САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

на правах рукописи

Николаев Константин Геннадьевич

ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА И МИНИАТЮРИЗАЦИЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор С.С. Ермаков

Санкт-Петербург

2016

Введение 5
1. Обзор литературы 10
1.1. Электрохимические биосенсоры 10
1.2. Ферментные электрохимические сенсоры 12
1.2.1. Развитие электрохимических биосенсоров 12
1.3. Виды рабочих электродов используемых в вольтамперометрических сенсорах для определения глюкозы 20
1.3.1. Биосенсоры на глюкозу на основе глюкозоксидазы и наночастиц золота 29
1.3.2. Химические методы синтеза наноструктур золота с использованием олеиламина для электрохимических биосенсоров 32
1.3.3. Методы иммобилизации наноструктур золота и глюкозоксидазы на поверхности электрода 34
1.4. Бесферментные электрохимические сенсоры 34
1.4.1. Применение наноструктур в электрохимических сенсорах 35
1.5. Бесферментные сенсоры для определения пероксида водорода 36
1.6. Новые подходы для миниатюризации бесферментных ЭХ сенсоров 39
1.6.1. Направленный электрохимический синтез наноструктур 40
1.6.2. Миниатюризированные системы для определения пероксида водорода в среде клеточных культур 44
2. Методическая часть 46
2.1. Оборудование и реактивы 46
2.1.1. Приготовление растворов 47
2.1.2. Оборудование 49
2.2. Методы синтеза наноструктур и модификации электродов 51
2.2.1. Синтез наноструктур золота олеиламиновым методом 51
2.2.2. Изготовление электродов для DENA синтеза наноструктурированных ультрамикроэлектродов 61
2.2.3. Синтез наноструктурированных УМЭ методом направленного электрохимического осаждения 64
2.3. Иммобилизация глюкозоксидазы на поверхности электрода 69

2.4. Изоляция металлических контактов 71

2.5. Способы задания концентраций и техника электрохимических измерений 73

2.5.2. Электрохимические ячейки для электрохимических измерений на электродах синтезированных DENA-методом 75

3. Результаты эксперимента и их обсуждение 77

3.1. Определение эффективной площади поверхности наноструктур, полученных олеиламиновым методом 77

3.1.1. Исследование изменения эффективной площади поверхности электродов модифицированных наночастицами золота 77

3.1.2. Изучение поверхности модифицированных электродов методом спектроскопии электрохимического импеданса 82

3.2. Исследование состава и структуры наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au 87

3.2.1. Рентгеноспектральные исследования наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au 87

3.2.2. Исследование проводимости наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au 96

4. Исследование аналитических характеристик наноструктурированных электродов 99

4.1. Аналитические характеристики вольтамперометического сенсора с иммобилизованной глюкозоксидазой на примере определения глюкозы 99

4.1.1. Расчет каталитической активности глюкозоксидазы из данных полученных при определении глюкозы 108

4.2. Исследование аналитических характеристик электродов на основе наноструктурированных УМЭ Au, Pd сплава Pd-Au на примере пероксида водорода 109

4.2.1. Аналитические характеристики амперометрического сенсора на основе наноструктурированных УМЭ на примере бесферментного определения пероксида водорода 110

4.2.2. Определение внеклеточной концентрации пероксида водорода при гипоксии клеток HL-1 117

Выводы 119

Список литературы 120

Перечень условных сокращений и обозначений

АМ - амперометрия

ИКН - ионно-коллоидное наслаивание

ИМП - импеданс

ИН - ионное наслаивание

КН - коллоидное наслаивание

ЛИ - линейный интервал

МУН - многостенные углеродные нанотрубки

МОУН – смесь многостенных и одностенных углеродных нанострубок

НЧ - наночастицы

ОУН - одностенные углеродные нанотрубки

ПА - полианилин

ПАБС - полиакрилонитрил бутадиен стирол

ПАДА - полиадамантилакриламид

ПАМАМ - дендример 4- полиамидоамин

ПАС - поли - (р- ацетоксистирол)

ПАУ - полициклические ароматические углеводороды

ПБВ - полибутиленвиологен

ПВ - поливиниловый спирт

ПВ - поливинил

ПВС - поливинилсульфоновая кислота

ПГЭ - пиролизированный графитовый электрод

ПДДА - хлорид полидиаллилдиметиламмония

ПЕДОТ - poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

ПО - предел обнаружения

ПОМ - полиоксометаллаты

ПП - полипиролл

ПРО - преобразователь сигнала - трансдьюсер

ПС - полистирол

ПСС - полистиролсульфонат

ПХС - послойная химическая сборка

ПЭИ - полиэтиленимин

СДГ - слоистый двойной гидроксид

СО-ПП – сверхокисленный полипиролл

СПАН – сульфонированный полианилин

СТБ - стабильность

СУЭ - стеклоуглеродный электрод

СЭИ - спектроскопия электрохимического импеданса

ТМАК - N-триметоксисилипропил-t-N,N,N-триметиламмония хлорид

ТО - время отклика

ЦВА - циклическая вольтамперометрия

ЧС - чувствительный слой

ЭБС - электрохимический биосенсор

ЭС - электрохимический сенсор

ЭЭС – электрод электрохимического сенсора

УМЭ – ультрамикроэлектрод

Cyt c - Цитохром Ц

EDX – энергодисперсионная рентгеновская микроскопия

GOX - глюкозоксидаза

GSGHs – нанослои мезопористого графена и кремния

HEPES- 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HRP - пероксидаза хрена

ITO - In-Sn оксид

S – чувствительность

SEM – сканирующая электронная микроскопия

TDA-SiCl – тетрадецилдиметил[3-(триметоксисилил)пропил] аммония хлорид

ТМАН – тетраметиламмония гидроксид

V_{pp} – величина размаха переменного напряжения, В

Введение

Современная медицинская диагностика требует постоянного контроля показателей глюкозы в крови человека. В настоящее время для этих целей используют коммерческие ферментные электрохимические сенсоры на основе глюкозоксидазы. Сенсор как устройство электрохимического детектирования может осуществлять инвазивный биохимический анализ in vivo. Кроме того, электрохимические сенсоры позволяют пользователю проводить экспрессный анализ в домашних условиях. Не смотря на это, они обладают такими недостатками как: низкая точность определения (с относительной погрешностью до 30%) и короткий срок службы (до 2 месяцев). Низкая точность определения глюкозы объясняется мешающим влиянием биологически активных веществ. В связи с тем, что в коммерческих сенсорах в качестве электродов используют тонкопленочные золотые электроды, активность иммобилизованной на них глюкозоксидазы очень быстро уменьшается во времени. Этим можно объяснить низкий срок годности таких сенсоров. Низкая воспроизводимость поверхности тонкопленочных электродов, которые производят методом вакуумного напыления, требует отдельной градуировки для каждой партии сенсоров. Всё вышеперечисленное также влияет на точность определения концентрации глюкозы в крови.

Использование электродов модифицированных наноструктурами золота позволяет решить эти проблемы. Такие электроды имеют большую площадь поверхности за счет трехмерной структуры наночастиц и нанопроволок золота. Благодаря этому достигается воспроизводимость поверхности модифицированного электрода. Как известно, наноразмерные частицы золота предотвращают денатурацию глюкозоксидазы и поддерживают постоянную конформацию этой молекулы, что приводит к увеличению стабильности биосенсора во времени. Кроме того, за счет увеличения поверхности, электроды, модифицированные наноструктурами золота, обеспечивают высокую точность и чувствительность электрохимического сенсора для определения глюкозы. Таким образом, разработка сенсоров на основе

электродов модифицированных наноструктурами золота, используемых для определения глюкозы является перспективным направлением.

Существует множество способов синтеза наноструктур золота. Наименьший диаметр наночастиц и нанопроволок обеспечивают методы химического синтеза со стерической стабилизацией наноструктур поверхностно активными веществами (ПАВ). При этом существует проблема использования таких наноструктур для модификации электродов, связанная с гидрофобностью стабилизирующих ПАВ. Гидрофобные ПАВ на поверхности наноструктур золота блокируют перенос заряда и уменьшают рабочую площадь поверхности модифицированного электрода.

Для контроля биологически активных веществ (БАВ) на внеклеточном уровне требуется миниатюризация и биосовместимость электрохимических сенсоров. Одними из наиболее важных БАВ являются активные формы кислорода (АФК). АФК - это побочные продукты аэробного метаболизма в биологических системах. К АФК относят синглетный кислород, гидроксил радикал и пероксид водорода. Пероксид водорода образуется из анионов супероксида, которые являются продуктами восстановления кислорода во время аэробного дыхания. Пероксид водорода - наиболее стабильная активная форма кислорода, поэтому он является наиболее подходящим аналитом для электрохимических сенсоров. Однако прямое электрохимическое определение пероксида водорода проводят при достаточно высоких потенциалах, что в биологических средах может привести к окислению или восстановлению других электроактивных веществ, присутствующих в этих средах. В этом случае снижение потенциала детектирования пероксида водорода достигается за счет использования наноструктур благородных металлов в конструкции электрохимических сенсоров. Поэтому, модификация миниатюрных электродов наноструктурами благородных металлов или получение наноструктурированных ультрамикроразмерных электродов позволят создавать электрохимические сенсоры для определения пероксида водорода в биологических средах.

Цель работы: Разработка новых вольтамперометрических сенсоров на основе наноструктур золота для определения глюкозы и наноструктурированных ультрамикроэлектродов (УМЭ) палладия, золота и их сплава для определения пероксида водорода.

Для достижения поставленной **цели** необходимо было решить следующие **задачи:**

- разработать метод активации наночастиц золота, синтезированных олеиламиновым методом;
- модифицировать электрод наночастицами золота и активировать полученную наноструктурированную поверхность реагентом Меервейна;
- на основе полученного модифицированного электрода разработать прототип вольтамперометрического биосенсора на глюкозу и изучить его аналитические характеристики;
- выбрать оптимальные условия для метода направленного электрохимического синтеза наноструктур Pd, Au и их сплава, создать миниатюризированный бесферментный вольтамперометрический сенсор на их основе;
- изучить аналитические характеристики полученных бесферментных вольтамперометрических сенсоров на примере определения пероксида водорода;
- разработать миниатюризированный вольтамперометрический сенсор на основе наноструктур Pd, Au и их сплава, для определения уровня гипоксии клеток.

