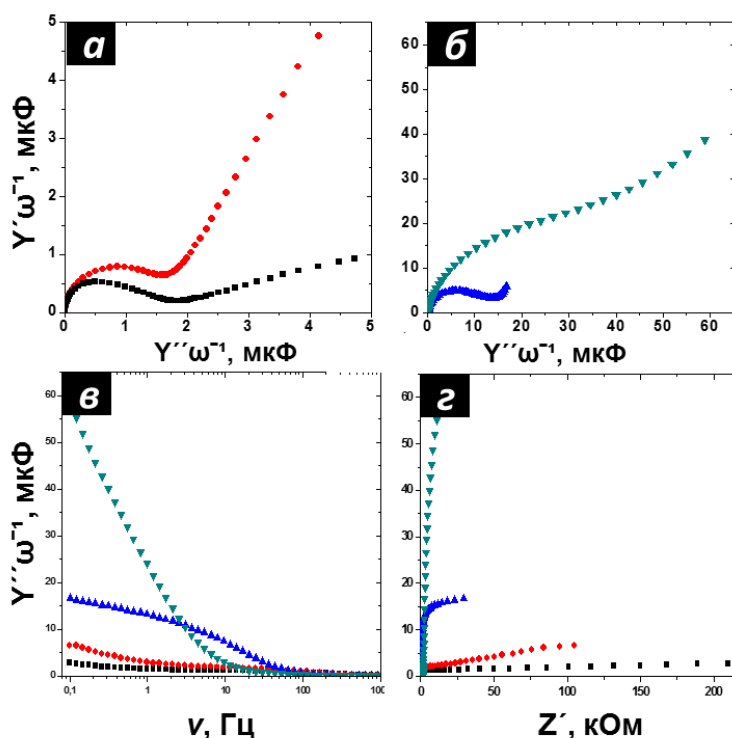


Рис. 5.7. ЕІС спектри модифікованих поверхонь амоній-чутливого композиту на різних стадіях приготування: (■) чистий ВЕ; (●) Cu/ВЕ (I); (▲) Нафіон/ВЕ; (▼) ПАНИ/Нафіон/Cu/ВЕ. (ФБ рН 7,4; амплітуда 5 мВ; $E = 0$ В)

Вольтаметричний відгук Cu/ВЕ супроводжувався утворенням гострого катодного піку (-0,47 В), а також широкого анодного піку (-0,22 В), які відповідали процесам осадження міді за присутності хлорид аніонів [231], а також відлущення осадженої міді з поверхні електроду [232], відповідно. Результати ЕІС засвідчили, що модифікація поверхні електроду частинками міді призводить до незначного підвищення ємності подвійного шару (рис. 5.7 *а*). З цього можна зробити висновок,

що суттєвих змін площі поверхні електроду не відбувалося. Подальша модифікація електроду шаром нафіону призводила до зменшення катодного струму. Даний ефект пов'язаний із анодним зміщенням піку осадження міді на 150 мВ (рис. 5.1 *в*), а також із сильним збільшенням ємнісних властивостей електроду (рис. 5.7 *б*), що відбулися через зниження локального рН за присутності аніонної полімерної плівки. Беручи до уваги криву залежності частоти від загальної ємності, можна стверджувати, що новоутворена плівка нафіону мала пористу поверхню, оскільки різке підвищення ємності на низьких частотах пов'язане із наявністю глибоких пор (рис. 5.7 *в*).

Після електрополімеризації ПАНі на поверхні Нафіон/Cu/BE відбулося пригнічення всіх реакцій на електроді, що пояснюється низькою електропровідністю полімера у нейтральному рН-середовищі (рис. 5.1 *в*). За допомогою ЕІС вдалося встановити, що після утворення шару ПАНі ємність композита суттєво збільшилася (рис. 5.7 *г*). Збільшення ємності композиту стало результатом накопичення заряду в плівці ПАНі, завдяки фарадеївським процесам всередині полімеру, що підтвердилося на графіках загальної ємності (рис. 5.7 *б*) та залежності ємності від активного опору (рис. 5.7 *г*) [233].

5.2. Електрохімічне визначення іонів амонію

Додавання іонів амонію в нейтральний буферний розчин ставало причиною утворення вольтаметричного відгуку у вигляді збільшення катодного і анодного струмів ПАНі/Нафіон/Cu-композиту (рис. 5.8 *а*).

За допомогою амперометричного вимірювання при -0,45 В фіксували електрохімічний відгук ПАНі/Нафіон/Cu/BE на підвищення концентрації іонів амонію в ФБ (рис. 5.8 *б* та *в*). У відповідь на підвищення концентрації іонів амонію відбувалося послідовне підвищення рівня катодного струму.

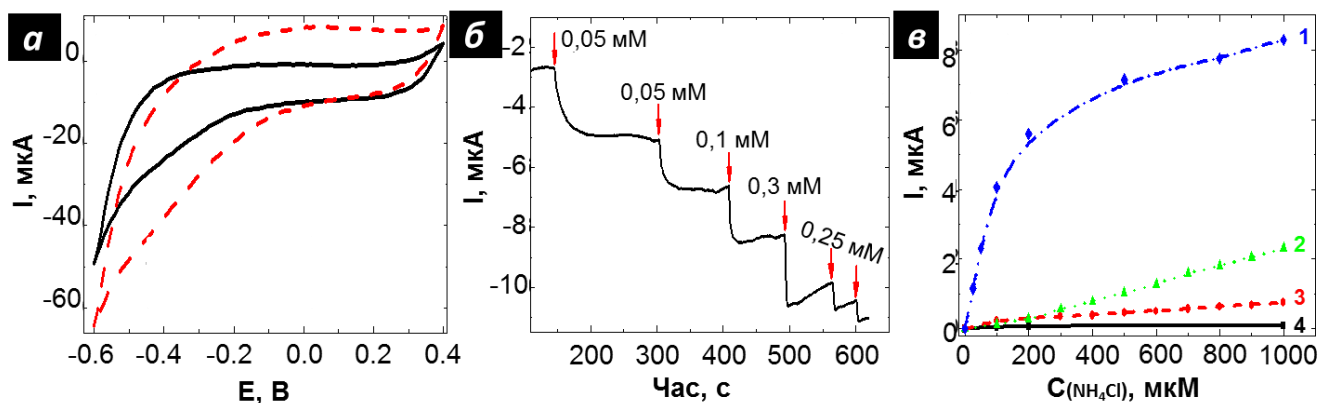


Рис. 5.8. Електрохімічне визначення іонів амонію за допомогою ПАНі/Нафіон/Cu/BE: **а** – циклічні вольтамограми записана до (—) і після (---) внесення 0,25 мМ NH_4Cl (20 мМ ФБ рН 7,4; шв. скан. 50 мВ/с); **б** – амперометричний відгук ПАНі/Нафіон/Cu/BE на послідовне додавання NH_4Cl ($E = -0,45$ В; 20 мМ ФБ рН 7,4); **в** – калібрувальні криві, побудовані на основі амперметричних відгуків: 1 – ПАНі/Нафіон/Cu/BE; 2 – Cu/BE; 3 – ПАНі/Нафіон/BE; 4 – чистий BE

В ході амперометричних досліджень у безкисневому буфері виявлено, що підвищення катодного струму у відповідь на внесення амоній хлориду є незначними у порівнянні із ФБ, збагаченому киснем (рис. 5.9). Це є свідченням того, що реакція відновлення кисню (РВК) є частиною механізму електрохімічного відгуку. Даний ефект дає можливість краще зрозуміти механізм, що лежить в основі амперометричного відгуку ПАНі/Нафіон/Cu/BE на іони амонію. Катодна поляризація за потенціалу $-0,7$ В призводить до появи піку осадження міді за участі хлорид аніонів [231]. При нижчому значенні катодної поляризації ($-0,45$ В), яке використовувалось для амперометричних вимірів, відбувається утворення частинок Cu (I) [234]. Після додавання в розчин іонів амонію відбувається формування комплексів між Cu (I) і нейтральними молекулами аміаку (NH_3) (pK_a 9,24).

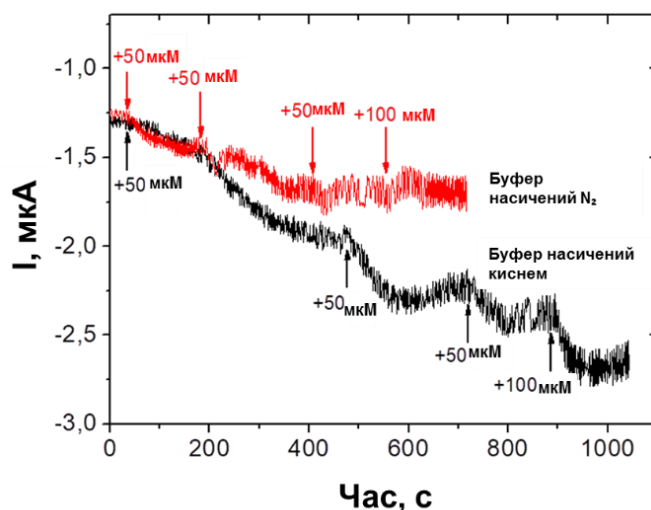


Рис. 5.9. Електрокаталіз кисню на ВЕ, модифікованому ПАні/Нафіон/Cu композитом. Амперометричний відгук сенсора на послідовне внесення NH_4Cl у насичений киснем (■) або азотом (■) ФБ (-0,45 В, pH 7,4)

Новоутворені комплекси, в свою чергу, легко окислюються розчиненим у ФБ киснем до Cu (II) [235], з наступним електрохімічним відновленням до Cu (I), в результаті якого утворюється катодний амперометричний відгук. Чотирьохелектронне відновлення кисню до води [236], що відбувається під час вищезазначених процесів, є свідченням високої реакційної здатності запропонованого каталізатора на основі Cu (I). Іншими словами, формування амонійних комплексів ініціює реакцію відновлення кисню на Cu (I)-утвореннях. Весь процес можна описати як амоній-асоційований РВК електрокаталіз (рис. 5.10).

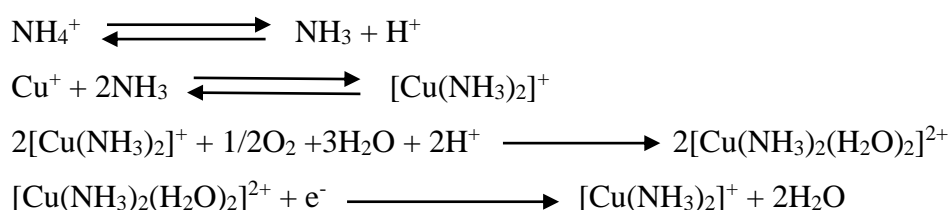


Рис. 5.10. РВК на Cu (I)-ПАні композиті за присутності іонів амонію

В ході ЕІС досліджень амонійного відгуку ПАні/Нафіон/Cu/ВЕ не виявлено істотних змін електропровідності композиту, що виключає можливість

додаткового допування шару ПАНі протонами, які утворювалися внаслідок утворення нейтральних NH_3 -комплексів. Таким чином, підтверджується, що амперометричні відгуки сенсора є наслідком фарадеївських процесів. Проте, повністю механізм, що лежить в основі високої чутливості запропонованого композиту до іонів амонію, залишається неясним, а роль ПАНі і нафіону у даному процесі потребує подальшого вивчення.

Вплив рН на електрохімічний відгук ПАНі/Нафіон/Cu/BE був незначним (рис. 5.11), що демонструє перевагу прямого вольтаметричного визначення над потенціометричним електроаналізом іонів амонію, яке в свою чергу є сильно залежним від змін рН.

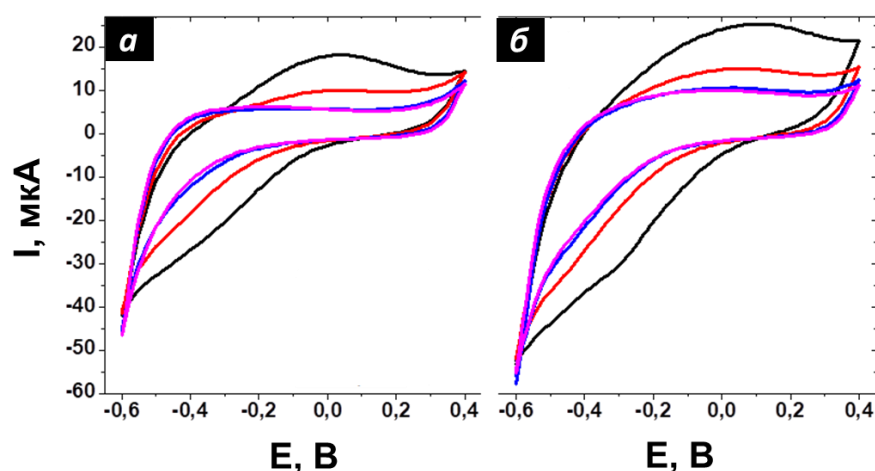


Рис. 5.11. Вплив рН на відгук ВЕ, модифікованого ПАНі/Нафіон/Cu композитом, до іонів амонію. Циклічні вольтамограми записані у розчинах із різним рН перед (а) і після (б) додавання 0,25 мМ розчину NH_4Cl (0,2 М Na_2HPO_4 ; 0,1 М цитрат; швидкість сканування = $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$). Значення рН: ■ – 5; ■ – 6; ■ – 7; ■ – 8

За результатами досліджень визначено основні аналітичні характеристики розробленого амоній-чутливого сенсора. Композитний електрод ПАНі/Нафіон/Cu/BE відзначався високою операційною стабільністю та швидким відгуком на внесення амоній хлориду. У відповідь на зростання концентрації іонів

амонію в ФБ відбувалося різке зростання катодного струму, після чого протягом 20-30 секунд струм стабілізувався.