Научная новизна

- впервые для удаления молекул гидрофобных реагентов с поверхности наноструктур Au применен метод обработки реагентом Меервейна (тетрафторборат триэтилоксония), что привело к улучшению аналитических характеристик вольтамперометрических сенсоров на основе таких наноструктур;
- впервые получены и охарактеризованы УМЭ на основе Au, Pd и сплава Pd-Au для создания вольтамперометрических сенсоров для определения пероксида водорода. Бесферментный сенсор имеет высокую чувствительность (4,176

мА·мМ$^{-1}$см$^{-2}$), низкий предел обнаружения (2,4·10^{-7} М) и широкий диапазон линейной зависимости концентрации пероксида водорода (от 1,0·10^{-6} до 1,0·10^{-3} М)

Практическая значимость работы:

- разработан вольтамперометрический сенсор на основе наночастиц золота с поверхностью, предотвращающей денатурацию глюкозоксидазы, что привело к увеличению времени стабильной работы биосенсора до 60 дней, чувствительности (до 15,0 мкА·мМ$^{-1}$см$^{-2}$) , а также снижению предела обнаружения глюкозы до 0,02 мМ;
- на основе наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au разработан миниатюрный амперометрический сенсор для бесферментного определения пероксида водорода в объеме 100 мкл при низком потенциале детектирования (минус 0,05 В).

Положения, выносимые на защиту

- способ обработки наноструктур Au для удаления олеиламина с применением реагента Меервейна
- аналитические характеристики вольтамперометрического сенсора для определения глюкозы на основе наночастиц золота активированных реагентом Меервейна
- аналитические характеристики наноструктурированных УМЭ, синтезированных методом направленного электрохимического осаждения, на примере определения пероксида водорода

Апробация работы

Отдельные разделы диссертации докладывались на VIII Всероссийской конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием "Менделеев-2014" (Санкт-Петербург, 2014), Международной конференции «1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and nanostructures» (Санкт-Петрбург,2014), Международной конференции «Nanoelectronic Days» (Juelich, Германия, 2015), II Съезд Аналитиков России (Москва), IX всероссийской конференции по

электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА 2016».

Публикации

Опубликовано 11 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, из них по теме диссертации – 3 рекомендованных ВАК, 5 тезисов докладов на научных конференциях. Работы частично выполнялись в рамках гранта СПбГУ-DAAD №12.42.1438.2015.

1. Обзор литературы

1.1. Электрохимические биосенсоры

Электрохимическим биосенсором называют биосенсор с электрохимическим трансдьюсером (физическим преобразователем). Электрохимический биосенсор состоит из полупроводников или проводников первого или второго рода, которые содержат биохимический или биологический материал в качестве реагентсодержащей фазы. Электрохимические сенсоры, как известно, занимают в химической сенсорике особое место и в настоящее время нашли широкое применение в различных областях анализа , начиная от анализа воздуха рабочей зоны [1, 2], определения токсичных веществ и патогенов (в окружающей среде и продуктах питания) и заканчивая in situ анализом физиологических жидкостей, который важен в медицинской диагностике [3-9]. Принцип работы амперометрического сенсора основан на измерении тока, возникающего в результате электрохимического окисления или восстановления электроактивных веществ. Это обычно реализуется поддержанием постоянного потенциала на множестве электродов относительно электрода сравнения, который может также служить вспомогательным электродом (противоэлектродом), если токи низки (от 10^{-9} до 10^{-6} А). Получающийся ток соответствует общей концентрации электроактивного вещества или продукту реакции этого же вещества, или скорости потребления электроактивного вещества в пределах смежного биокаталитического слоя. Биокаталитические реакции выбираются так, чтобы они характеризовались первым порядком скорости, такие стационарные токи обычно пропорциональны объемной концентрации аналита. Современный электрохимический сенсор (ЭС) [10, 11] можно представить следующим образом: устройство, (рисунок 1), содержащее мембрану (иногда газовый зазор) селективную по физическим характеристикам - агрегатному состоянию, размеру частиц и т.п.; далее чувствительный слой (ЧС), в котором происходят химические или биологические реакции, обеспечивающие селективность определения; последняя часть – трансдьюсер, другими словами

преобразователь (ПРО). ПРО - устройство, преобразующее отклик распознающего элемента (физической или химической природы) в измеряемый сигнал (как правило, электрический), величина которого пропорциональна концентрации определяемого вещества или веществ. Довольно часто сложно провести четкую границу между ЧС и ПРО, так как в ряде конструкций ЭС функцию ЧС выполняет ПРО, что наблюдается в работах последних лет по бесферментным сенсорам [12]. ЭС можно представить в виде миниатюрного аналитического устройства, в котором мембрана осуществляет стадию пробоотбора, ЧС – осуществление сигналобразующего процесса, а ПРО играет роль инструмента получения аналитического сигнала или метода конечного определения.

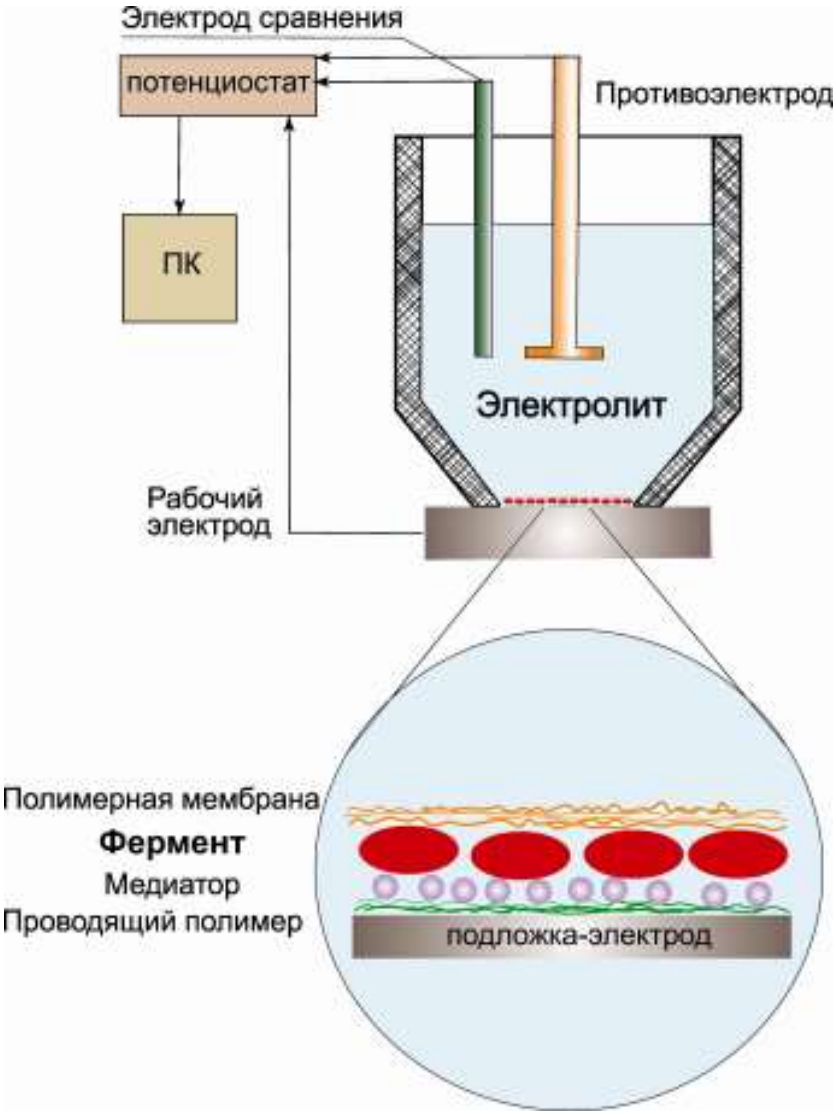


Рисунок 1. Схема устройства электрохимической ячейки.

В качестве инструментальных методов в ЭС используются потенциометрия, амперометрия, вольтамперометрия, спектроскопия электрохимического импеданса, кулонометрия и кондуктометрия. Наиболее распространенными являются амперометрические сенсоры, в частности для определения глюкозы.

1.2. Ферментные электрохимические сенсоры

Ферментные электрохимические сенсоры применяются для определения большого количества аналитов. Одним из наиболее распространенных и изученных биосенсоров является сенсор для определения глюкозы. В его конструкции в качестве фермента используют глюкозоксидазу, что обеспечивает высокую селективность по отношению к другим электроактивным частицам в биологических жидкостях.

Сахарный диабет стал прогрессирующим заболеванием за последние годы, что и определило широкое применение на практике сенсоров на глюкозу. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, около 350 миллионов человек во всем мире больны диабетом, и, по текущим прогнозам, диабет будет седьмой ведущей причиной смерти в 2030 году [13]. Точное измерение и тщательный контроль уровня глюкозы в крови имеют важное значение для правильной диагностики и лечения сахарного диабета. Типичный анализ крови в глюкометрах проводится с помощью небольшого образца крови, который обычно получают посредством укола пальца. Кровь затем подводится к одноразовой тест-полоске под действием капиллярных сил. Большинство из этих тестов основано на ферментативном методе, в котором полоски состоят или из дегидрогеназы глюкозы (GDH) или глюкозоксидазы (GOX), иммобилизованных на печатном электроде.

1.2.1. Развитие электрохимических биосенсоров

Обычно выделяют три поколения биосенсоров [4]. Первое поколение базировалось на определении кислорода, образующегося или потребляемого в результате ферментативной реакции. Второе поколение содержит медиаторы

электронного переноса, позволяющие снизить энергию активации переноса электрона от фермента к электроду. Третье поколение основано на прямом переносе электрона с электрода на активный центр фермента или наоборот.

Один из первых электрохимических биосенсоров был предназначен для определения глюкозы. Устройство сенсора было предложено в 1962 году Кларком и Лионом [14]. Этот сенсор состоял из электрода Кларка, на газопроницаемую мембрану которого нанесен тонкий слой глюкозоксидазы. Концентрация глюкозы определялась по изменению потребляемого кислорода в результате ферментативной реакции глюкозы с кислородом, продуктами которой являются глюконовая кислота и пероксид водорода.

Технология Кларка была передана компании Yellow Spring Instrument Company (YSI), которая в 1975 году начала выпуск приборов для определения глюкозы в 25 мкл крови. Апдайк и Хикс [15] развили дальнейшие принципы с использованием двух кислородных рабочих электродов (на один из которых был нанесен фермент) и измерением дифференциального тока для корректировки фона кислорода в различных образцах. В 1973 году Гильбо и Лабрано [16] описали ферментный электрод для определения глюкозы в крови амперометрическим методом по количеству окисленного пероксида водорода:

$$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

Хорошая точность и воспроизводимость были получены при объеме анализируемой крови в 100 мкл. Широкий диапазон концентраций, измеряемый с помощью амперометрических сенсоров, зависит от геометрии электрода, состава мембраны или способа иммобилизации фермента. В течение 1980-х годов происходило развитие биосенсоров в области биотехнологий. Значительные усилия, на протяжении всего этого времени, были сфокусированы на биосенсорах, основанных на медиаторах переноса электрона (биосенсоры второго поколения). Тогда же начался выпуск тест-полосок для самостоятельного контроля уровня глюкозы в крови и использование

модифицированных электродов для усиления сигнала электрохимического датчика. В 1990-х годах возрос интерес к возможности переноса электрона непосредственно с редокс-центра глюкозоксидазы на поверхность электрода.

Таким образом, биосенсоры первого поколения были основаны на определении глюкозы по реакции с кислородом, катализируемой природным субстратом, и на определении выделившейся перекиси водорода. Такой простой принцип в основном использовался при миниатюризации сенсоров. В общей конфигурации исследований YSI глюкозоксидаза находилась между проницаемой изнутри мембраной из ацетата целлюлозы и внешней мембраной из биологически совместимого поликарбоната, которая ограничивала диффузию.

Амперометрическое измерение концентрации пероксида водорода проводится при потенциале плюс 0,2 В (относительно хлорсеребряного электрода сравнения). При этом потенциале уменьшается влияние таких электроактивных веществ, как аскорбиновая кислота, мочевая кислота и ацетаминофен (и др. наркотические вещества). Анодные токи этих и других компонентов биологических жидкостей, способных окисляться, могут уменьшить селективность и, следовательно, внести ошибку в величину сигнала сенсора. Один из способов устранения низкой селективности - применение полупроницаемого слоя, что уменьшает доступ мешающих веществ к поверхности преобразователя. Различные полимеры (мультислои и смешанные слои) с такими качествами, как размер, заряд или поляризация, использовались для повышения селективности. Полупроницаемые слои исключали поверхностно активные макромолекулы, тем самым увеличивая стабильность работы сенсора. Пленки, синтезированные электрополимеризацией, особенно полифенилендиамина и сверхокисленного полипиррола, используются для обеспечения высокой селективности по размеру молекул. Другие широко используемые покрытия, основанные на селективности по размеру, – это ацетат целлюлозы или отрицательно заряженный (сульфонированный) полиэлектролит Nafion, Kodak AQ или гидрофобный алкантиол, липидные

слои. Использование мультислоев, обладающих различными свойствами, дает некоторые преимущества. Например, смешение Nafion и ацетата целлюлозы было использовано для устранения влияния нейтрального ацетаминофена и отрицательно заряженных аскорбиновой и мочевой кислот. На протяжении 1990-х годов исследования в этой области были сосредоточены на электрокаталитическом определении пероксида водорода. Это позволило определить оптимальную область потенциалов (от 0 до минус 0,2 В по хлорсеребряному электроду), в которой мешающие реакции оказывают наименьшее влияние. Электроды, состоящие из металлизированного углерода гексацианоферратом рутения и гексацианоферратом родия, повышали селективность к глюкозе [17]. Таким образом, была получена высокая селективность и быстрый отклик сенсора для определения глюкозы.

Работа сенсоров, содержащих оксидазы, основана на потреблении кислорода, это может снижать сигнал сенсора, что связанно с парциальным давлением кислорода и его количественным недостатком для стехиометрической реакции. Эти отклонения оказывают влияние на время отклика сенсора и снижают верхнюю границу диапазона линейности. Такое ограничение (“дефицит кислорода”) говорит о том, что концентрация кислорода ниже, чем концентрация глюкозы. Было предложено несколько способов для решения этой проблемы. Первый способ основан на ограничении массопереноса пленкой полимера (полиуретана или поликарбоната) для создания общего потока кислорода и глюкозы, что приведет к росту отношения кислород/глюкоза и росту скорости диффузии через мембрану. Второй способ предусматривает использование двухмерного цилиндрического электрода, разработанного группой Гроуа [18, 19]. Такой электрод обеспечивает диффузию кислорода в обоих направлениях, а перемещение глюкозы только в направлении реакционной области. Также для решения проблемы обескислораживания биосенсоров был предложен вариант обогащенного кислородом угольно-пастового электрода, модифицированного ферментом. Такие биосенсоры основаны на фтороуглероде (Kel-F oil), клеящей жидкости, в

которой достигается высокая растворимость кислорода, поэтому она может действовать как внутренний источник кислорода. Таким образом, даже в бескислородной среде может поддерживаться ферментативная реакция. Для того, чтобы обойти такие жесткие требования к наличию кислорода, можно использовать не глюкозоксидазу, а дегидрогеназу глюкозы [17].

Дальнейшие усовершенствования конструкций сенсоров привели к замене кислорода на нефизиологический (синтетический) переносчик электронов от редокс-центра фермента к поверхности электрода. Перенос электронов от глюкозоксидазы непосредственно к электроду затруднен, потому что толстый слой белка окружает ее редокс-центр с образованием флавина (общее название группы органических соединений, образующихся на основе трициклической гетероциклической молекулы изоаллоксазина) и тем самым блокирует активный центр фермента. Этот слой белка вводит стерическое разделение электронной пары донор-акцептор, что является препятствием для прямой передачи электрона в соответствии с зависимостью скорости передачи электрона от расстояния:

$$K_{et} = 10^{13} e^{-0.91(d-3)} e^{[-(\Delta G + \lambda)/4RT\lambda]}$$

Где ΔG и λ, соответственно, свободная энергия и энергия реорганизации растворителя, сопровождающие процесс переноса электрона, d - фактическое расстояние, на которое переносится электрон (нм). Уменьшение расстояния, на которое переносится электрон (т.е. расстояния между иммобилизованным слоем глюкозоксидазы и поверхностью электрода), достаточно важно для оптимальной работы [17].

Синтетические медиаторы являются посредниками между FAD (флавинадениндинуклеотид) центром и поверхностью электрода. Процесс протекает по следующей схеме:

$$\text{глюкоза} + GOX_{Ox} \longrightarrow GOX_{Red} + \text{глюконолактон}$$
$$GOX_{Red} + 2M_{Ox} \longrightarrow GOX_{Ox} + 2M_{Red} + 2H^{+}$$
$$2M_{Red} \longrightarrow 2M_{Ox} + 2e^{-}$$

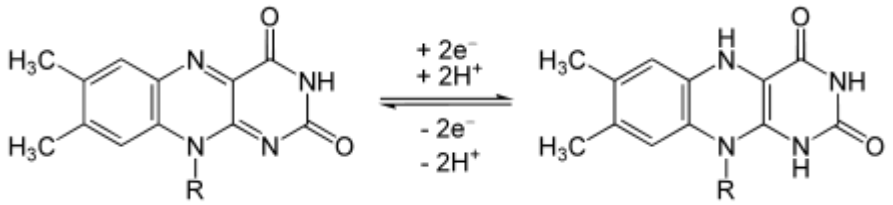
Где: M – медиатор переноса электронов;

GOX – глюкозоксидаза;

Red – восстановленная форма;

Ox – окисленная форма.

Окисленная и восстановленная формы FAD имеют следующую структуру:



Для переноса заряда от глюкозоксидазы к поверхности электрода обычно используют следующие диффузионные медиаторы электронов: производные ферроценов, феррицианиды, электропроводящие органические соли (тетратиафульвален-тетрацианхинодиметана, TTF-TCNQ), соединения фенотиазина и феноксазина [17], а также производные хинона. Результатом использования этих медиаторов являются более независимые от парциального давления кислорода измерения, а также возможность проводить их при более низких потенциалах, так как исключается возможность побочных реакций со стороны различных электроактивных соединений. Для того чтобы функционировать эффективно, медиатору нужно взаимодействовать быстро с восстановленной формой фермента (чтобы уменьшить его взаимодействие с кислородом), обладать хорошими электрохимическими свойствами (такими как низкий редокс потенциал), иметь низкую растворимость в водной среде, быть не токсичным и химически стабильным (как в восстановленной, так и в

оксленной форме). Коммерческие сенсоры для определения уровня глюкозы обычно используют феррицианидные или ферроценовые медиаторы для анализа in situ. Но большинство сенсоров in vivo не используют медиаторов, из-за их токсичности.

Несмотря на значительное увеличение чувствительности, полученное при использовании медиатора электронов, у биосенсоров второго поколения существует такой недостаток как токсичность, вызванная использованием медиаторов на основе солей переходных металлов. Группа Геллера [20] разработала недиффузионный способ установления взаимодействия между глюкоксидазой и поверхностью электрода, основанный на подведении фермента к поверхности с 4-поливинилпиридином посредством плотной упаковки осмиевого комплекса, который и будет служить переносчиком электронов. Получившийся трехмерный редокс полимер-фермент обеспечивает более высокий выходной ток и фиксацию медиатора на поверхности электрода. Вильнер и его коллеги [21] создали новый подход для модификации глюкозоксидазы. Для этого в фермент был внедрен ферроцен в качестве переносчика электронов вместо FAD.