Згідно даних амперометричних вимірювань ММВ іонів амонію для ПАНі/Нафіон/Cu нанокompозиту становить $0,5 \cdot 10^{-6}$ М (відношення відгуку до рівня шуму = 3, $n=10$), ЛДВ становить 1 – 150 мкМ, а динамічний діапазон 1 – 1000 мкМ (рис. 5.8 в). Також, досить високими є показники відтворюваності відгуків різними електродами, які були виготовлені паралельно, за однакових умов, на однакову концентрацію амоній хлориду (СП = 3%). Сенсор характеризувався високим рівнем стабільності під час зберігання (без втрати чутливості після 1 року зберігання при кімнатній температурі) та операційної стабільності (без втрати чутливості після 100 вимірювань).

За даними, отриманими в ході амперометричних вимірювань, композит ПАНі/Нафіон/Cu володіє значно вищою чутливістю (250 ± 10 $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) ніж поліаніліновий шар ($5,95 \pm 0,8$ $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), або електроосаджена мідь ($18,4 \pm 1,4$ $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) окремо на поверхні вуглецевого електроду, що свідчить про вагому роль всіх компонентів у електрокаталітичному процесі.

В результаті порівняння аналітичних характеристик сконструйованого амоній-чутливого сенсора із існуючими електрохімічними сенсорними системами для визначення іонів амонію (табл. 5.1), можна стверджувати, що ПАНі/Нафіон/Cu/BE володіє низкою переваг. Серед основних переваг слід виділити найвищу чутливість, високу селективність та одну із найнижчих мінімальних меж визначення. На відміну від потенціометричних сенсорів, ПАНі/Нафіон/Cu/BE не чутливий до буферної ємності, рН та електролітичного складу розчину, в якому ведеться вимірювання, що дає можливість проводити точні вимірювання в складних багатокомпонентних розчинах, зокрема в біологічних рідинах. Також слід зазначити, що ЛДВ сенсора добре корелює із вимогами щодо визначення рівня амонію в крові людини.

Таблиця 5.1.

Аналітичні характеристики існуючих амоній-чутливих електрохімічних сенсорів

	<i>Метод реєстрування електрохім. відгуку</i>	<i>ММВ, мкМ</i>	<i>ЛДВ, мкМ</i>	<i>Чутливість, мАМ⁻¹см⁻²</i>
Потенціометрія	Нонактин іммобілізований в поліуретановій мембрані [237]	1	10–1×10 ⁵	-
	Цеолітовий амоній-чутливий польовий транзистор [238]	15	15–1×10 ⁵	-
	Силопреновий амоній-чутливий польовий транзистор [239]	0.01	15–1×10 ⁵	-
	Нонактин іммобілізований в полі- <i>n</i> -бутилакриловій мембрані [240]	1	10–1×10 ⁵	-
Вольтаметрія	Визначення НАД(Ф)Н за допомогою глутаматдегідрогенази на платиновому електроді [241]	10	10–3×10 ²	-
	Визначення НАДН за допомогою глутаматдегідрогенази на карбоновому електроді з медіатором [242]	1.7	1.7– 2.5×10 ²	1.33
	ПАНІ на платиново-карбоновому електроді [190]	5	5–1×10 ³	40±20
	ПАНІ на золотому електроді [14]	83	83– 1.68×10 ³	155±6
	Циклодекстрин [243]	0.12	4.2– 0.66×10 ²	-
	ПАНІ на платиновому електроді [18]	5.35	5–1.25×10 ²	11±0.1
	ПАНІ/Нафюн/Cu/BE [244]	0.5	1–1.5×10²	250±10

5.3. Вплив інтерферентів на роботу хемосенсора

Відомо, що деякі амоній-чутливі амперометричні сенсори можуть реагувати з іншими біоорганічними сполуками, що містять аміногрупи [168]. Питання селективності є критичним, особливо під час вимірювань в біологічних рідинах, де концентрація потенційних інтерферентів є досить високою. Тому, нами проведено контрольні дослідження на чутливість наноконструкції ПАні/Нафіон/Cu до можливих інтерферентів в сироватці крові людини (рис. 5.12): білків (альбумін), креатиніну, сечовини та їх сумішей.

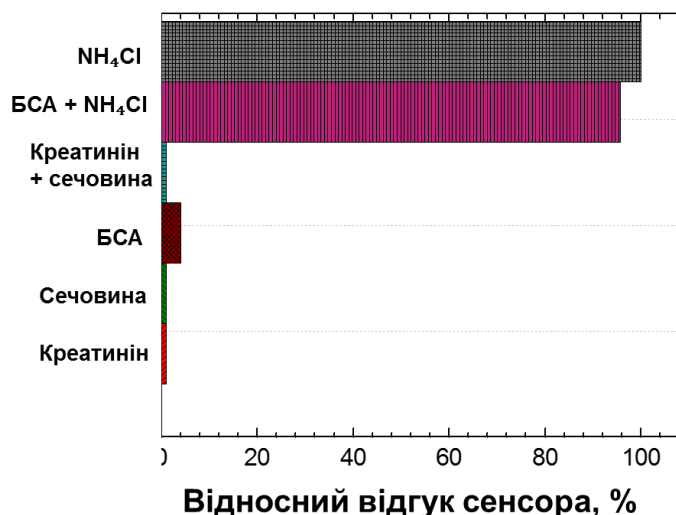


Рис. 5.12. Вплив деяких можливих інтерферентів на чутливість конструції ПАні/Нафіон/Cu. Концентрації речовин: хлорид амонію 5 мкМ; сечовина 300 мкМ; креатинін 10 мкМ; 0,1% альбумін)

Встановлено, що присутність 0,1% альбуміну пригнічує відгук до іонів амонію (величина відгуку зменшується на 4-5%), в той час як присутність сечовини (в 60 разів більша концентрація у порівнянні із NH₄Cl) і креатиніну (в 2 рази більша концентрація у порівнянні із NH₄Cl) на роботу сенсора не впливають.

5.4. Вимірювання у реальних зразках

Виготовлений амоній-чутливий вольтаметричний сенсор використано для визначення NH_4^+ в зразках сироватки крові, отриманих від здорових людей-волонтерів, та пацієнтів, що страждали на цироз печінки та ХХН (рис. 5.13).

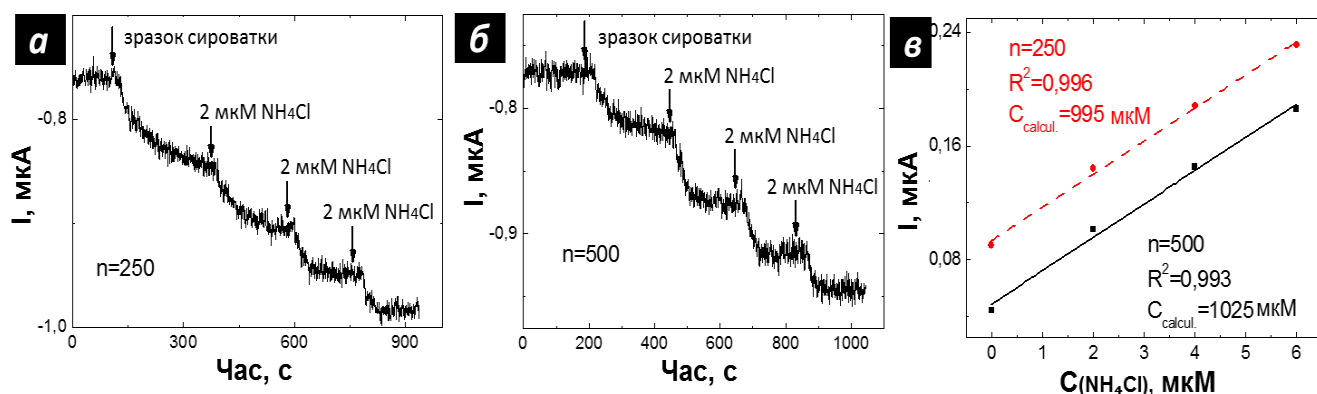


Рис. 5.13. Вимірювання іонів амонію у зразках сироватки венозної крові: **а** – приклад амперметричного відгуку амоній-чутливого сенсора на внесення зразка сироватки крові і послідовні стандартні додавання NH_4Cl ($E = -0,45 \text{ В}$; ФБ рН 7,4). Зразок розведений у 250 разів; **б** – амперметричний відгук амоній-чутливого сенсора на внесення зразка сироватки крові і послідовні стандартні додавання NH_4Cl (-0.45 В , ФБ рН 7.4). Зразок розведений у 500 разів; **в** – визначення іонів амонію в сироватці крові пацієнтів, що страждають на цироз печінки, за допомогою сконструйованого сенсора

Концентрацію NH_4^+ в зразках сироватки крові вимірювали амперметрично з використанням методу стандартних додавань (рис. 5.13). Дані, отримані за допомогою амоній-чутливого сенсора, добре корелювали (коефіцієнт кореляції становив 0,99) з даними, що були отримані стандартним спектрофотометричним методом (рис. 5.14) ВСП = 1 %.

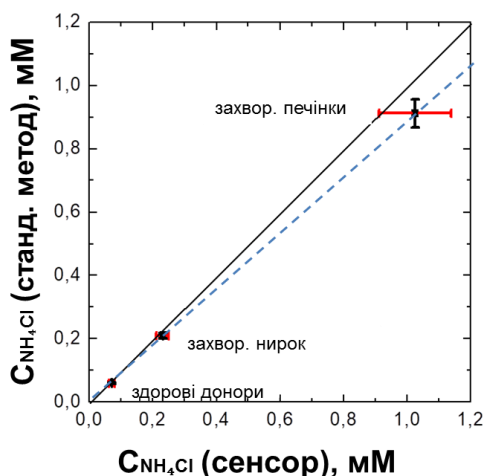


Рис. 5.14. Порівняння результатів визначення концентрації NH_4^+ в сироватці крові отриманих за допомогою амоній-чутливого сенсора і стандартним спектрофотометричним методом. (— — лінія ідеальної кореляції; - - - лінія кореляції, отримана на основі експериментальних даних)

Концентрація іонів амонію в сироватці крові здорових донорів була в 3,5 і 15 разів нижчою, ніж у сироватці пацієнтів, що страждали на захворювання нирок та цироз печінки, відповідно. Отримані результати демонструють можливість використання нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu для визначення NH_4^+ в сироватці крові людини, що може бути застосовано для розробки аналітичних приладів для медичної діагностики та моніторингу навколишнього середовища.

5.5. Висновки

Таким чином, нами вперше розроблено амперометричний сенсор для кількісного визначення іонів амонію на основі електроосаджених наночастинок міді і електрополімеризованого ПАНі. В результаті електрохімічної полімеризації аніліну за присутності іонів міді, закріплених на поверхні вуглецевого електроду за допомогою нафіону, вдалося отримати полімерний композит, що володів високою чутливістю і селективністю до іонів амонію. Основні характеристики

утвореного композиту ПАНі/Нафіон/Cu були ретельно досліджені за допомогою електрохімічних та фізичних методів.

Встановлено, що специфічний до іонів амонію амперометричний відгук композиту ПАНі/Нафіон/Cu утворюється в результаті амоній-опосередкованого каталітичного процесу РВК, що відбувається на мідних наночастинках у товщі композитної плівки. Амоній-чутливий сенсор, на основі ПАНі/Нафіон/Cu, володіє кращими аналітичними характеристиками у порівнянні із раніше представленими у літературі лабораторними прототипами. Так, швидкість відгуку сенсора на іони амонію становить близько 20 с, ММВ становить $0,5 \cdot 10^{-6}$ М, ЛДВ – від 1 до 150 мкМ, а динамічний діапазон – 1-1000 мкМ. Операційна стабільність становила 100 вимірювань, а стабільність при зберіганні – не менше одного року. Представлений нами сенсор успішно застосований для вимірювання рівня іонів амонію в зразках сироватки крові здорових людей, а також пацієнтів, що страждають на цироз печінки та хронічну хворобу нирок.

Результати даного розділу викладені у наступних публікаціях:

Zhybak M.T., Vagin M.Y., Beni V., Liu X., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode // *Microchimica Acta*. – 2016. – Vol. 183, № 6. – P. 1981-1987.

Zhybak M., Dempsey E., Tutner A.P.F., Korpan Y. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copper-plate/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 23.

Zhybak M., Dempsey E., Korpan Y.I. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copperplated/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 29, Special issue. – 2013. – P. 28.