За последние годы было предпринято множество попыток создать сенсор, модифицированный наноструктурами металлов и их производных [22]. Предполагается, что наноструктуры металлов и углеродные нанотрубки [23] могут служить катализаторами реакции, как при прямом переносе электронов, так и с использованием медиатора, что приводит к улучшению аналитических характеристик биосенсора. В качестве подложек используются любые проводящие материалы, на которых возможна модификация наноструктур за счет специфических взаимодействий.

Биосенсоры для определения глюкозы, основанные на прямом переносе электрона от фермента к поверхности электрода, относят к биосенсорам третьего поколения. Процесс прямого переноса электрона с активного центра глюкозоксидазы на электрод протекает замедленно. В большинстве случаев

окислительный потенциал глюкозоксидазы примерно равен минус 400мВ в 0,1М фосфатном буферном растворе с pH 5 [24].

Эффективность работы таких сенсоров во многом определяется электрохимическими процессами на поверхности электродов, в качестве которых в зависимости от конструкции сенсора, способа получения аналитического сигнала и задачи метода модификации используются углеродные материалы, благородные металлы, проводящие оксиды и т.д. В последнее время для создания наиболее эффективных электродов стали использовать наноразмерные материалы [6, 25], которые имеют множество особенностей, важных для работы сенсора, в частности, такие материалы позволяют существенно увеличить аналитический сигнал за счет электрокатализа.

Наиболее перспективными электрокатализаторами в настоящее время являются материалы на основе наночастиц [25-28]. Применение наночастиц в электрохимических сенсорах - наиболее быстро развивающаяся область электроаналитической химии, о чем говорит значительное число обзоров, посвященных этой теме [29-36]. Многообразие свойств электродов таких сенсоров достигается благодаря большому количеству способов синтеза наночастиц на поверхности электродов. Как установлено в этих работах за счет электрокатализа удается существенно увеличить аналитический сигнал сенсора и, соответственно, повысить чувствительность определения аналита. Наночастицы металлов осуществляют три важных функции в электроанализе, а именно, они существенно увеличивают величину проводящей поверхности, проявляют каталитические свойства, обусловленные их малыми размерами и осуществляют контакт непосредственно с редокс центрами ферментов [36, 37]. Следует отметить, что электрокаталитический эффект, выражающийся в увеличении константы скорости переноса электрона, может достигать шести порядков [25, 38]. Такое увеличение константы скорости переноса заряда вызвано высокоэнергетическими состояниями в которых находятся наночастицы.

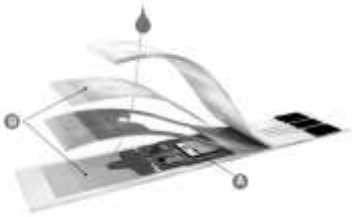
Поэтому можно считать, что наиболее эффективным будет трандьюсер, который имеет на поверхности слои, обеспечивающие наиболее полный переход электронов от электрохимически активных центров ЧС с максимальной каталитической активностью, причем концентрация этих центров должна быть оптимальной с учетом конечной скорости диффузии компонентов анализируемого вещества к поверхности электрода. Последнее условие становится понятным из моделей диффузионных процессов, построенных в работах Р. Комптона [39-41], который рассмотрел их для следующих нескольких типов электродов, включая частично блокированные электроды, т.е. такие, поверхность которых частично покрыта непроводящим веществом, например оксидом, электрохимически гетерогенные электроды, имеющие на поверхности частицы с различной проводимостью, а также пористые электроды [42-44]. В качестве примера гетерогенных электродов можно привести электроды из стеклоуглерода и ITO (индий-олово оксида) [45, 46], на поверхности которых находятся наночастицы благородного металла [43, 44], а в качестве примера пористого – электрод, на поверхность которого нанесен слой углеродных трубок или полиэлектролитов [47, 48]. Очевидно, что на практике на величину аналитического сигнала будет влиять также и итоговая степень шероховатости поверхности электрода.

1.3. Виды рабочих электродов используемых в вольтамперометрических сенсорах для определения глюкозы

В последнее время получила развитие технология печатных электродов для определения глюкозы. Большинство персональных глюкометров используют тест-полоски, с электродами и ферментными катализаторами, изготовленные по технологии screen-printed. Такие полоски одноразового использования массово выпускают по тонкослойной (screen-printed) микротехнологии (рисунок 2а). Технология screen-printed основана на печати материала проводника и изоляторов на поверхности плоских (пластмассовых или керамических) оснований. Каждая полоска содержит рабочий электрод и электрод сравнения. Рабочий электрод покрыт необходимыми реагентами,

такими как фермент, медиатор, стабилизатор, связывающие и закрепляющие реагенты. Такие реактивы обычно распределяются струйной технологией печати. Дополнением к “основному” рабочему электроду может служить вспомогательный электрод. Такие одноразовые устройства устраняют проблемы переноса образца, загрязнения или дрейфа сигнала (рисунок 2б). Различные мембраны (сетки) также включены в тест-полоски для того чтобы вместе с поверхностно активными веществами обеспечить равномерное покрытие образца[17].

а



б Коммерческие электрохимические системы для мониторинга глюкозы в крови

фирма	торговая марка	фермент	медиатор
Abbott	Precision	GOx	ферроцен
	FreeStyle	GOx	осмиевая "проволока"
Bayer	Elite	GOx	феррицианид калия
LifeScan	SureStep	GOx	феррицианид калия
	One Touch Ultra	GOx	
Roche-Diagnostics	Accu-Check	GOx	феррицианид калия

Рисунок 2. Тест-полоска на основе технологии screen-printed для определения глюкозы в крови (а), изображение таблицы коммерческих электрохимических сенсоров (б) (GOx –глюкозоксидаза).

Попытки “направленного” задания свойств ЭС путем создания на поверхности слоев методами фото- или электрополимеризации [49, 50], Ленгмюра-Блоджет [51], «дроп кастинга» («drop casting») [52-56] и др., также не приводит к успеху, поскольку не позволяет на требуемом уровне контролировать как состав, так и морфологию таких слоев. В этом отношении особое значение приобретают методы ПХС (послойной химической сборки), которые дают возможность прецизионно задавать толщину синтезируемого слоя и получать на поверхности электрода все необходимые компоненты. ПХС

позволяет синтезировать мультислой, содержащий ферменты или биоселекторы и медиаторы электронного переноса, а также электрокатализаторы, обеспечивающие сравнительно быстрый перенос электрона от аналита или медиатора на электрод, а также мембрану. Применение электродов со слоем, состоящим из глюкозоксидазы, пероксидазы хрена, конковалина А и МУН, синтезированным в результате 10 циклов ПХС привело к снижению предела обнаружения до $2.5 \cdot 10^{-7}$ М и увеличению чувствительности до токов порядка 0,1 $А \cdot М^{-1} \cdot см^{-2}$ (таблица 1).

*Таблица 1. Составы мультислоев, синтезированных в условиях ПХС на поверхности электродов, методы измерения и характеристики ЭС для определения глюкозы (*S – чувствительность ($А \cdot М^{-1} \cdot см^{-2}$); ТО - время отклика (с); ЛИ - линейный интервал (моль/л); ПО - предел обнаружения (моль/л), СТБ - стабильность (сут.)).*