РОЗДІЛ 6

БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ І СЕЧОВИНИ СТВОРЕНІ НА ОСНОВІ АМОНІЙ-СЕЛЕКТИВНОГО НАНОКОМПОЗИТУ ПАНІ/НАФІОН/Cu

В попередньому розділі описано розробку чутливого і селективного до іонів амонію ПАНі/Нафіон/Cu композиту, який успішно застосовано для вольтаметричного та амперометричного визначення концентрації іонів амонію у зразках сироватки крові [244]. Також показано, що даний композит не реагував із аміногрупами білкових молекул (БСА), сечовини і креатиніну, що підтверджує високу специфічність матеріалу до іонів амонію.

Дані результати є досить важливими, оскільки вони демонструють, що поєднання ПАНі і мідних частинок забезпечує підвищення селективності композиту у порівнянні із іншими мідь-вмісними композитами, чутливість яких до ряду сполук, що містять аміногрупи [167], в тому числі до креатиніну [168], нещодавно описано. В попередньому розділі також показано, що ПАНі/Нафіон/Cu композит демонструє в кілька разів вищу чутливість до іонів амонію у порівнянні із електродами, на які окремо електроосаджували тільки мідні наночастинки чи ПАНі. Дані результати свідчать про високий потенціал ПАНі/Нафіон/Cu композиту в якості електрохімічного перетворювача для високо специфічних ферментних біосенсорів для визначення креатиніну та сечовини, на основі відповідних ферментів-гідролаз. Як підтвердження цього, у даному розділі описано результати розробки біосенсорів для визначення креатиніну та сечовини, створені шляхом поєднання ПАНі/Нафіон/Cu композиту разом із іммобілізованими ферментами КДІ та уреазою.

6.1. Імобілізація ферментів

Експерименти проводилися у ФБ із фізіологічним значенням рН 7,4, оскільки цільовим середовищем для роботи біосенсорів була сироватка крові людини. Значення рН 7,4 є близьким до оптимального для уреазі. Проте, рН оптимум для максимальної активності/стабільності КДІ є значно вищим (8,5 – 9,5). Тому, для забезпечення стабільності ферментів застосовано різні способи імобілізації. Спочатку застосовувалась імобілізація ферментів у 5% БСА матриці із наступним поперечним зшиванням у випарах ГА. Стабільність і робота біосенсорів досліджувалась шляхом вимірювання їх відгуків на внесення стандартних концентрацій відповідних речовин у вимірювальну комірку (5 мкМ; 25 мкМ; 50 мкМ), протягом 72 год (рис. 6.1).

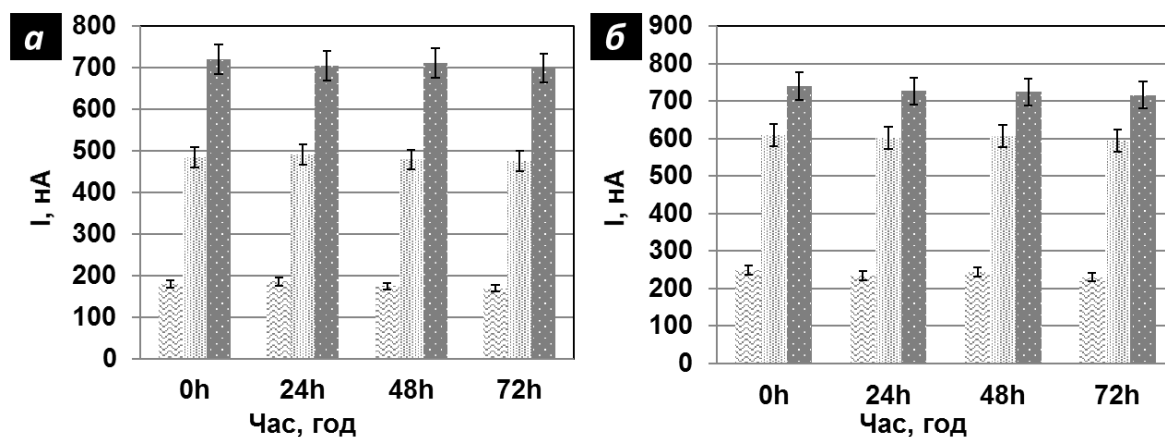


Рис. 6.1. Визначення стабільності виготовлених біосенсорів для визначення креатиніну (*a*) і сечовини (*b*) (за допомогою амперометричного вимірювання при - 0,35 В, ФБ рН 7,4). (Концентрації аналітів (креатиніну (*a*) і сечовини (*b*)) у вимірювальному розчині: ▨ - 0,005 мМ; ▤ - 0,025 мМ; ■ - 0,05 мМ)

Біосенсор на основі уреазі демонстрував доволі високу стабільність і здатність до розщеплення субстрату, особливо на низьких концентраціях. В свою чергу, відгуки біосенсора на основі КДІ були значно нижчими, і супроводжувались

високим рівнем шумів. Фермент КДІ був нестабільний, втрата активності становила 90% протягом 3 год після приготування при кімнатній температурі. Для покращення стабільності (операційної і під час зберігання) ферментних біосенсорів досліджено використання стабілізуючих агентів D-лактитолу і гліцеролу [202]. Використання гліцеролу запобігає втраті ензимної активності при іммобілізації, а також забезпечує кращу гомогенність та адгезію мембрани [245]. Лактитол і гліцерол (2% і 5%, відповідно) були додані в обидві ферментні суміші. Використання стабілізуючих агентів значно покращило роботу біосенсора на основі КДІ (біосенсор працював без втрати стабільності більше 72 год). Як показано на рис. 6.1, протягом 72 год. зниження електрохімічних відгуків для обох біосенсорів не зафіксовано.

6.2. Робота біосенсорів у модельному середовищі (ФБ рН 7,4)

Під час вольтаметричного дослідження сконструйованих біосенсорів після додавання креатиніну чи сечовини у ФБ спостерігалась значна зміна анодного і катодного струмів (рис. 6.2 *a*; рис. 6.3).

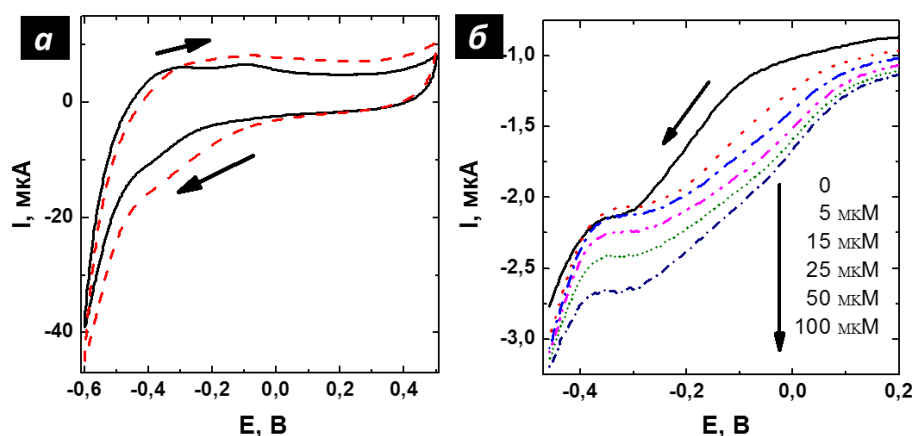


Рис. 6.2. *a* – циклічні вольтамограми записані до (—) і після (---) внесення 0,05 мМ сечовини (ФБ рН 7,4; 50 мВ·с⁻¹); ***б*** – ДПВ відгуки біосенсора для визначення сечовини у відповідь на підвищення концентрації сечовини

Дослідження ДПВ (рис. 6.2 б; рис. 6.4) показали, що у відповідь на поступове додавання відповідних аналітів у робочий розчин ФБ, різко зростає рівень катодного струму у діапазоні $-0,15 - -0,45$ В (проти Ag/AgCl).

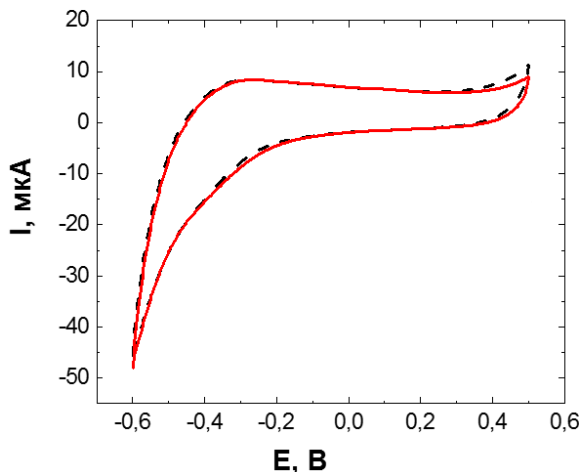


Рис. 6.3. Циклічні вольтамограми записані до (■ ■) і після (■ ■) внесення $0,005$ мМ креатиніну (ФБ рН 7,4, 50 мВ·с⁻¹)

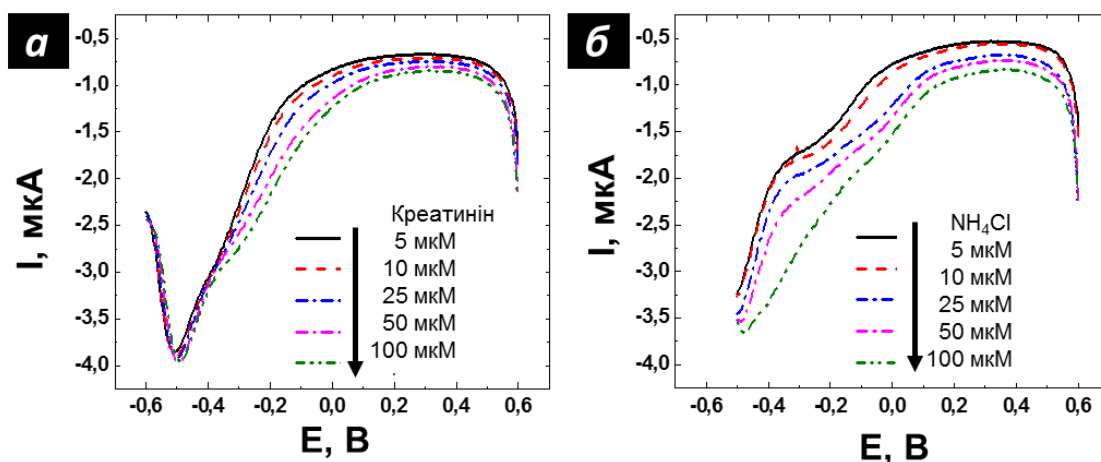


Рис. 6.4. Типові ДПВ відгуки: **a** – біосенсора для визначення креатиніну у відповідь на підвищення концентрації креатиніну; **б** – ПАНі/Нафіон/Cu/BE у відповідь на підвищення концентрації NH_4Cl (ФБ рН 7,4)

З метою покращити якість аналітичного відгуку, а також краще зрозуміти процес генерації сигналу, для обробки кривих ДПВ було застосовано метод компенсування фонового відгуку [246]. Як видно з рис. 6.5а,б, в результаті

вирахування даних фонового відгуку (чистий ФБ) із кривих на відгуки біосенсорів, утворився чіткий катодний пік між $-0,15$ і $-0,25$ В.

На рис. 6.5в представлені калібрувальні криві, побудовані на основі отриманих даних визначення креатиніну і сечовини в модельних розчинах за допомогою сконструйованих біосенсорів, а також порівняно рівень відгуків із сигналами, отриманими на хлорид амонію.

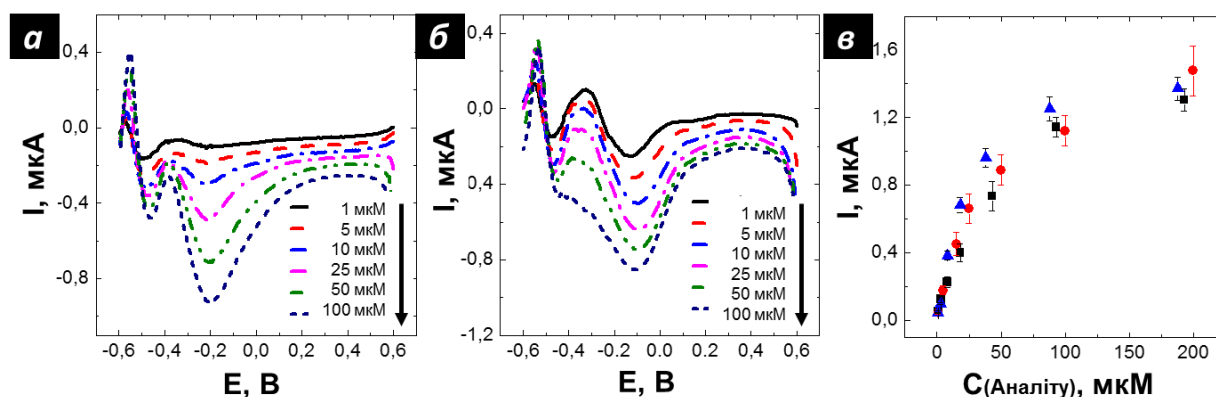


Рис. 6.5. ДПВ відгуки із вирахуванням фононим сигналом: **a** – біосенсора для визначення креатиніну у відповідь на підвищення концентрації креатиніну; **б** – біосенсора для визначення сечовини у відповідь на підвищення концентрації сечовини; **в** – калібрувальні криві, побудовані на основі відгуків ДПВ (■ – креатинін; ● – сечовина; ▲ – NH_4Cl ; ФБ рН 7,4)

Подібність калібрувальних кривих незалежно від аналіту дає підстави стверджувати, що швидкість ферментативного перетворення субстратів не є лімітуючим фактором в роботі біосенсорів. Лінійний діапазон визначення креатиніну становив 8-90 μM , в той час як для біосенсора для визначення сечовини даний параметр становив 5-50 μM . Чутливість біосенсорів визначена на рівні $95 \pm 6.7 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ і $91 \pm 7.8 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ для біосенсорів для визначення креатиніну і сечовини, відповідно.