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
GOX-НЧ Au- хитозан/ Au	ЦВА (-0,1÷0,7 В), АМ (0,7 В)	$S=5,55 \cdot 10^{-4}$ $А \cdot М^{-1}$	[57]
GOX-НЧ Au-ПАМАМ-ПВС / ITO	ЦВА (0,0÷1,0 В)	$S=(3,36 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$, ПО=$17 \cdot 10^{-6}$	[58]
GOX-НЧ Au-ПАМАМ-ПВС / ITO	ЦВА (-0,5÷0,1 В), АМ (0,0 В)	$S=1,11 \cdot 10^{-4}$ $А \cdot М^{-1}$, ПО= $1,9 \cdot 10^{-6}$	[59], [60]
GOX-НЧ Au/ Au	АМ (0,4 В)	-	[61]
GOX-НЧ Au-полиэлектролиты / Au	ЦВА (-0,2÷0,8 В), АМ (0,3 В)	$S=(1,927 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$, ПО = $2,3 \cdot 10^{-6}$	[62]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
GOX-НЧ CdS-ПАМАМ / Pt	ЦВА (-1,0÷1,0 В), АМ (0,5 В)	ЛИ=$1\cdot10^{-6}$- $2,5\cdot10^{-3}$, S=$1,83\cdot10^{-3}$, ПО= $1\cdot10^{-6}$	[63]
GOX-Os - ПАУ / Au	ЦВА (0,1÷0,5 В)	-	[64]
GOX-НЧ Pt-хитозан / СУЭ	ЦВА (-0,6 ÷ - 0,2 В), АМ (0,3 В)	ЛИ=$1,2\cdot10^{-6}$ – $2,0\cdot10^{-3}$, ПО= $4,0\cdot10^{-7}$, СТБ=30	[65]
GOX-HRP-Con A-МУН-пектин / Au	ЦВА (-0,4÷0,6 В), АМ (-0,15 В)	ЛИ=$2,0\cdot10^{-6}$ – $1,7\cdot10^{-4}$, ПО= $2,5\cdot10^{-7}$ М, СТБ=8	[66]
GOX-МУН-полигистидин / СУЭ	АМ (0,7 В)	ЛИ=$2,5\cdot10^{-4}$ М-$5,0\cdot10^{-3}$, S=$(1.94 \pm0.03)\cdot10^{-3}$ $A\cdot M^{-1}$, ПО= $2,2\cdot10^{-6}$, ТО=12, СТБ=15	[67]
полилизин/ лакказа /МУН/ ITO	ЦВА (0,05÷0,75 В)	ЛИ: до $3,0\cdot10^{-2}$	[68]
GOX-МУН-ПЭИ / СУЭ	ЦВА (-0,7÷0,0 В)	ЛИ до $0,3\cdot10^{-3}$, S= $1,07\cdot10^{-1}$	[69]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
GOX-ОУН-ПВ-Os / C	ЦВА (-0,1÷0,5 В), АМ (0,3 В)	ЛИ=(0,5 - 6,0)·10^{-3}, S= 1,6·10^{-2}А·$М^{-1}$ $см^{-2}$, ПО=0,1·10^{-3}, СТБ=30	[70]
GOX-МУН/ C	АМ (0,6 В)	ЛИ=5·10^{-4}-1,5·10^{-2}, S=3,82·10^{-2}А·$М^{-1}$, ПО= 0,9·10^{-4}	[71]
GOX-МУН-ПА / ITO	ЦВА (0,0÷0,5 В), АМ (0,4 В)	ЛИ=(1 - 9)·10^{-3}, S=3,97·10^{-3} А·$М^{-1}$, ПО= 6·10^{-8}, СТБ=21	[72]
МУН-ПДДА / СУЭ	ЦВА (-0,5÷0,5 В), АМ (-0,1 В)	ЛИ=15·10^{-6} - 6·10^{-3}, (15 -120)·10^{-6}, ПО= 7,0·10^{-6}, СТБ=21-28	[73]
GOX-NH_2-МУН-амино - цистеамин/ Au	ЦВА (-0,8÷0,2 В), АМ (-0,3 В)	ЛИ=(1 – 7)·10^{-3}, S= 7,46·10^{-3}, ПО=8·10^{-3}, СТБ=21	[74]
GOX-ОУН-ПДДА / Pt	ЦВА (0,0÷0,6 В), АМ (0,6 В)	ЛИ=5,0·10^{-5}-1,2·10^{-2}, S=6,38·10^{-2}, ПО= 4·10^{-6}, СТБ=30	[75]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
GOX-HRP-ПАУ/ ITO	СЭИ; эл. язык	-	[76]
GOX-HRP-тиомочевина / СУЭ	ЦВА (-0,65÷-0,3 В), АМ (0,3 В)	ЛИ=(5 – 60)·10^{-5}, S=5,73·10^{-3}, ПО= 6·10^{-6}	[77]
GOX-HRP-цистеамин / Au	ЦВА (0,0÷0,5 В), АМ (0,28 В)	ЛИ=(1 – 8)·10^{-3}, S=5,11·10^{-3}, ПО= 9·10^{-6}, ТО=4, СТБ=28	[78]
GOX-ПДДА-Nafion /СУЭ, Pt, C	АМ (0,6 В)	ЛИ=(0,05 -7)·10^{-3}, S= 9,6·10^{-3}, ПО= 2·10^{-5}, СТБ= 28.	[79]
GOX-додецилбензил-сульфоновая кислота/Ag	АМ (-0,1 В)	ЛИ=(1-8)·10^{-3}, S=7,2·10^{-4}, ПО=1,55·10^{-4}	[80]
GOX-НЧ Au-хитозан/ ПА/Pt	АМ (0,6 В)	ЛИ=(0,5-16)·10^{-3}, S=5,55·10^{-4} А·$М^{-1}$, ПО= 7·10^{-6}	[81]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
GOX-НЧ ZnO/ ITO	АМ (-0,2 В)	ЛИ=(0,1-9)·10^{-3}, ПО=1,94·10^{-6}	[82]
GOX-ПЭИ/ ПГЭ	ЦВА (-0,8 ÷0 В)	ЛИ=(0,5-8,9)·10^{-3}, S=7,6·10^{-4}, ПО= 5,0·10^{-5}	[83]
GOX-меркаптопропион. к-та/ ПДДА- ПСС-МУН/ Au	АМ (-0,2 В)	ЛИ до 5·10^{-3}, ПО= 5,8·10^{-5}	[84]

В качестве нанокатализаторов в мультислойных сенсорах используются углеродные нанотрубки [23, 85], однослойные и многослойные, на которые, с помощью полимеров, таких как полиэтиленимин, полипиррол и Nafion, иммобилизуется глюкозоксидаза. Далее приведены данные трансмиссионного электронного микроскопа одно - (Рисунок 3а) и многослойных (Рисунок 3б,в) углеродных нанотрубок, а также нанотрубок, с нанесенной глюкозоксидазой в Nafion [86]. На Рисунке 8 приведены изображения, полученные со сканирующего электронного микроскопа, циклические вольтамперограммы (рисунок 3г) с различными скоростями сканирования, нанотрубок, с иммобилизованной глюкозоксидазой в Nafion, в 20мМ фосфатном буферном растворе pH 6 [86].

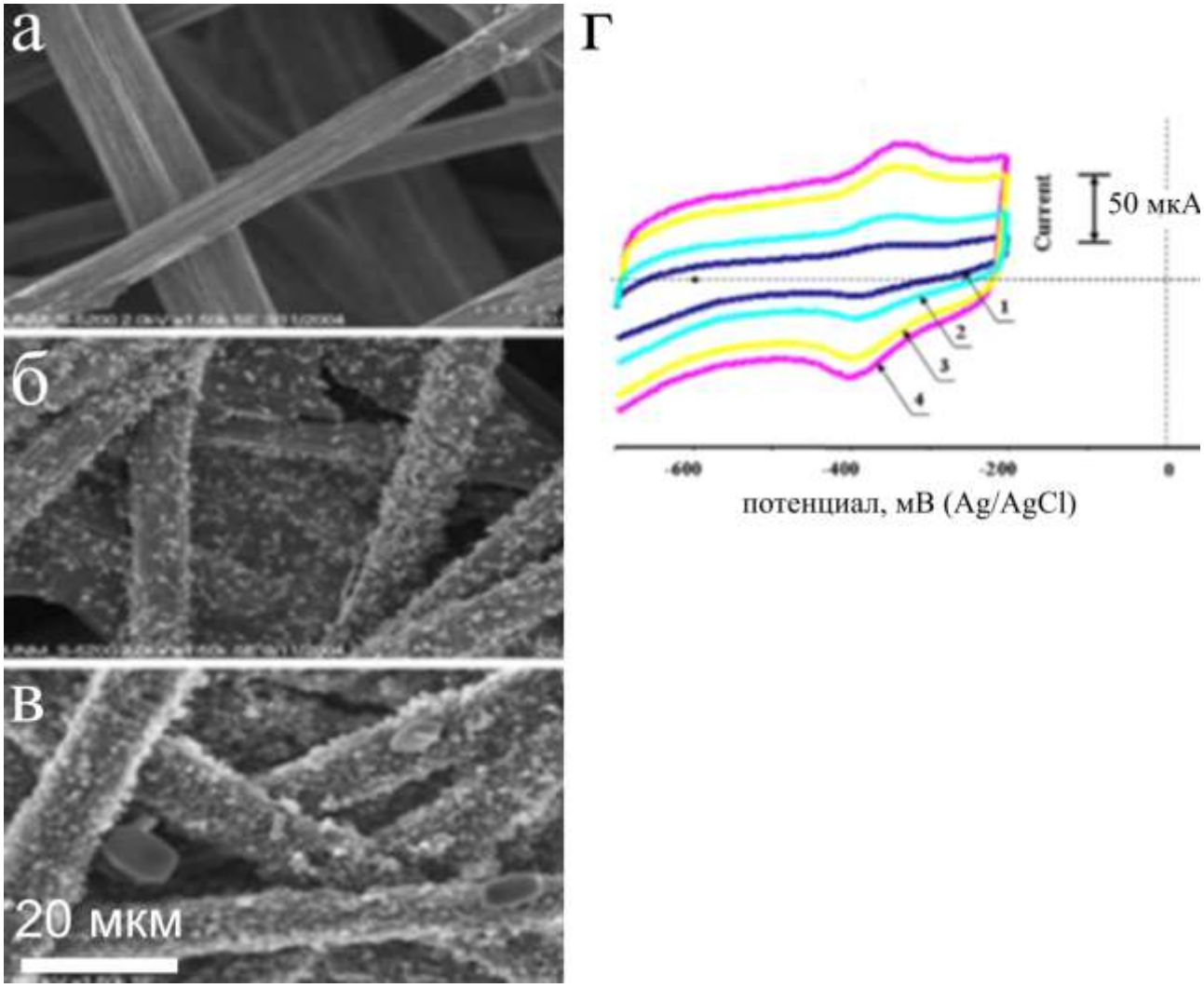


Рисунок 3. Микрофотографии одностенных (а) и многостенных нанотрубок углерода (б, в), циклические вольтамперограммы биосенсора на основе нанотрубок углерода со скоростями сканирования 20 (1), 40 (2), 80 (3), 100 (4) мВ/с (г) [86].

Также катализатором прямого переноса электронов может служить коллоидное золото, нанесенное на поверхность угольно-пастового электрода [85]. В данном случае глюкозоксидаза может быть сорбирована на поверхность коллоидного золота. Далее, на Рисунке 4 представлены циклические вольтамперограммы глюкозоксидазы с прямым переносом на угольно-пастовом электроде, модифицированном коллоидным золотом, в 0,1М фосфатном буферном растворе с pH 5, со скоростями сканирования 50 мВ/с, для следующих концентраций глюкозы: 0, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,20, 0,28 и 0,44

ммоль соответственно. На вставке рисунка 4 приведена зависимости тока пика от концентрации глюкозы [85].

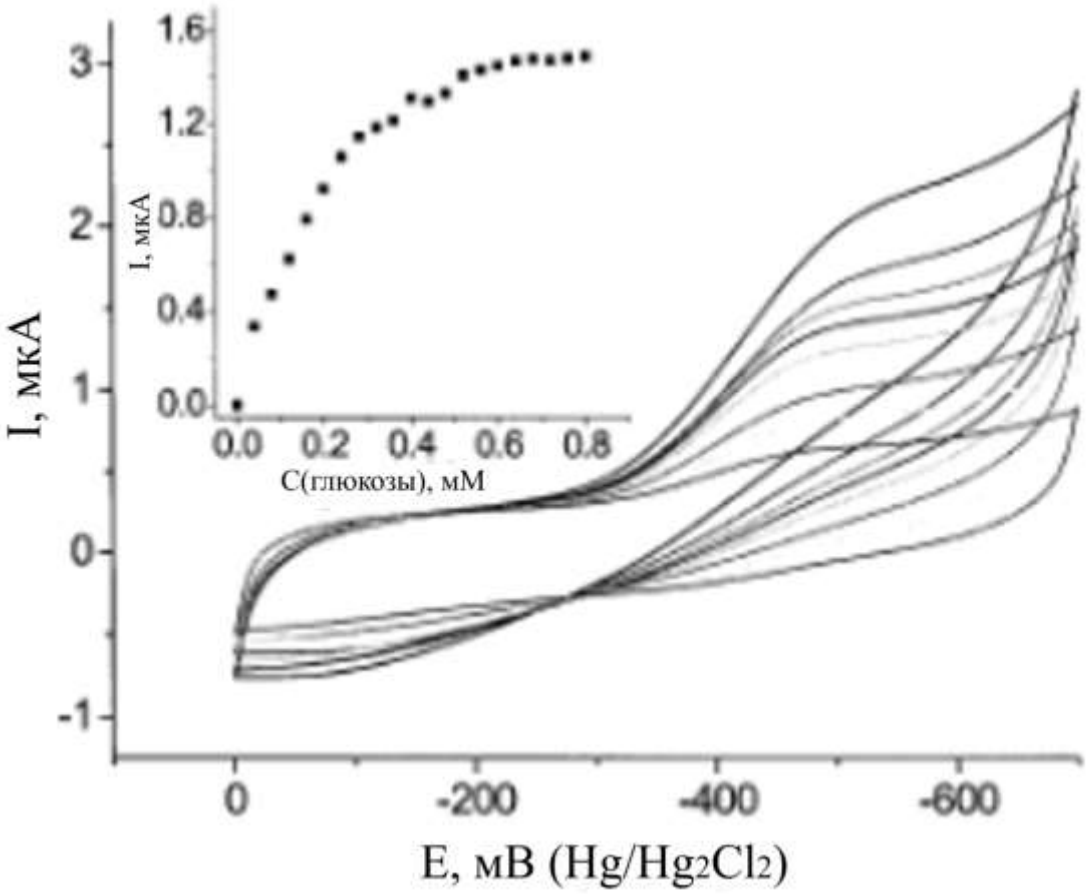


Рисунок 4. Циклические вольтамперограммы с различными концентрациями глюкозы (0, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,20, 0.28 и 0,44 ммоль) на электроде, модифицированном коллоидным золотом и глюкозоксидазой (на врезке зависимость тока восстановления глюкозоксидазы от концентрации глюкозы) [85].

Но, не смотря на высокую каталитическую активность модификаторов, реакция с прямым переносом электрона остается кинетически замедленной и проигрывает в сравнении с реакцией, в которой используется медиатор электронов. В качестве медиаторов для сенсоров на основе глюкозоксидазы используют такие медиаторы как: гидрохинон, гексацианоферрат калия (III), гексацианоферрат калия (II) а также ферроценметанол [86-88].

1.3.1. Биосенсоры на глюкозу на основе глюкозоксидазы и наночастиц золота

В случае биосенсоров с применением глюкозоксидазы, их наиболее часто модифицируют наноструктурами золота. Это вызвано высокой проводимостью золота, что уменьшает сопротивление и облегчает обмен электронами между электродом и глюкозоксидазой, а также биосовместимостью благородных металлов. В качестве модификаторов могут выступать как наночастицы, так и нанопроволоки золота. На рисунке 10 приведены данные сканирующего электронного микроскопа для электрода из углеродных нанотрубок, модифицированного нанопроволоками золота диаметром 50 нм, и длиной до 1 мкм[87].

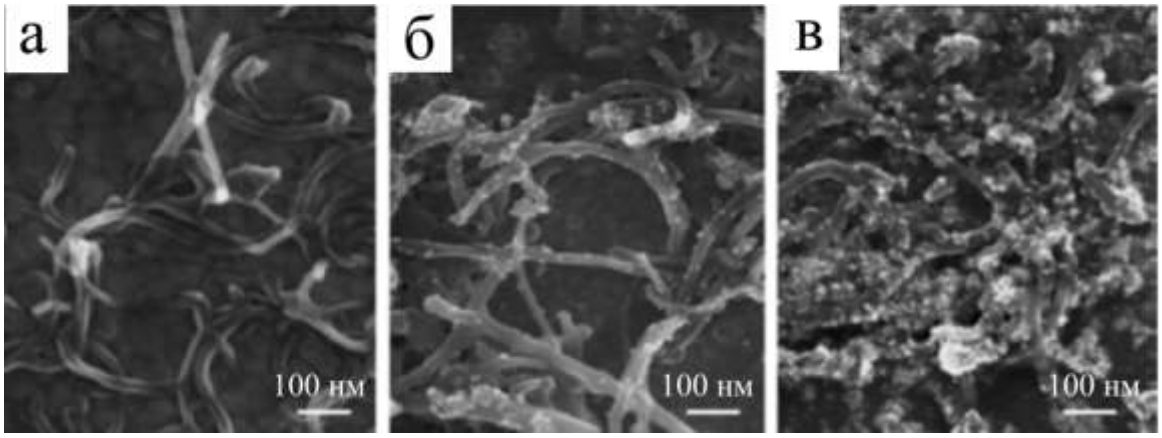


Рисунок 5. Микрофотографии поверхности углеродных нанотрубок (а), углеродных нанотрубок, модифицированных наночастицами золота (б), углеродных нанотрубок, модифицированных наночастицами золота и глюкозоксидазой (в) [87].

Изменения поверхности в результате модификации приводят к изменению вида годографов импедансной спектроскопии для: золотого электрода (рисунок 5а), углеродных нанотрубок, модифицированных наночастицами золота (рисунок 5б), углеродных нанотрубок, модифицированных наночастицами золота и иммобилизованной глюкозоксидазой (рисунок 5в), в растворе 0.1М хлорида калия содержащего 5мМ гексацианоферрата калия (III).

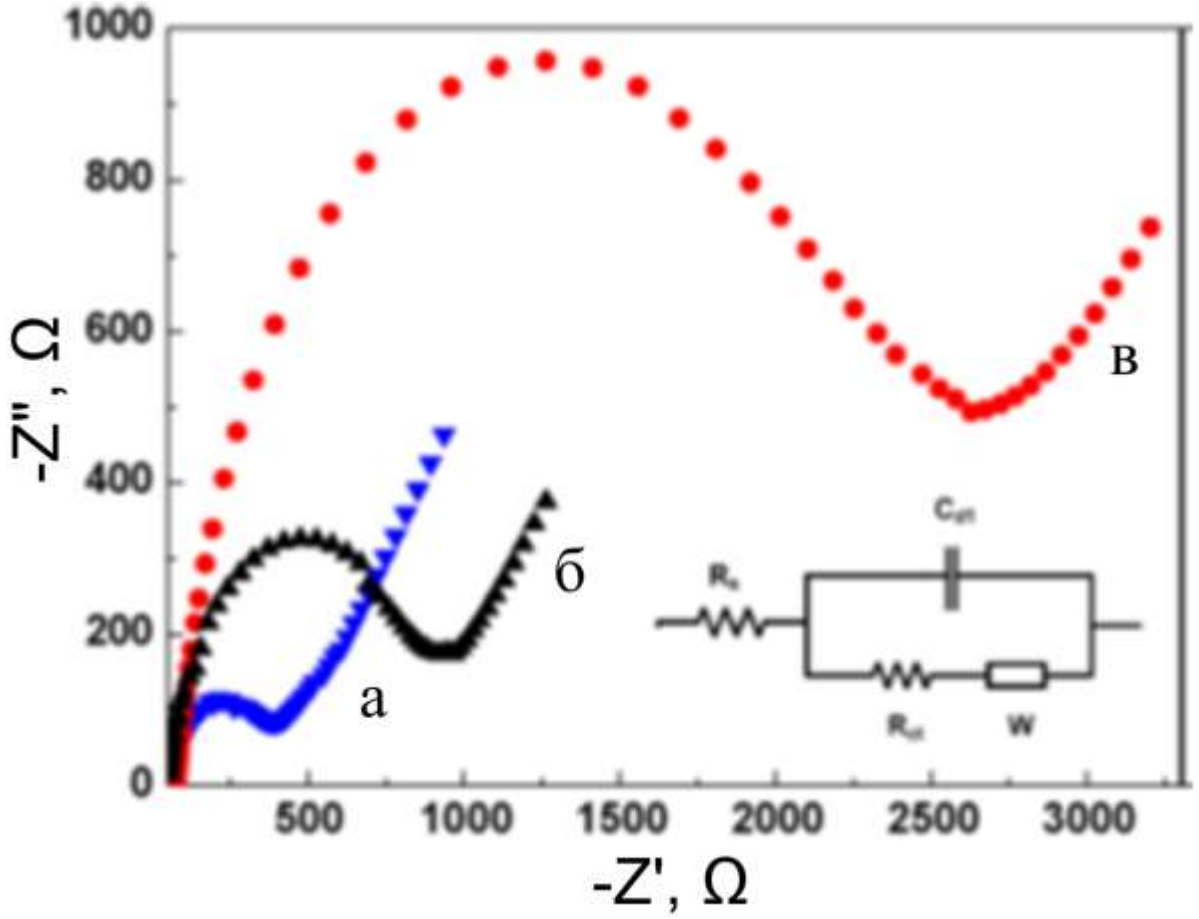


Рисунок 6. Данные спектроскопии электрохимического импеданса для углеродных нанотрубок (а), модифицированных наночастицами золота (б) и наночастицами золота и глюкозоксидазой (в) [87].

По данным импеданса можно судить о том, что при модификации золотыми наночастицами емкостная составляющая растет больше, чем сопротивление, а при иммобилизации глюкозоксидазой, увеличивается сопротивление, за счет неэлектроактивной структуры глюкозоксидазы (рисунок 6).

По полученной концентрационной зависимости можно судить об увеличении линейного диапазона до 10мМ, чувствительности до 19,3±0,5 мкА/(мМ·см^2) и предела обнаружения до 2,3мкМ [87] .