Не зважаючи на високу чутливість методу ДПВ, для проведення вимірювання було необхідним використання клітки Фарадея, саме вимірювання було досить тривалим у часі (до 10 хв / одне вимірювання) і складним у виконанні

(для візуалізації відгуків потрібна постобробка вихідних даних). Тому наступні експерименти були проведені з використанням хроноамперометрії.

6.3. Хроноамперометричний аналіз

На основі даних вольтаметрії амперометричне визначення креатиніну та сечовини проводили при значенні прикладеного потенціалу -0.35 В. На рис. 6.6а,б представлені амперометричні відгуки біосенсорів у відповідь на підвищення концентрації креатиніну чи сечовини, відповідно.

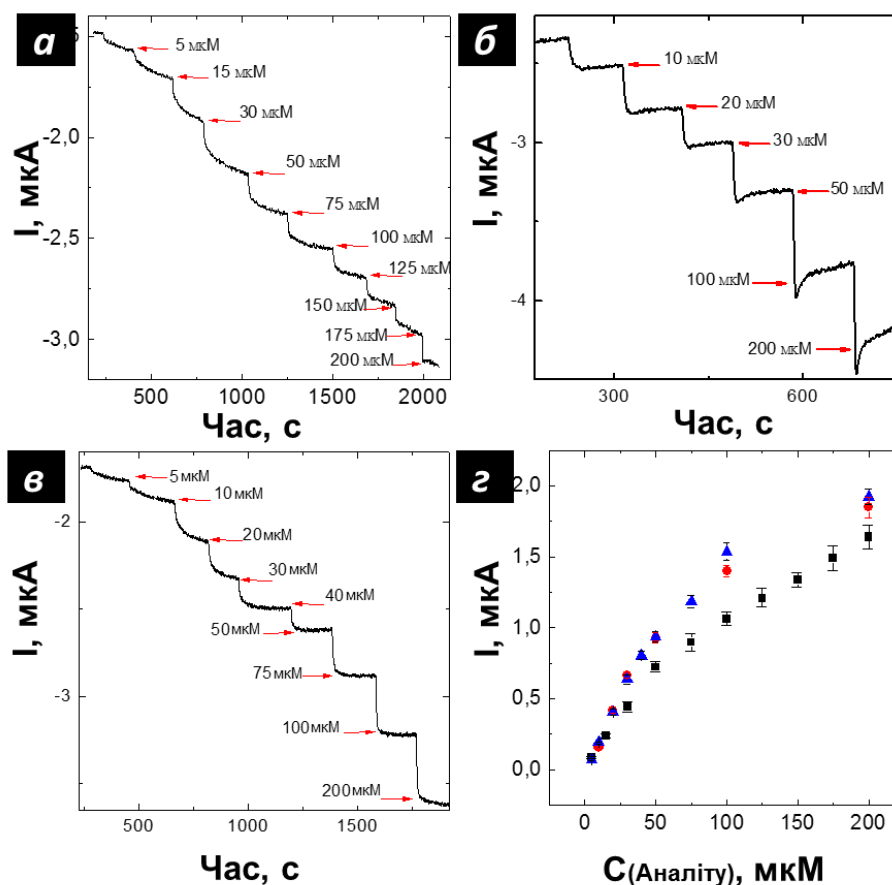


Рис. 6.6. Приклади відгуків амперометричних біосенсорів на підвищення концентрації креатиніну (а), сечовини (б) чи іонів амонію (в); г – калібрувальні криві, побудовані на основі амперометричних вимірювань біосенсорів (■ – креатинін; ● – сечовина; ▲ – NH_4Cl ; $E = -0,35$ В, ФБ рН 7,4)

Чітко прослідковується підвищення катодного струму у результаті збільшення концентрації аналітів у ФБ. Для обох ферментних біосенсорів характерна типова кінетика Міхаеліса-Ментен, із зменшенням відгуків у відповідь на насичення робочого розчину субстратом (коли концентрація субстрату перевищує 150 мкМ) (рис. 6.6 з). Позірна константа Міхаеліса-Ментен ($K_M^{\text{поз}}$) розрахована із рівняння Лайнуївера-Берка, де за основу взяті параметри струму, утвореного в результаті електрохімічного сигналу біосенсора, становила 0.163 мМ для КДІ і 0.139 мМ для уреазі.

Для визначення ефективності ферментативного перетворення субстратів проведено вимірювання відгуків біосенсорів до іонів амонію (рис. 6.6 в). Ефективність утворення продукту ферментативного гідролізу розраховано, виходячи із зафіксованих значень I_{max} . Так, для іммобілізованого фермента КДІ рівень конверсії становив 83%, в той час як для уреазі він складав 94%. Відносно низький рівень перетворення субстрату пояснюється неоптимальними значеннями рН середовища (особливо для КДІ) та температурними умовами (оптимальною температурою для обох ферментів є близько 60 °С). Також, негативний вплив на стабільність структури і часткове інгібування ферментів може бути спричинене випарами ГА під час процесу поперечного зшивання.

Як показано на рис. 6.6а,б, фонові шуми під час вимірювання були досить низькими, на рівні 5-8 нА. Завдяки цьому вдалося проводити точні вимірювання низьких концентрацій креатиніну/сечовини/амонію у межах діапазону 1 – 125 мкМ. Чутливість становила $85 \pm 3.4 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ і $112 \pm 3.36 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ для біосенсора для визначення креатиніну і сечовини, відповідно. ММВ для обох біосенсорів становила 0,5 мкМ ($3 \times \text{СП/чутливість}$). Створені біосенсори відзначалися швидкими відгуками на внесення відповідних аналітів (15 с). Стандартна похибка при амперометричних вимірюваннях не перевищувала 8-9% у діапазоні концентрацій 1 – 15 мкМ, 6-8% на проміжку 20 – 50 мкМ, і 5-6% на проміжку 75-200 мкМ ($n=11$).

6.4. Порівняння характеристик представлених біосенсорів із існуючими аналогами

Порівняння ключових аналітичних параметрів представлених біосенсорів для визначення креатиніну (табл. 6.1) і сечовини (табл. 6.2) із існуючими та раніше описаними в літературі аналогами дає підстави стверджувати, що розроблені нами біосенсори мають вищу чутливість.

Таблиця 6.1.

Аналітичні характеристики амперометричних біосенсорів для визначення креатиніну

<i>Метод детекції та біорозпізнавальний компонент</i>	<i>ММВ, мкМ</i>	<i>ЛДВ, мкМ</i>	<i>Чутливість, $мА \cdot М^{-1} \cdot см^{-2}$</i>
КА-КІ-СО* три-ферментний комплекс на Pt електроді [247]	1-2	10-5000	23
КА-КІ-СО три-ферментний комплекс в ПКС на Pt електроді [162]	0.3	1-150	34
КДІ в газопроникній мембрані [248]	-	20-1000	0.001
КА-КІ-СО три-ферментний комплекс в ПКС на Pt електроді [249]	5	5-150	5
КА-КІ-СО три-ферментний комплекс в ПВА на Pt електроді [213]	10	10-1000	0.125
Графт КА-КІ-СО три-ферментний комплексу на Pt електроді [250]	-	3.2-320	-
КДІ іммобіліз. на ПАНІ/Нафіон/СВЕ [237]	0.5	0.5-500	-
КДІ іммобіліз. на ПАНІ/Нафіон/Cu/BE [251]	0.5	1-100	85±3.4

Примітка. * - креатиніназа (КА), креатиназа (КІ) та саркозиноксидаза (СО)

Таблиця 6.2.

Аналітичні характеристики амперометричних біосенсорів для визначення сечовини

<i>Метод детекції та біорозпізнавальний компонент</i>	<i>ММВ, мкМ</i>	<i>ЛДВ, мкМ</i>	<i>Чутливість, $мА \cdot М^{-1} \cdot см^{-2}$</i>
Уреаза енкапсульована в нейлонову мембрану [241]	10	10-300	-
Уреаза адсорбована на графітово-платиновому електроді [252]	3	10-250	0.2
Уреаза адсорбована на ТВ-вуглецевому електроді [253]	200	200-800	0.98
Уреаза іммобіліз. на ПАНІ/Нафіон/Au [14]	50	500-5000	31±2
Уреаза іммобіліз. в полі(вініл-фероценовій) мембрані [254]	1	1-250	-
Уреаза іммобіліз. на ПАНІ/Нафіон/Pt електроді [18]	3	30-300	11.6±0.05
Уреаза іммобіліз. на NiO-ІТО-електрод [255]	-	830-16650	21.33
Уреаза іммобіліз. на ПАНІ/Нафіон/Cu/BE [251]	0.5	1-100	112±3.36

6.5. Визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людей

Для того, щоб продемонструвати здатність виготовлених біосенсорів працювати у реальних біологічних рідинах, було взято зразки сироватки крові пацієнтів, що страждають на ХХН, і проведений аналіз на вміст креатиніну і сечовини. Аналіз проводили амперометрично на портативному потенціостаті μ Stat

400, використовуючи метод стандартних додавань. Беручи до уваги той факт, що зразки сироватки крові взяті у людей, які страждають на ХХН, проводилось попереднє розведення зразків у ФБ перед вимірюванням таким чином, щоб очікувана концентрація аналітів знаходилася у межах лінійного діапазону визначення біосенсорів. Потрібне розведення зразків розраховувалось на основі існуючих літературних даних про концентрацію цільових аналітів в крові при ХХН. При визначенні креатиніну у зразках сироватки фактор розведення становив 100-500 разів, для визначення сечовини – 1000-2000 разів.

Визначено концентрації креатиніну і сечовини для 5 зразків сироватки крові людей, що попередньо пройшли процедуру діалізу. Типові амперометричні відгуки та крива лінійної регресії для методу стандартних додавань, що використовувався під час визначення креатиніну і сечовини, представлені на рис. 6.7-6.8.

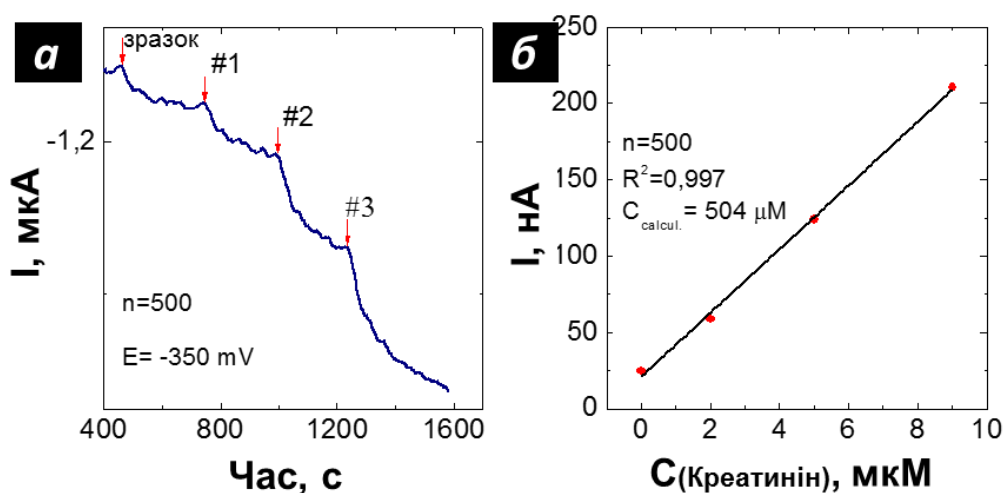


Рис. 6.7. *a* – приклад амперометричного відгуку біосенсора для визначення креатиніну на внесення зразка сироватки крові і послідовні стандартні додавання креатиніну (-0,35 В, ФБ рН 7,4). Зразок розведений у 500 разів; *б* – визначення креатиніну в сироватці крові пацієнтів, що страждають на ХХН, за допомогою сконструйованого сенсора. Статистичні дані: R^2 – коефіцієнт лінійної регресії; n – фактор розведення; C_{calcul} – обчислена концентрація іонів амонію в зразку, мкМ.