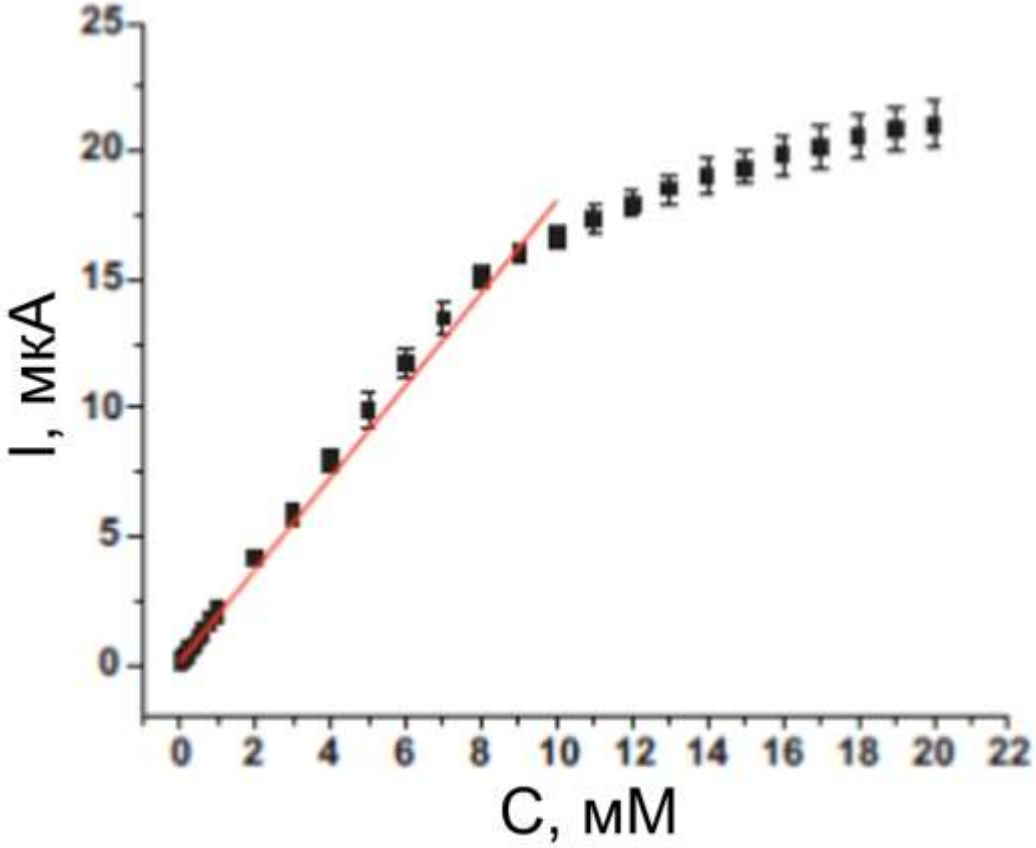


Рисунок 7. Зависимость тока восстановления глюкозоксидазы от концентрации глюкозы для построения зависимостей для расчета константы Михаэлиса [87].

Для нахождения активности глюкозоксидазы рассчитывают контсанту Михаэлиса [87] по формуле 1:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{K_m^{app}}{I_{max}} \frac{1}{C} + \frac{1}{I_{max}} \quad (1)$$

Где:

i_{SS}- стационарный ток, после добавления глюкозы;

i_{max}- максимальное значение тока при максимальной концентрации;

C- максимальная концентрация глюкозы в растворе.

Для данного случая константа Михаэлиса равна 6,7мМ (рисунок 7). Также в литературе приводятся следующие значения 10,5мМ [89], 14,9мМ [90] и 20мМ [91].

Помимо вышеперечисленных методов иммобилизации глюкозоксидазы при помощи полимерных пленок, используют так называемые cross-link [92] реагенты, которые связывают глюкозоксидазу с поверхностью электрода.

1.3.2. Химические методы синтеза наноструктур золота с использованием олеиламина для электрохимических биосенсоров

Существует множество химических методов синтеза наноструктур, но возможность получения монодисперсных структур очень мала. Размер наночастиц может варьироваться от 5 до 20 нм. В основном для образования наностуктур используют олеиламин. Тогда формирование наноструктур происходит за счет образования аминовых комплексов Au(I, III), где олеиламин выступает в роли восстановителя и стабилизирующего реагента [93, 94]. Таким образом для образования наноструктур нужно образование промежуточного комплекса Au(I) и олеиламина (рисунок 7). Этот комлекс образуется при ориентации олеиламина полярными аминогруппами к атому золота [93, 94].

$$AuCl + OA \rightarrow \left[Au(OA)\right]^{+} + Cl^{-}$$

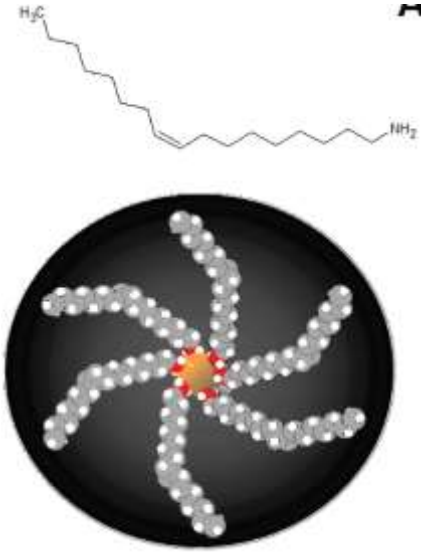


Рисунок 7. Строение олеиламина и его ориентация к золоту.

Далее происходит полимеризация олеиламина и самоорганизация полимерной цепи, что приводит к взаимодействиям между лигандами. При медленном окислении олеиламина, и восстановлении частиц Au(I) до Au(0), происходит формирование наночастиц золота, которые имеют поликристаллическую структуру. Дальнейшее взаимодействие наночастиц приводит к образованию нанопроволок различного диаметра и длины, а также наностолбиков [94, 95].

Синтез наноструктур проходит в несколько этапов. На первом этапе хлориды золота (I или III) растворяют в олеиламине, к полученной смеси добавляют гексан, его используют в качестве растворителя для уменьшения скорости полимеризации. Смесь, оранжевого цвета, тщательно перемешивают, иногда с использованием ультразвука, а затем оставляют на 24 часа в инертной среде аргона, потом, бесцветную смесь нагревают до 80^{0}C в течение 5 часов, при этом раствор переходит из бесцветного в красный. Смеси дают остыть до комнатной температуры, центрифугируют не менее трех раз на скорости 12000 оборотов в минуту, для удаления избытка олеиламина [94].

Для синтеза нанопроволок используют хлорид золота (III), который растворяют в толуоле, полученную смесь нагревают до 120^0С, при этом смесь переходит из оранжевого цвета в бесцветный. Далее смеси дают остыть до комнатной температуры и оставляют на два дня, для формирования наночастиц. Через несколько дней, к смеси добавляют аскорбиновую кислоту, которая действует в качестве восстановителя, что и способствует образованию нанопроволок [96].

1.3.3. Методы иммобилизации наноструктур золота и глюкозоксидазы на поверхности электрода

При модификации золотых электродов наноструктурами золота, возможны два варианта. Первый вариант – адсорбция наноструктур из раствора на электрод в течение 24-48 часов [97]. Второй вариант – модификация золотого электрода короткоцепочечными дитиолами, а затем сорбция и связывание тиолами наноструктур и поверхности электрода [97].

Помимо вышеперечисленных методов иммобилизации глюкозоксидазы при помощи полимерных пленок, используют так называемые cross-link реагенты, которые связывают глюкозоксидазу с поверхностью электрода.

1.4. Бесферментные электрохимические сенсоры

Бесферментные электрохимические сенсоры основаны на прямом определении аналитов. Прямое определение биологически значимых аналитов затруднено в связи с высокими потенциалами детектирования таких веществ. В случае бесферментных электрохимических сенсоров достигается снижение потенциалов детектирования за счет использования каталитических реакций таких аналитов с электродами, модифицированными наноструктурами.

1.4.1. Применение наноструктур в электрохимических сенсорах

Несмотря на широкую распространенность электрохимических биосенсоров, существует ряд недостатков, которые ограничивают их практическое применение. Так, процесс иммобилизации и сохранения стабильности фермента очень сложен. Кроме того, на активность фермента влияют температура, pH, влажность и токсичные соединения, что приводит к ухудшению стабильности и низкой воспроизводимости электрохимического биосенсора. Вследствие этого требуется создание новых высокочувствительных, селективных и экспрессных сенсоров, исключающих применение ферментов для таких биологически активных веществ как глюкоза и пероксид водорода. В последнее время большое внимание уделяется бесфементным электрохимическим сенсорам на основе наноматериалов, такие сенсоры сочетают преимущества электрохимических методов и уникальные свойства наноматериалов, что позволяет значительно увеличить чувствительность и уменьшить продолжительность анализа. В бесферментных электрохимических сенсорах определение глюкозы и пероксида водорода проводится за счет реакций их окисления/восстановления, катализируемых на поверхности наноматериалов.

Наноматериалы в качестве компоненты трансдьюсеров для электрохимических сенсоров применяют для увеличения чувствительности и уменьшения продолжительности анализа.

Стабильность и интенсивность аналитического сигнала электрохимических сенсоров увеличивают такие перспективные наноматериалы как наночастицы Au [98], Pt [99] и Pd [100]. Методы синтеза наноструктур для получения аналитического сигнала совпадают с методами синтеза наноструктур для ферментных электрохимических сенсоров. А также к наноструктурам для бесферментных сенсоров предъявляются требования высокой каталитической активности и биологической совместимости.

1.5. Бесферментные сенсоры для определения пероксида водорода

Пероксид водорода является продуктом или реагентом в большинстве реакций, протекающих в живой и растительной клетке. Так как для большинства электрохимических биосенсоров для определения пероксида водорода характерны те же недостатки что и для биосенсора для определения глюкозы, то использование наноматериалов для бесферментного определения пероксида водорода было также тщательно изучено [101, 102].

Бесферментное определение пероксида водорода катализируемое наноматериалами проводится на основании реакций восстановления либо окисления пероксида водорода на электроде. Данные реакции соотвествуют механизму, представленному на рисунке 9.