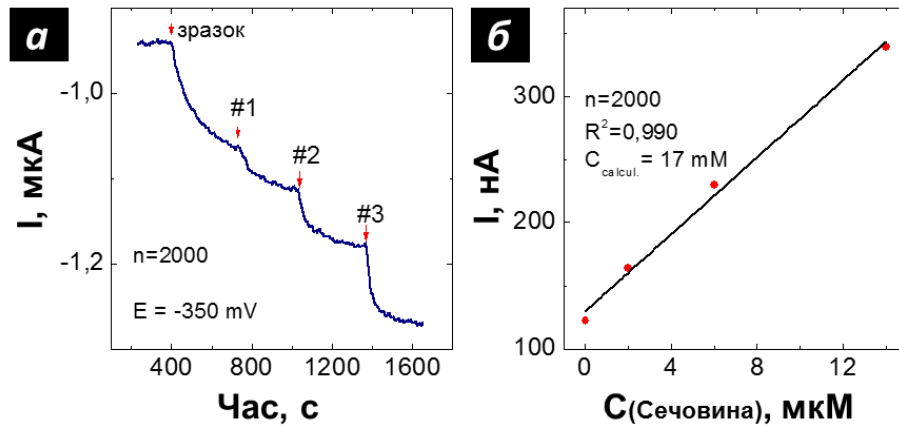


Рис. 6.8. *a* – приклад амперометричного відгуку біосенсора для визначення сечовини на внесення зразка сироватки крові і послідовні стандартні додавання сечовини (-0,35 В, ФБ рН 7,4). Зразок розведений у 2000 разів; *б* – визначення сечовини в сироватці крові пацієнтів, що страждають на ХХН, за допомогою сконструйованого сенсора. Статистичні дані: R^2 – коефіцієнт лінійної регресії; n – фактор розведення; C_{calcul} – обчислена концентрація іонів амонію в зразку, мкМ.

Отримані за допомогою біосенсорів результати аналізу добре корелюють із результатами стандартних ферментних спектрофотометричних методів визначення креатиніну і сечовини (рис. 6.9).

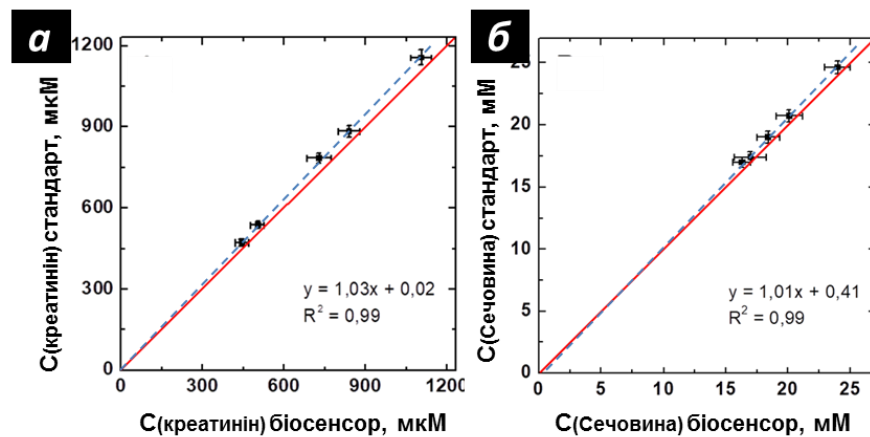


Рис. 6.9. Порівняння результатів визначення концентрації креатиніну (*a*) і сечовини (*б*) в сироватці крові пацієнтів, що страждають на ХХН, отриманих за допомогою сконструйованих біосенсорів і стандартним спектрофотометричним шляхом. (■ – лінія ідеальної кореляції; ■ – лінія кореляції, отримана на основі експериментальних даних)

Значення ВСП становило 4-8% (n=3), в той час, як ВСП для стандартних методів становить 2.5%. На основі отриманих результатів можна стверджувати про можливість застосування запропонованих біосенсорів для амперометричного визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людей, що може бути використаним для подальшої розробки приладів для віддаленої персоналізованої діагностики.

6.6. Висновки

Отже, нами розроблено амперометричні біосенсори для визначення креатиніну і сечовини, в основі яких лежить композит ПАНі/Нафіон/Cu та іммобілізований гідролізуючий фермент (КДІ або уреаза). Біосенсори характеризуються швидким відгуком до цільових аналітів (15 с), високою селективністю і чутливістю ($85 \pm 3.4 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ і $112 \pm 3.36 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ для біосенсора для визначення креатиніну і сечовини, відповідно), з ММВ - 0.5 мкМ та ВСП $\leq 8\%$. Лінійний діапазон визначення становить 1 – 125 мкМ. Стабільність обох біосенсорів без втрат чутливості становила 3 дні. Використання гліцеролу і лактитолу у ферментній мембрані значно підвищило стабільність біосенсорів, особливо у випадку КДІ. Результати, отримані під час біосенсорного аналізу зразків сироватки крові людей, що страждають на ХХН, добре корелюють із даними, отриманими у комерційних клінічних лабораторіях.

Результати даного розділу викладені у наступних публікаціях:

Zhybak M.T., Beni V., Vagin M.Y., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Vol. 77. – P. 505-511.

Zhybak M., Beni V., Turner A., Korpan Y. Ammonium ion selective copper/polyaniline-based nanocomposite for creatinine and urea biosensing // Materials of VIII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 30, Special issue. – 2014. – P. 23.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нові підходи щодо розробки амперометричних хемо- та біосенсорних систем на основі високочутливих електронанесених наноконструкцій та іммобілізованих ферментів (оксидоредуктаз чи гідролаз) для визначення клінічно важливих низькомолекулярних метаболітів, а саме: холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну та сечовини. Створено відповідні лабораторні прототипи хемо- та біосенсорних систем і проведено їх оптимізацію для роботи у реальних зразках (дитяча молочна суміш, фармакологічні препарати, зразки сироватки і плазми крові людини).

1. Досліджено вплив багат шарових вуглецевих нанотрубок модифікованих аміногрупами (БШВНТ-NH₂) на збереження стабільності ферментних мембран на основі БСА-ХОД, іммобілізованих у випарах глутаральдегіду. Показано, що при наявності БШВНТ-NH₂ за концентрації 2% у складі ферментних мембран, біосенсори зберігають стабільність впродовж 2 тижнів, а через 5 місяців втрачають ~30% початкової чутливості.

2. Розроблено амперометричний біосенсор для визначення холіну на основі іммобілізованої ХОД у SiO₂-золі методом ЕХН на поверхні друкованих золотих електродів. Всебічно досліджені аналітичні характеристики розроблених біосенсорів: $K_M^{ПОЗ}$ ХОД (0,22 мМ), чутливість (480 А·М⁻¹·м²), лінійний діапазон (0,02 - 0,6 мМ), ММВ (6 мкМ), стабільність при зберіганні (3 дні), операційна стабільність (30 вимірювань). Оптимізовано спосіб передобробки реальних зразків MnO₂ (11 мМ MnO₂ протягом 15 хвилин) для повного усунення інтерферуючого впливу аскорбінової кислоти. Біосенсор апробовано при аналізі складу зразків дитячого харчування.

3. Вперше розроблено та оптимізовано амперометричний моноферментний сенсор на основі рекомбінантної АДІ та амоній-чутливого

ПАНі/Нафіон/ПЕ для визначення L-аргініну. Досліджено аналітичні характеристики біосенсора: $K_M^{\text{поз}}$ АДІ (0.31 ± 0.05 мМ L-Арг), чутливість (684 ± 32 А·М⁻¹·м⁻²), лінійний діапазон (0,003 - 0,2 мМ), ММВ (0,001 мМ), стабільність при зберіганні - 35 днів, операційна стабільність - 100 вимірювань. За допомогою АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ проведено вимірювання L-Арг в реальних зразках (фармацевтичні препарати та зразки плазми крові людини), результати яких добре корелюють із флуорометричним ферментним методом.

4. Розроблено амперометричний хемосенсор на основі електроосадженої міді та електрополімеризованого поліаніліну (ПАНі) для визначення іонів амонію. Встановлено, що специфічний до NH_4^+ амперометричний відгук утворюється в результаті амоній-опосередкованого каталітичного процесу реакції відновлення кисню, що відбувається на мідних частинках у товщі композитної плівки. ПАНі/Нафіон/Cu/BE володів кращими аналітичними характеристиками (чутливість (2500 ± 100 А·М⁻¹·м⁻²), лінійний діапазон (0,001 – 0,15 мМ), динамічний діапазон (0,001 – 1 мМ), ММВ (0,5 мкМ), стабільність операційна і при зберіганні – 1 рік) у порівнянні із існуючими аналогами. Хемосенсор успішно застосований для вимірювання концентрації NH_4^+ в зразках сироватки крові людей.

5. Розроблено амперометричні біосенсори для визначення креатиніну і сечовини на основі ПАНі/Нафіон/Cu композиту та іммобілізованих гідролаз (КДІ або уреазі). Досліджено аналітичні характеристики біосенсорів: лінійний діапазон (1 – 125 мкМ), чутливість (850 ± 34 А·М⁻¹·м⁻² і $1120 \pm 33,6$ А·М⁻¹·м⁻² для біосенсорів для визначення креатиніну і сечовини, відповідно), ММВ для обох біосенсорів – 0,5 мкМ, стабільність 72 години. За допомогою створених біосенсорів проведені вимірювання креатиніну і сечовини в зразках сироватки крові людей. Отримані результати добре корелювали із результатами стандартних методів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Medina S, Dominguez-Perles R, Gil J, Ferreres F, Gil-Izquierdo A. Metabolomics and the diagnosis of human diseases-A guide to the markers and pathophysiological pathways affected. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(7):823-48.
2. Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, et al. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—A molecular perspective. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(4):1308-19.
3. ASHWOOD ER, Bruns E, David E, Burtis CA, Tietz NW. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 2006.
4. Eggenstein C, Borchardt M, Diekmann C, Gründig B, Dumschat C, Cammann K, et al. A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999;14(1):33-41.
5. Barsotti RJ. Measurement of ammonia in blood. *The Journal of pediatrics*. 2001;138(1):S11-S20.
6. Nijveldt R, Siroen M, van der Hoven B, Teerlink T, Prins H, Girbes A, et al. High plasma arginine concentrations in critically ill patients suffering from hepatic failure. *European journal of clinical nutrition*. 2004;58(4):587-93.
7. Kim RB, Morse BL, Djurdjev O, Tang M, Muirhead N, Barrett B, et al. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney international*. 2016;89(5):1144-52.
8. Haynes RJ, Winearls CG. *Chronic kidney disease*. Surgery (Oxford). 2010;28(11):525-9.
9. Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, et al. Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Journal of Chromatography B*. 2015;974:24-34.

10. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer' s disease. *Talanta*. 2015;131:480-9.
11. Turner AP. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(8):3184-96.
12. Ren X, Tang F, Liao R, Zhang L. Using gold nanorods to enhance the current response of a choline biosensor. *Electrochimica Acta*. 2009;54(28):7248-53.
13. Qin X, Wang H, Wang X, Miao Z, Chen L, Zhao W, et al. Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes-poly (diallyldimethylammonium chloride) biocomposite for the determination of choline. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010;147(2):593-8.
14. Luo Y-C, Do J-S. Urea biosensor based on PANi (urease)-Nafion®/Au composite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004;20(1):15-23.
15. Tsuchida T, Yoda K. Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clinical Chemistry*. 1983;29(1):51-5.
16. Nieh C-H, Tsujimura S, Shirai O, Kano K. Amperometric biosensor based on reductive H₂O₂ detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination. *Analytica chimica acta*. 2013;767:128-33.
17. Nikolelis D, Hadjiioannou T. Construction of an arginine enzyme electrode and determination of arginine in biological materials. *Analytica Chimica Acta*. 1983;147:33-9.
18. Stasyuk N, Smutok O, Gayda G, Vus B, Koval'chuk Y, Gonchar M. Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;37(1):46-52.
19. Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*. 1962;102(1):29-45.
20. Guan A, Hamilton P, Wang Y, Gorbet M, Li Z, Phillips KS. Medical devices on chips. *Nature Biomedical Engineering*. 2017;1:0045.

21. Goonewardena SN, Prevetle LE, Desai AA. Metabolomics and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2010;12(4):267-72.
22. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of toxicology*. 2011;85(1):5-17.
23. Harrigan GG, Goodacre R. *Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*: Springer Science & Business Media; 2012.
24. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry—2011 update. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(19):1749-61.
25. Waltz E. *After Theranos*. Nature Publishing Group; 2017.
26. Sekretaryova AN, Eriksson M, Turner AP. Bioelectrocatalytic systems for health applications. *Biotechnology advances*. 2016;34(3):177-97.
27. Eggins BR. *Chemical sensors and biosensors*: John Wiley & Sons; 2008.
28. Turner A, Karube I, Wilson GS. *Biosensors: fundamentals and applications*: Oxford university press; 1987.
29. Compton RG, Wildgoose GG, Rees NV, Streeter I, Baron R. Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays. *Chemical Physics Letters*. 2008;459(1):1-17.
30. Feeney R, Kounaves SP. Microfabricated ultramicroelectrode arrays: Developments, advances, and applications in environmental analysis. *Electroanalysis*. 2000;12(9):677-84.
31. Huang XJ, O'Mahony AM, Compton RG. Microelectrode arrays for electrochemistry: approaches to fabrication. *Small*. 2009;5(7):776-88.
32. del Campo FJ. Miniaturization of electrochemical flow devices: a mini-review. *Electrochemistry Communications*. 2014;45:91-4.
33. Wang J. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta*. 2002;56(2):223-31.
34. Vashist SK, Luppia PB, Yeo LY, Ozcan A, Luong JH. Emerging technologies for next-generation point-of-care testing. *Trends in biotechnology*. 2015;33(11):692-705.

35. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Al-Shamma'a A, editors. A novel handheld electrochemical analyzer system interfaced to a smartphone. *Key Engineering Materials*; 2013: Trans Tech Publ.
36. Salvi F, Gadda G. Human choline dehydrogenase: medical promises and biochemical challenges. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013;537(2):243-52.
37. Zeisel SH. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012;733(1):34-8.
38. Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Bleie Ø, Ueland PM. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *The Journal of nutrition*. 2008;138(5):914-20.
39. Garner SC, Chou S-C, Mar M-H, Coleman RA, Zeisel SH. Characterization of choline metabolism and secretion by human placental trophoblasts in culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1993;1168(3):358-64.
40. Zeisel SH. Nutritional importance of choline for brain development. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004;23(sup6):621S-6S.
41. Nurk E, Refsum H, Bjelland I, Drevon CA, Tell GS, Ueland PM, et al. Plasma free choline, betaine and cognitive performance: the Hordaland Health Study. *British Journal of Nutrition*. 2013;109(3):511-9.
42. Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Gonzalez-Parra E, Sanz AB, et al. Nutrients turned into toxins: microbiota modulation of nutrient properties in chronic kidney disease. *Nutrients*. 2017;9(5):489.
43. Phillips MM. Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(8):2103-12.
44. Zhang Z, Wang X, Yang X. A sensitive choline biosensor using Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimics. *Analyst*. 2011;136(23):4960-5.
45. Zhang H, Yin Y, Wu P, Cai C. Indirect electrocatalytic determination of choline by monitoring hydrogen peroxide at the choline oxidase-prussian blue modified iron phosphate nanostructures. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;31(1):244-50.

46. Woollard DC, Indyk HE. Determination of choline in milk and infant formulas by enzymatic analysis: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 2000;83(1):131-8.
47. Ikarashi Y, Maruyama Y. Liquid chromatography with electrochemical detection for quantitation of bound choline liberated by phospholipase D hydrolysis from phospholipids containing choline in rat plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1993;616(2):323-6.
48. Marquette C, Blum L. Self-containing reactant biochips for the electrochemiluminescent determination of glucose, lactate and choline. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2003;90(1):112-7.
49. Tsafack VC, Marquette CA, Pizzolato F, Blum LcJ. Chemiluminescent choline biosensor using histidine-modified peroxidase immobilised on metal-chelate substituted beads and choline oxidase immobilised on anion-exchanger beads co-entrapped in a photocrosslinkable polymer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000;15(3):125-33.
50. Zeng H, Jiang Y, Yu J, Xie G. Choline oxidase immobilized into conductive poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) film for choline detection. *Applied Surface Science*. 2008;254(20):6337-40.
51. McEntyre CJ, Slow S, Lever M. Measurement of plasma free choline by high performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with 1-naphthyl isocyanate. *Analytica chimica acta*. 2009;644(1):90-4.
52. Chen Z, Ren X, Meng X, Chen D, Yan C, Ren J, et al. Optical detection of choline and acetylcholine based on H₂O₂-sensitive quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;28(1):50-5.
53. Yuan H, Gadda G. Importance of a serine proximal to the C (4a) and N (5) flavin atoms for hydride transfer in choline oxidase. *Biochemistry*. 2011;50(5):770-9.
54. Fan F, Gadda G. On the catalytic mechanism of choline oxidase. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(7):2067-74.
55. Jin J, Muroga M, Takahashi F, Nakamura T. Enzymatic flow injection method for rapid determination of choline in urine with electrochemiluminescence detection. *Bioelectrochemistry*. 2010;79(1):147-51.

56. Wu X, Chai Y, Yuan R, Liang W, Yuan D. A novel electrochemiluminescence choline biosensor based on biofunctional AMs-ChO biocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;204:429-36.
57. Pal S, Sharma MK, Danielsson B, Willander M, Chatterjee R, Bhand S. A miniaturized nanobiosensor for choline analysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;54:558-64.
58. Marquette CA, Degiuli A. Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003;19(5):433-9.
59. Bandodkar AJ, Wang J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in biotechnology*. 2014;32(7):363-71.
60. Moscone D, D'ottavi D, Compagnone D, Palleschi G, Amine A. Construction and analytical characterization of Prussian blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Analytical Chemistry*. 2001;73(11):2529-35.
61. Razola SS, Pochet S, Grosfils K, Kauffmann J. Amperometric determination of choline released from rat submandibular gland acinar cells using a choline oxidase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003;18(2):185-91.
62. Curulli A, Valentini F, Orlanduci S, Terranova M, Palleschi G. Pt based enzyme electrode probes assembled with Prussian Blue and conducting polymer nanostructures. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004;20(6):1223-32.
63. Mitchell KM. Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensors characterized in vitro and in vivo. *Analytical chemistry*. 2004;76(4):1098-106.
64. Gülce H, Aktaş Y, Gülce A, Yıldız A. Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis. *Enzyme and microbial technology*. 2003;32(7):895-9.
65. Qin X, Wang H, Wang X, Li S, Miao Z, Huang N, et al. Amperometric choline biosensors based on multi-wall carbon nanotubes and layer-by-layer assembly of multilayer films composed of Poly (diallyldimethylammonium chloride) and choline oxidase. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(4):1453-7.

66. Wang J, Liu G, Lin Y. Amperometric choline biosensor fabricated through electrostatic assembly of bienzyme/polyelectrolyte hybrid layers on carbon nanotubes. *Analyst*. 2006;131(4):477-83.
67. Yang M, Yang Y, Yang Y, Shen G, Yu R. Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membrane. *Analytica Chimica Acta*. 2005;530(2):205-11.
68. Pati S, Quinto M, Palmisano F, Zambonin PG. Determination of choline in milk, milk powder, and soy lecithin hydrolysates by flow injection analysis and amperometric detection with a choline oxidase based biosensor. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(15):4638-42.
69. Panfili G, Manzi P, Compagnone D, Scarciglia L, Palleschi G. Rapid assay of choline in foods using microwave hydrolysis and a choline biosensor. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(8):3403-7.
70. Song Z, Huang J-D, Wu B-Y, Shi H-B, Anzai J-I, Chen Q. Amperometric aqueous sol-gel biosensor for low-potential stable choline detection at multi-wall carbon nanotube modified platinum electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006;115(2):626-33.
71. Hou S, Ou Z, Chen Q, Wu B. Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;33(1):44-9.
72. Avnir D, Braun S, Lev O, Ottolenghi M. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chemistry of Materials*. 1994;6(10):1605-14.
73. Braun S, Rappoport S, Zusman R, Avnir D, Ottolenghi M. Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Materials Letters*. 1990;10(1-2):1-5.
74. Dave BC, Dunn B, Valentine JS, Zink JJ. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Analytical Chemistry*. 1994;66(22):1120A-7A.
75. Gill I, Ballesteros A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in biotechnology*. 2000;18(7):282-96.

76. Gupta R, Chaudhury N. Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(11):2387-99.
77. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*. 1990;108(2):331-7.
78. Reynolds J, Daly J, Zhang S, Evantash E, Shou J, Sigal R, et al. Immunomodulatory mechanisms of arginine. *Surgery*. 1988;104(2):142-51.
79. Barbul A, Fishel RS, Shimazu S, Wasserkrug HL, Yoshimura NN, Tao RC, et al. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. *Journal of Surgical Research*. 1985;38(4):328-34.
80. Barbul A, Wasserkrug HL, Yoshimura N, Tao R, Efron G. High arginine levels in intravenous hyperalimentation abrogate post-traumatic immune suppression. *Journal of Surgical Research*. 1984;36(6):620-4.
81. Yokoro M, Suzuki M, Murota K, Otsuka C, Yamashita H, Takahashi Y, et al. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NOS inhibitor, is actively metabolized in rat erythrocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2012;76(7):1334-42.
82. Marini JC. Arginine and ornithine are the main precursors for citrulline synthesis in mice. *The Journal of nutrition*. 2012;142(3):572-80.
83. Yan X, Takahara M, Xie L, Gondo C, Setsu N, Oda Y, et al. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *Journal of dermatological science*. 2011;61(3):211-5.
84. Rotondo R, Mastracci L, Piazza T, Barisione G, Fabbi M, Cassanello M, et al. Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression. *International journal of cancer*. 2008;123(5):1108-16.
85. Morales C, editor *Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach*. *Anales del sistema sanitario de Navarra*; 2011.
86. Lacroix C, Caubet C, Gonzalez-de-Peredo A, Breuil B, Bouyssié D, Stella A, et al. Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014;13(12):3421-34.

87. Хлыбова С, Циркин В, Дворянский С, Ежов А, Роман В. Содержание аргинина в сыворотке крови беременных и рожениц при акушерской патологии. Вятский медицинский вестник. 2006;6(1):7.
88. Benson RC, Hardy KA, Morris CR. Arginase and arginine dysregulation in asthma. *Journal of allergy*. 2011;2011.
89. Maarsingh H, Pera T, Meurs H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;378(2):171.
90. Fritz JH. Arginine cools the inflamed gut. *Infection and immunity*. 2013;81(10):3500-2.
91. Lam TL, Wong GK, Chow HY, Chong HC, Chow TL, Kwok SY, et al. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(2):366-76.
92. Glazer ES, Stone EM, Zhu C, Massey KL, Hamir AN, Curley SA. Bioengineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma xenografts. *Translational oncology*. 2011;4(3):138-46.
93. Covini D, Tardito S, Bussolati O, R Chiarelli L, V Pasquetto M, Digilio R, et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2012;7(1):4-13.
94. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies. *Cancer biology & therapy*. 2011;11(7):627-32.
95. Kuo MT, Savaraj N, Feun LG. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget*. 2010;1(4):246.
96. Bobak YP, Vynnytska BO, Kurlishchuk YV, Sibirny AA, Stasyk OV. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation in vitro is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. *Cell biology international*. 2010;34(11):1085-9.

97. Glazer ES, Piccirillo M, Albino V, Di Giacomo R, Palaia R, Mastro AA, et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2220-6.
98. Ott PA, Carvajal RD, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Hoffman EW, Wu B-W, et al. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Investigational new drugs*. 2013;31(2):425-34.
99. Yang TS, Lu SN, Chao Y, Sheen IS, Lin C, Wang TE, et al. A randomised phase II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in Asian advanced hepatocellular carcinoma patients. *British journal of cancer*. 2010;103(7):954.
100. Yau T, Cheng P, Chan P, Chan W, Chen L, Yuen J, et al. A phase 1 dose-escalating study of pegylated recombinant human arginase 1 (Peg-rhArg1) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Investigational new drugs*. 2013;31(1):99-107.
101. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk YV, Bobak YP, Stasyk V. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anti-cancer drugs*. 2011;22(2):148-57.
102. Vynnytska-Myronovska B, Bobak Y, Garbe Y, Dittfeld C, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. *International journal of cancer*. 2012;130(9):2164-75.
103. Vynnytska-Myronovska B, Kurlishchuk Y, Bobak Y, Dittfeld C, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Three-dimensional environment renders cancer cells profoundly less susceptible to a single amino acid starvation. *Amino acids*. 2013;45(5):1221-30.
104. Stasyuk N, Gayda G, Yepremyan H, Stepien A, Gonchar M. Fluorometric enzymatic assay of L-arginine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017;170:184-90.
105. Parniak MA, Lange G, Viswanatha T. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 1983;7(4):267-76.
106. SAKAGUCHI S. A new method for the colorimetric determination of arginine. *The Journal of Biochemistry*. 1950;37(2):231-6.

107. Zhang L, Liu Y, Chen G. Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in *Rhizoma Dioscoreae* by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*. 2004;1043(2):317-21.
108. Narezhnaya E, Askalepova O, Nikashina A, Krukier I, Pogorelova T. Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary zone electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*. 2010;65(12):1280-3.
109. Rong Y, Junru H, Dayi C. Determination of L-arginine in drug by single sweep oscillopotography. *JOURNAL OF SICHUAN CONTINUING EDUCATION COLLEGE OF MEDICAL SCIENCES*. 1999:01.
110. Alonso A, Almendral M, Baez M, Porras M, Alonso C. Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques. *Analytica chimica acta*. 1995;308(1-3):164-9.
111. Stasyuk N, Gaida G, Gonchar M. L-arginine assay with the use of arginase I. *Applied biochemistry and microbiology*. 2013;49(5):529.
112. Stasyuk N, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Errachid A, Gonchar M. Highly selective apo-arginase based method for sensitive enzymatic assay of manganese (II) and cobalt (II) ions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;193:349-56.
113. Stasyuk NY, Gayda G, Fayura L, Boretskiy Y, Gonchar M, Sibirny A. Novel arginine deiminase-based method to assay l-arginine in beverages. *Food chemistry*. 2016;201:320-6.
114. Teerlink T, Nijveldt RJ, De Jong S, Van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 2002;303(2):131-7.
115. Mitić SS, Miletić GŽ, Pavlović AN, Tošić SB, Velimirović DS. Development and Evaluation of a Kinetic-Spectrophotometric Method for Determination of Arginine. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2007;54(1):47-54.
116. Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Böger SM. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass

spectrometry with the isotope dilution technique. *Journal of mass spectrometry*. 2004;39(11):1287-94.

117. Cohen SI. The determination of arginine released in human blood plasma after plasminogen activation. Use of a cation-exchange resin. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1960;86(2):166-8.

118. Gange ME, Francis PS, Costin JW, Barnett NW, Lewis SW. Determination of arginine in dietary supplements. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005;85(7):1217-21.

119. Costin JW, Francis PS, Lewis SW. Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2003;480(1):67-77.

120. Notenboom C, Van de Veerdonk F, Van de Kamer J. A fluorescent modification of the Sakaguchi reaction on arginine. *Histochemie*. 1967;9(2):117-21.

121. Mira de Orduña R. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic end-point analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(2):549-52.

122. Gaede G, Grieshaber M. A rapid and specific enzymatic method for the estimation of L-arginine. *Analytical biochemistry*. 1975;66(2):393-9.

123. Стасюк Н, Гайда Г, Закальський А, Закальська О, Фаюра Л, Вовк О, et al. Реконбінантні форми аргінази та аргініндеїмінази як каталітичні складові ензиматичного набору " Аргітест" для аналізу L-аргініну. *Наука та інновації*. 2017;4(13):8.

124. Rechnitz GA, Kobos R, Riechel S, Gebauer C. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Analytica chimica acta*. 1977;94(2):357-65.

125. Grobler S, Basson N, Van Wyk C. Bacterial electrode for L-arginine. *Talanta*. 1982;29(1):49-51.

126. Stasyuk N, Smutok O, Gayda G, Gonchar M, Koval'chuk Y. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. *Journal of Materials Science and Engineering A*. 2011;1(6A):819.

127. Saiapina O, Dzyadevych S, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin O. Development and optimization of a novel conductometric bi-enzyme biosensor for L-arginine determination. *Talanta*. 2012;92:58-64.
128. Saiapina O, Matsishin M, Pyeshkova V, Soldatkin O, Melnik V, Walcarius A, et al. Application of ammonium-selective zeolite for enhancement of conductometric bi-enzyme biosensor for L-arginine detection. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies–2012–3* (9). 2012(4):49-66.
129. Saiapina OY, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N. Potentiality of application of the conductometric L-arginine biosensors for the real sample analysis. *Biopolymers and cell*. 2012(28, № 6):441-8.
130. Stasyuk NY, Gayda G, Gonchar M. L-Arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cells over-producing human liver arginase I. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;204:515-21.
131. Kacaniklic V, Johansson K, Marko–Varga G, Gorton L, Jönsson–Pettersson G, Csöregi E. Amperometric biosensors for detection of L-and D-amino acids based on coimmobilized peroxidase and L-and D-amino acid oxidases in carbon paste electrodes. *Electroanalysis*. 1994;6(5-6):381-90.
132. Sheliakina M, Arkhypova V, Soldatkin O, Saiapina O, Akata B, Dzyadevych S. Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*. 2014;121:18-23.
133. Stasiuk N, Gaïda G, Koval'chuk I, Stasyk O, Gonchar M. Human arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and characterization of the enzyme. *Ukrains' kyi biokhimichniy zhurnal* (1999). 2010;82(6):14-21.
134. Komaba S, Fujino Y, Matsuda T, Osaka T, Satoh I. Biological determination of Ag (I) ion and arginine by using the composite film of electroinactive polypyrrole and polyion complex. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1998;52(1):78-83.
135. Ivnickii D, Rishpon J. Biosensor based on direct detection of membrane potential induced by immobilized hydrolytic enzymes. *Analytica chimica acta*. 1993;282(3):517-25.
136. Koncki R, Wałecz I, Ruckruh F, Głab S. Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination. *Analytica chimica acta*. 1996;333(3):215-22.

137. Lvova L, Legin A, Vlasov Y, Cha GS, Nam H. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2003;95(1):391-9.
138. Kaur G. Purification and characterization of arginase from *Neurospora* sp for the development of arginine biosensor. 2010.
139. Liu D, Yin A, Ge K, Chen K, Nie L, Yao S. Enzymatic analysis of arginine with the SAW/conductance sensor system. *Enzyme and microbial technology*. 1995;17(9):856-63.
140. Verma N, Singh AK, Kaur P. Biosensor based on ion selective electrode for detection of L-arginine in fruit juices. *Journal of analytical chemistry*. 2015;70(9):1111-5.
141. Buryak A, Severin K. A chemosensor array for the colorimetric identification of 20 natural amino acids. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(11):3700-1.
142. Qin M, Li F, Huang Y, Ran W, Han D, Song Y. Twenty natural amino acids identification by a photochromic sensor chip. *Analytical chemistry*. 2014;87(2):837-42.
143. Martínez-Periñán E, Revenga-Parra M, Zamora F, Pariente F, Lorenzo E. Nanostructured electrochemical detector for the quantification of amino acids related to metabolic diseases. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;236:773-80.
144. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463-93.
145. Wałcerz I, Głąb S, Koncki R. Potentiometric enzyme electrode in a flow injection system for the determination of urea in human serum samples. *Analytica chimica acta*. 1998;369(1):129-37.
146. Udy A, O'Donoghue S, D'Intini V, Healy H, Lipman J. Point of care measurement of plasma creatinine in critically ill patients with acute kidney injury. *Anaesthesia*. 2009;64(4):403-7.
147. Weber J, Van Zanten A. Interferences in current methods for measurements of creatinine. *Clinical chemistry*. 1991;37(5):695-700.

148. Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem harn erzeugt und über eine neue reaction des kreatinins. *Zeitschrift für physiologische Chemie*. 1886;10(5):391-400.
149. Pundir C, Yadav S, Kumar A. Creatinine sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;50:42-52.
150. Du J, Zhu B, Leow WR, Chen S, Sum TC, Peng X, et al. Colorimetric detection of creatinine based on Plasmonic nanoparticles via synergistic coordination chemistry. *Small*. 2015;11(33):4104-10.
151. Meyerhoff M, Rechnitz GA. An activated enzyme electrode for creatinine. *Analytica chimica acta*. 1976;85(2):277-85.
152. Magalhães JM, Machado AA. Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. *Analyst*. 2002;127(8):1069-75.
153. Osaka T, Komaba S, Amano A. Highly sensitive microbiosensor for creatinine based on the combination of inactive polypyrrole with polyion complexes. *Journal of the Electrochemical Society*. 1998;145(2):406-8.
154. Radomska A, Bodenzac E, Głąb S, Koncki R. Creatinine biosensor based on ammonium ion selective electrode and its application in flow-injection analysis. *Talanta*. 2004;64(3):603-8.
155. Radomska A, Koncki R, Pyrżyńska K, Głąb S. Bioanalytical system for control of hemodialysis treatment based on potentiometric biosensors for urea and creatinine. *Analytica Chimica Acta*. 2004;523(2):193-200.
156. Soldatkin AP, Montoriol J, Sant W, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane. *Talanta*. 2002;58(2):351-7.
157. Soldatkin A, Montoriol J, Sant W, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric creatinine-sensitive biosensor based on ISFET and creatinine deiminase immobilised in PVA/SbQ photopolymeric membrane. *Materials Science and Engineering: C*. 2002;21(1):75-9.

158. Zinchenko O, Marchenko S, Sergeyeva T, Kukla A, Pavlyuchenko A, Krasyuk E, et al. Application of creatinine-sensitive biosensor for hemodialysis control. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;35(1):466-9.
159. Lad U, Khokhar S, Kale GM. *Electrochemical creatinine biosensors*. ACS Publications; 2008.
160. Randviir EP, Banks CE. Analytical methods for quantifying creatinine within biological media. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013;183:239-52.
161. Khue NV, Wolff CM, Seris JL, Schwing JP. Immobilized enzyme electrode for creatinine determination in serum. *Analytical chemistry*. 1991;63(6):611-4.
162. Schneider J, Gründig B, Renneberg R, Cammann K, Madaras M, Buck R, et al. Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing. *Analytica chimica acta*. 1996;325(3):161-7.
163. Erlenkötter A, Fobker M, Chemnitz G-C. Biosensors and flow-through system for the determination of creatinine in hemodialysate. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2002;372(2):284-92.
164. Ramanavicius A. Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007;387(5):1899-906.
165. Taniguchi I, Miyamoto S, Tomimura S, Hawkrigde FM. Mediated electron transfer of lactate oxidase and sarcosine oxidase with octacyanotungstate (IV) and octacyanomolybdate (IV). *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 1988;240(1-2):333-9.
166. Chen P, Peng Y, He M, Yan X-C, Zhang Y, Liu Y-N. Sensitive electrochemical detection of creatinine at disposable Screen-Printed carbon electrode mixed with ferrocenemethanol. *Int J Electrochem Sci*. 2013;8(7):8931-9.
167. Lin M-S, Chen C-H, Chen Z. Development of structure-specific electrochemical sensor and its application for polyamines determination. *Electrochimica Acta*. 2011;56(3):1069-75.
168. Chen C-H, Lin MS. A novel structural specific creatinine sensing scheme for the determination of the urine creatinine. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;31(1):90-4.

169. Banks CE, Randviir EP. Detection of creatinine: technologies for point-of-care determination of glomerular filtration. *Bioanalysis*. 2014;6(2):109-11.
170. Taylor A, Vadgama P. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of urea. *Annals of clinical biochemistry*. 1992;29(3):245-64.
171. Della Ciana L, Caputo G. Robust, reliable biosensor for continuous monitoring of urea during dialysis. *Clinical chemistry*. 1996;42(7):1079-85.
172. Lefier D. Analytical methods for the determination of the urea content in milk. *Federation Internationale de Laiterie-International Dairy Federation*. 1996.
173. Butler AR, Walsh D. Colorimetric non-enzymic methods for the determination of urea: Consideration of the chemical principles upon which an analytical method is based is an essential step in the optimization of that method. It can also contribute to the simplification of procedures used and hence cut the costs of many routine analyses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1(5):120-4.
174. Francis PS, Lewis SW, Lim KF. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *TrAC trends in analytical chemistry*. 2002;21(5):389-400.
175. Dallet P, Labat L, Kummer E, Dubost J. Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;742(2):447-52.
176. Yan S-L, Lin P-Z, Hsiao M-W. Separation of urea, uric acid, creatine, and creatinine by micellar electrokinetic capillary chromatography with sodium cholate. *Journal of chromatographic science*. 1999;37(2):45-50.
177. Bradley R, Arnold E, Barbano D, Semerad R, Smith D, Vines B. Chemical and physical methods. *Standard methods for the examination of dairy products*. 1992;16:433-531.
178. Singh M, Verma N, Garg AK, Redhu N. Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008;134(1):345-51.
179. KODAMA S, SUZUKI T. Highly sensitive method for urea detection in wine. *Journal of food science*. 1995;60(5):1097-9.

180. Guilbault G, Shu F. Enzyme electrodes based on the use of a carbon dioxide sensor. Urea and L-tyrosine electrodes. *Analytical chemistry*. 1972;44(13):2161-6.
181. Guilbault G, Tarp M. A specific enzyme electrode for urea. *Analytica chimica acta*. 1974;73(2):355-65.
182. Munoz J, Jimenez C, Bratov A, Bartroli J, Alegret S, Dominguez C. Photosensitive polyurethanes applied to the development of CHEMFET and ENFET devices for biomedical sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997;12(7):577-85.
183. Senillou A, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Cosnier S. A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip. *Talanta*. 1999;50(1):219-26.
184. Soldatkin A, Montoriol J, Sant W, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003;19(2):131-5.
185. Dhawan G, Sumana G, Malhotra B. Recent developments in urea biosensors. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;44(1):42-52.
186. Adeloju SB, Shaw SJ, Wallace GG. Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea. *Analytica Chimica Acta*. 1996;323(1-3):107-13.
187. Adeloju S, Shaw S, Wallace G. Pulsed-amperometric detection of urea in blood samples on a conducting polypyrrole-urease biosensor. *Analytica chimica acta*. 1997;341(2):155-60.
188. Bisht V, Takashima W, Kaneto K. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Biomaterials*. 2005;26(17):3683-90.
189. Cho W-J, Huang H-J. An amperometric urea biosensor based on a polyaniline–perfluorosulfonated ionomer composite electrode. *Analytical Chemistry*. 1998;70(18):3946-51.
190. Strehlitz B, Gründig B, Kopinke H. Sensor for amperometric determination of ammonia and ammonia-forming enzyme reactions. *Analytica chimica acta*. 2000;403(1):11-23.

191. Hamilton A, Breslin CB. The development of a highly sensitive urea sensor due to the formation of an inclusion complex between urea and sulfonated- β -cyclodextrin. *Electrochimica Acta*. 2014;125:250-7.
192. Hamilton A, Breslin CB. The development of a novel urea sensor using polypyrrole. *Electrochimica Acta*. 2014;145:19-26.
193. Ahmad R, Tripathy N, Hahn Y-B. Highly stable urea sensor based on ZnO nanorods directly grown on Ag/glass electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;194:290-5.
194. Dervisevic E, Dervisevic M, Nyangwebah JN, Şenel M. Development of novel amperometric urea biosensor based on Fc-PAMAM and MWCNT bio-nanocomposite film. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;246:920-6.
195. Ansari S, Fouad H, Shin H-S, Ansari Z. Electrochemical enzyme-less urea sensor based on nano-tin oxide synthesized by hydrothermal technique. *Chemico-biological interactions*. 2015;242:45-9.
196. Nguyen NS, Das G, Yoon HH. Nickel/cobalt oxide-decorated 3D graphene nanocomposite electrode for enhanced electrochemical detection of urea. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;77:372-7.
197. Tran TQN, Das G, Yoon HH. Nickel-metal organic framework/MWCNT composite electrode for non-enzymatic urea detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;243:78-83.
198. Nadzhafova O, Etienne M, Walcarius A. Direct electrochemistry of hemoglobin and glucose oxidase in electrodeposited sol-gel silica thin films on glassy carbon. *Electrochemistry Communications*. 2007;9(5):1189-95.
199. Rozhanchuk T, Tananaiko O, Mazurenko I, Etienne M, Walcarius A, Zaitsev V. Electroanalytical properties of haemoglobin in silica-nanocomposite films electrogenerated on pyrolytic graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2009;625(1):33-9.
200. Белоиван ОА, Дуда ТИ, Васильев АА, Гарбуз ВВ, Муратов ВБ, Шкотова ЛВ, et al. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в

- биосенсорной технологии. In: Наумовец АГ, editor. Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине. Киев: Академперіодика; 2014. p. 541-5.
201. Rogaleva N, Korpan Y, Biloivan O. Glucose biosensor based on screen-printed electrodes and glucose oxidase layer modified by MWCNT-NH₂. *Sensor Letters*. 2011;9(6):2356-9.
202. Gibson TD, Higgins IJ, Woodward JR. Stabilization of analytical enzymes using a novel polymer-carbohydrate system and the production of a stabilized, single reagent for alcohol analysis. *Analyst*. 1992;117(8):1293-7.
203. Gerlache M, Senturk Z, Quarin G, Kauffmann JM. Electrochemical behavior of H₂O₂ on gold. *Electroanalysis*. 1997;9(14):1088-92.
204. Mazurenko I, Etienne M, Tananaiko O, Zaitsev V, Walcarius A. Electrophoretically deposited carbon nanotubes as a novel support for electrogenerated silica-dehydrogenase bioelectrodes. *Electrochimica Acta*. 2012;83:359-66.
205. Walcarius A, Sibottier E, Etienne M, Ghanbaja J. Electrochemically assisted self-assembly of mesoporous silica thin films. *Nature materials*. 2007;6(8):602-8.
206. Nadzhafova OY, Zaitsev VN, Drozdova MV, Vaze A, Rusling JF. Heme proteins sequestered in silica sol-gels using surfactants feature direct electron transfer and peroxidase activity. *Electrochemistry communications*. 2004;6(2):205-9.
207. Ohta-Fukuyama M, MIYAKE Y, Emi S, YAMANO T. Identification and properties of the prosthetic group of choline oxidase from *Alcaligenes* sp. *The Journal of Biochemistry*. 1980;88(1):197-203.
208. Situmorang M, Gooding JJ, Hibbert DB. Immobilisation of enzyme throughout a polytyramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors. *Analytica chimica acta*. 1999;394(2):211-23.
209. Gajovic N, Habermüller K, Warsinke A, Schuhmann W, Scheller FW. A pyruvate oxidase electrode based on an electrochemically deposited redox polymer. *Electroanalysis*. 1999;11(18):1377-83.
210. Zhao M, Hibbert DB, Gooding JJ. Solution to the problem of interferences in electrochemical sensors using the fill-and-flow channel biosensor. *Analytical chemistry*. 2003;75(3):593-600.

211. Zhang C, Wang K. An amperometric glucose biosensor incorporating a permeable pre-oxidation layer. *Analytical letters*. 2002;35(5):869-80.
212. Xu J-J, Luo X-L, Du Y, Chen H-Y. Application of MnO₂ nanoparticles as an eliminator of ascorbate interference to amperometric glucose biosensors. *Electrochemistry communications*. 2004;6(11):1169-73.
213. Choi SH, Lee SD, Shin JH, Ha J, Nam H, Cha GS. Amperometric biosensors employing an insoluble oxidant as an interference-removing agent. *Analytica Chimica Acta*. 2002;461(2):251-60.
214. Mazurenko I, Tananaiko O, Biloivan O, Zhybak M, Pelyak I, Zaitsev V, et al. Amperometric Biosensor for Choline Based on Gold Screen-Printed Electrode Modified with Electrochemically-Deposited Silica Biocomposite. *Electroanalysis*. 2015;27(7):1685-92.
215. Engel R. Modified methods for the chemical and biological determination of choline. *Journal of Biological Chemistry*. 1942;144:701-10.
216. Wei Y, Zhou H, Sun Y, He Y, Luo Y. Insight into the catalytic mechanism of arginine deiminase: functional studies on the crucial sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007;66(3):740-50.
217. Karacaoğlu S, Timur S, Telefoncu A. Arginine selective biosensor based on arginase-urease immobilized in gelatin. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*. 2003;31(3):357-63.
218. Zhybak MT, Fayura LY, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA, Dempsey E, et al. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase. *Microchimica Acta*. 2017:1-8.
219. Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001;41(1):79-99.
220. Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1994;312(1):31-7.
221. Vermeulen MA, van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Dejong CH, van den Tol MP, Boelens PG, et al. Specific amino acids in the critically ill patient—exogenous

glutamine/arginine: a common denominator? *Critical care medicine*. 2007;35(9):S568-S76.

222. Davis J, Moorcroft MJ, Wilkins SJ, Compton RG, Cardosi MF. Electrochemical detection of nitrate and nitrite at a copper modified electrode. *Analyst*. 2000;125(4):737-42.

223. Hirai T, Kuwabata S, Yoneyama H. Electrochemical Behaviors of Polypyrrole, Poly-3-methylthiophene, and Polyaniline Deposited on Nafion-Coated Electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*. 1988;135(5):1132-7.

224. Gospodinova N, Terlemezyan L. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. *Progress in Polymer Science*. 1998;23(8):1443-84.

225. Brisard G, Rudnicki J, McLarnon F, Cairns E. Application of probe beam deflection to study the electrooxidation of copper in alkaline media. *Electrochimica acta*. 1995;40(7):859-65.

226. Burke L, Ahern M, Ryan T. An investigation of the anodic behavior of copper and its anodically produced oxides in aqueous solutions of high pH. *Journal of the Electrochemical Society*. 1990;137(2):553-61.

227. Marioli JM, Kuwana T. Electrochemical characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes. *Electrochimica Acta*. 1992;37(7):1187-97.

228. Zadeii JM, Marioli J, Kuwana T. Electrochemical detector for liquid chromatographic determination of carbohydrates. *Analytical chemistry*. 1991;63(6):649-53.

229. Casella I, Gatta M. Anodic electrodeposition of copper oxide/hydroxide films by alkaline solutions containing cuprous cyanide ions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2000;494(1):12-20.

230. El Haleem SA, Ateya BG. Cyclic voltammetry of copper in sodium hydroxide solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1981;117(2):309-19.

231. PauláScullion S. Direct reductive amperometric determination of nitrate at a copper electrode formed in situ in a capillary-fill sensor device. *Analyst*. 1991;116(6):573-9.

232. Vazquez-Arenas J, Lazaro I, Cruz R. Electrochemical study of binary and ternary copper complexes in ammonia-chloride medium. *Electrochimica acta*. 2007;52(20):6106-17.
233. Algharaibeh Z, Pickup PG. Charge trapping in poly(1-amino-anthraquinone) films. *Electrochimica Acta*. 2013;93:87-92.
234. Giannopoulou I, Pantias D, Paspaliaris I. Electrochemical modeling and study of copper deposition from concentrated ammoniacal sulfate solutions. *Hydrometallurgy*. 2009;99(1):58-66.
235. Nicholls D. *Complexes and first-row transition elements*: Palgrave Macmillan; 1973.
236. Annamalai SK, Palani B, Pillai KC. Highly stable and redox active nano copper species stabilized functionalized-multiwalled carbon nanotube/chitosan modified electrode for efficient hydrogen peroxide detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012;395:207-16.
237. Shih YT, Huang HJ. A creatinine deiminase modified polyaniline electrode for creatinine analysis. *Analytica Chimica Acta*. 1999;392(2-3):143-50.
238. Hamlaoui M, Kherrat R, Marrakchi M, Jaffrezic-Renault N, Walcarius A. Development of an ammonium ISFET sensor with a polymeric membrane including zeolite. *Materials Science and Engineering: C*. 2002;21(1):25-8.
239. Hamlaoui M, Reybier K, Marrakchi M, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Kherrat R, et al. Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite. *Analytica Chimica Acta*. 2002;466(1):39-45.
240. Heng LY, Alva S, Ahmad M. Ammonium ion sensor based on photocured and self-plasticising acrylic films for the analysis of sewage. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2004;98(2):160-5.
241. Bertocchi P, Compagnone D, Palleschi G. Amperometric ammonium ion and urea determination with enzyme-based probes. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996;11(1):1-10.

242. Abass A, Hart J, Cowell D, Chappell A. Development of an amperometric assay for NH_4^+ based on a chemically modified screen-printed NADH sensor. *Analytica chimica acta*. 1998;373(1):1-8.
243. Ribeiro JA, Silva F, Pereira CM. Electrochemical sensing of ammonium ion at the water/1, 6-dichlorohexane interface. *Talanta*. 2012;88:54-60.
244. Zhybak MT, Vagin MY, Beni V, Liu X, Dempsey E, Turner AP, et al. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode. *Microchimica Acta*. 2016;183(6):1981-7.
245. Zhylyak G, Dzyadevich S, Korpan Y, Soldatkin A, El'Skaya A. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1995;24(1-3):145-8.
246. O'Mahony AM, Scanlon MD, Berduque A, Beni V, Arrigan DW, Faggi E, et al. Voltammetry of chromium (VI) at the liquid| liquid interface. *Electrochemistry communications*. 2005;7(10):976-82.
247. Khan G, Wernet W. A highly sensitive amperometric creatinine sensor. *Analytica chimica acta*. 1997;351(1-3):151-8.
248. Osborne MD, Girault HH. The micro water/1, 2-dichloroethane interface as a transducer for creatinine assay. *Microchimica Acta*. 1995;117(3):175-85.
249. Tombach B, Schneider J, Matzkies F, Schaefer RM, Chemnitz GC. Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. *Clinica chimica acta*. 2001;312(1):129-34.
250. Hsiue GH, Lu PL, Chen JC. Multienzyme-immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor. *Journal of applied polymer science*. 2004;92(5):3126-34.
251. Zhybak M, Beni V, Vagin M, Dempsey E, Turner A, Korpan Y. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;77:505-11.
252. Pizzariello A, Stredanský M, Stredanská S, Miertuš S. Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. *Talanta*. 2001;54(4):763-72.

253. Vostiar I, Tkac J, Sturdik E, Gemeiner P. Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe. *Bioelectrochemistry*. 2002;56(1):113-5.
254. Kuralay F, Özyörük H, Yıldız A. Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006;114(1):500-6.
255. Tyagi M, Tomar M, Gupta V. NiO nanoparticle-based urea biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. 2013;41:110-5.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Белоиван О.А., Дуда Т.И., Васильев А.А, Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Шкотова Л.В., **Жибак М.Т.**, Бойчук Ю.В., Бардаков Б.В., Корпан Я.И. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в биосенсорной технологии // Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине / Редкол.: А.Г. Наумовец (глав. ред.); НАН Украины. – К.: Академперіодика, 2014. – 768 с., – ISBN 978-966-360-260-8. – С. 541-545.
2. Mazurenko E., Tananaiko O., Biloivan O., **Zhybak M.**, Pelyak I., Zaitsev V., Etienne M., Walcarius A. Amperometric biosensor for choline based on gold screen-printed electrode modified with electrochemically-deposited silica biocomposite // *Electroanalysis*. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 1685-1692.
3. **Zhybak M.T.**, Vagin M.Y., Beni V., Liu X., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode // *Microchimica Acta*. – 2016. – Vol. 183, № 6. – P. 1981-1987.
4. **Zhybak M.T.**, Beni V., Vagin M.Y., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 505-511.
5. **Zhybak M.T.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184, № 8. – P. 2679–2686.
6. Biloivan O., **Zhybak M.**, Boychuk Y., Vasil'ev O., Duda T., Muratov V., Korpan Y. Carbon nanomaterial based three-dimensional enzyme membranes for

amperometric sensors // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 12.

7. **Zhybak M.**, Dempsey E., Tutner A.P.F., Korpan Y. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copper-plate/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors". – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 23.

8. **Zhybak M.**, Dempsey E., Korpan Y.I. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copperplated/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 29, Special issue. – 2013. – P. 28.

9. **Zhybak M.**, Beni V., Turner A., Korpan Y. Ammonium ion selective copper/polyaniline-based nanocomposite for creatinine and urea biosensing // Materials of VIII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 30, Special issue. – 2014. – P. 23.

10. **Zhybak M.**, Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M., Sibirny A., Dempsey E., Korpan Y. Novel L-arginine-selective amperometric sensor based on recombinant arginine deiminase and platinum screen-printed electrodes // Book of Abstracts "MADICA 2014". – Mahdia, Tunisia, 5-7 November, 2014. – P. B23.