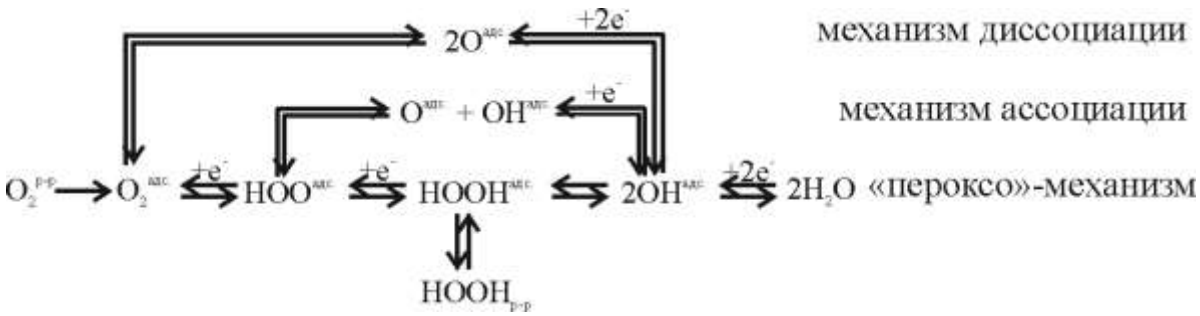


Рисунок 9. Возможные пути реакций пероксида водорода на поверхности электрода.

Такая же тенденция наблюдается и в случае определения H_2O_2 на электроде, модифицированном оксидом графена с иммобилизованными “капельным” методом (drop casting) наночастицами Ag, для которого предел обнаружения составил лишь $1{,}099 \cdot 10^{-6}$ М [103].

*Таблица 3. Аналитические характеристики бесферментных электрохимических сенсоров для определения пероксида водорода (*S – чувствительность ($А·М^{-1}·см^{-2}$); ТО - время отклика (с); ЛИ - линейный интервал (моль/л); ПО - предел обнаружения (моль/л), СТБ –стабильность (сут.)).*

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
ПОМ-ПДДА / С	ЦВА (0,0÷0,4 В)	-	[104]
нафтол зеленый В - СДГ/ СУЭ	ЦВА (0,2÷0,6 В), АМ (0,38 В)	ЛИ $8·10^{-6}$ – $1,8·10^{-4}$, ПО= $0,9·10^{-6}$ СТБ=14	[105]
СДГ/ ITO	ЦВА (-0,2÷0,8 В)	ЛИ=$4,9·10^{-7}$-$2,4·10^{-4}$ СТБ= 20	[106]
НЧ Au-тионин / Au	ЦВА (-0,35÷0,1 В), АМ (-0,18 В)	S=$22,8·10^{-3}$ ЛИ=$6,0·10^{-6}$ – $1,1·10^{-3}$, ПО= $5,8·10^{-6}$	[107]
гексацианоферрат Cu/ F-Sn оксид	ЦВА (0,0÷1,2 В), АМ (0,0 В)	S=$3·10^{-2}$	[108]
МУН-политионин-оксид железа / СУЭ	ЦВА (-0,6÷0,3 В) АМ (-0,5 В)	ЛИ=$(0,09 - 6,54)·10^{-3}$, S= $2,74·10^{-3}А·М^{-1}$, ПО= $5,36·10^{-5}$	[109]
тетрасульфофталоцианин Co-ПДДА / Au/	ЦВА (-0.2÷0.5 В)	ЛИ=$(1-20)·10^{-6}$, ПО= $4·10^{-7}$, СТБ=14	[110]
фталоцианин Fe (II) - ПАБС-МОУН/ Au	ЦВА (-0,1÷0,6 В)	ПО= $5,5·10^{-4}$, S = $0,87·10^{-4}$ $А·М^{-1}$	[111]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
MnO_2-ПДДА- ПАС / СУЭ	АМ (0,25; 0,45 В)	ЛИ=$4{,}5\cdot10^{-8}$-$1{,}0\cdot10^{-4}$, S= 0,377±1, ПО=$22\cdot10^{-9}$	[112]
НЧ берлинской лазури-ПАУ / стекло	АМ (0,2 В)	-	[113]
TiO_2 - ПАУ / ПГЭ	ЦВА (-0,2÷0,6 В)	-	[114]
TiN-бромид 1-(3-аминопропил)-3-метилимидазола/ СУЭ	ЦВА (-0,8÷0,5 В), АМ (-0,35 В)	ЛИ=$1{,}0\cdot10^{-6}$ – $2{,}1\cdot10^{-3}$, S= $3{,}80\cdot10^{-4}$	[115]
мезопористый углерод СМК-3/ СУЭ	ЦВА (-1,0÷0,3 В)	ЛИ=$(1{,}2 – 57)\cdot10^{-6}$, ПО= $0{,}6\cdot10^{-6}$, СТБ=30	[116]
берлинская лазурь-ПДДА /ITO	ЦВА (-0,2÷1,0 В) АМ (-0,1 В)	ЛИ=$(0{,}5 – 3{,}5)\cdot10^{-3}$, ПО= $1\cdot10^{-4}$	[117]

Состав мультислоя/материал электрода	Метод измерения	Характеристики сенсора*	Ссылки
НЧ Au/ СУЭ	ЦВА (-0,5÷0,8 В), АМ (-0,3 В)	$S=(6,339\pm0,156)\cdot10^{-2}$ $A\cdot M^{-1}$,$(2,452\pm0.230)\cdot10^{-2}$ $A\cdot M^{-1}$, ЛИ= $5,0\cdot10^{-6}$-$1,0771\cdot10^{-3}$,$1,4745\cdot10^{-3}$-$2,5362\cdot10^{-2}$	[118]
НЧ Au-хитозан-МУН /СУЭ	АМ (-0,2 В)	ЛИ=$1,5\cdot10^{-6}$- $5,1\cdot10^{-4}$, S: $9,221\cdot10^{-2}$, ПО= $9,0\cdot10^{-8}$	[119]

1.6. Новые подходы для миниатюризации бесферментных ЭХ сенсоров

Несмотря на многообразие материалов для синтеза наноструктур, к сенсорам на их основе предъявляются жесткие требования. Особенно, это относится к электрохимическим сенсорам, применяемым для детектирования веществ в биологических средах in vivo. Поэтому в таких сенсорах используют инертные электродные материалы. Наноматериалы на основе благородных металлов и их сплавов удовлетворяют вышеуказанным требованиям. Применение наноматериалов в качестве трансдьюсеров в электрохимических сенсорах предоставило возможность создания миниатюризированных сенсорных систем с электрохимическим принципом детектирования.

1.6.1. Направленный электрохимический синтез наноструктур

Миниатюризация электрохимических систем требует создания электродов с заданной и воспроизводимой поверхностью. Методика направленного электрохимического синтеза наноструктур (DENA) удовлетворяет вышеуказанному требованию, а также позволяет синтезировать наноматериалы на основе металлов и их сплавов.

Впервые DENA метод был предложен Озтурком [120]. В методе направленного электрохимического синтеза наноструктур используется приложенное переменное напряжение высокой частоты между двумя контактными электродами для осаждения наноструктур металлов из растворов их солей. Данный метод был основан на теории солидификации дентдритных структур. В соответствии с этой теорией происходит рост кристаллов или дендритов с фиксированным диаметром в фиксированном кристаллографическом направлении. Позднее была предложена теория электрокристаллизации [121], которая более полно описывала процессы, происходящие при электроосаждении. Также были выведены зависимости от условий электроосаждения наноструктурированных УМЭ и нанодендритов. Так, на скорость роста и диаметр наноструктурированных УМЭ влияет концентрация соли металла и величина частоты [122, 123]. Соотношение диаметра контактного электрода и частоты было исследовано в работе А. Неровского [124], А также была доказана эффективность треугольной формы контактных электродов для процесса электроосаждения наноструктурированных УМЭ. В литературе описаны различные варианты синтеза наноструктурированных УМЭ на различном расстоянии между электродами: от 2 до 60 мкм. Данным методом было успешно синтезировано большое количество наноструктурированных УМЭ металлов, таких как золото [125], индий [126], платина [124], палладий [127-129], серебро [130], а также их сплавов: Au/Pt [131], Au/Ag [121], Au/Pd [132]. Основные публикации по этой теме суммированы в таблице 4.

Таблица 4. Сводная таблица параметров синтеза наноструктурированных УМЭ по методу DENA по литературным данным (ν – частота переменного напряжения, ACV V_{pp} – переменное напряжение от пика к пику, DCV - постоянное напряжение, d – расстояние между контактными электродами, l – длина наноструктур, HEPES- 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, НЧ - наночастицы).

Материал электрода	Состав наноструктур	Состав раствора	ν, МГц	ACV V_{pp}, В	DCV, В	d, мкм	l, мкм	Диаметр наноструктур, мкм	ссылка
Pt	Pt	H_2PtCl_6; NaCl	0-10	0-30	1,5 <	60	60	0,1	[133]
Au	Au	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	20	5	$5 \cdot 10^{-6}$	10	10	1,5	[122]
Al	In	$In(CH_3COO)_3$	0,5-3,5	18	-	60	60	0,061-0,38	[126]
Al	In	$HAuCl_4$	10-50	6	-	60	60	0,045-0,15	[123]
Au	Pd	$Pd(CH_3COO)_2$; HEPES буф.р-р	0,3	2; 10	-	5	5	0,005-0,01; 0,2-0,3	[127]

Материал электрода	Состав наноструктур	Состав раствора	ν, МГц	ACV V_{pp}, В	DCV, В	d, мкм	l, мкм	Диаметр наноструктур, мкм	ссылка
ITO	Au/Pt	$H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$; $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$; PBS pH 6,98	0–21	0–20	-	60	-	0,05-1,45	[134]
Au	Au/Pt	$HAuCl_4 \cdot 4H_2O$; $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$; H_3BO_3	0,0003-1	8 – 16	-	10 - 40	18	0,1 – 0,2	[131]
Au	Pd/Au	$HAuCl_4 \cdot 4H_2O$; $PdCl_2$	$3 \cdot 10^{-5}$-15	12	-	20	-	0,25-0,3	[132]
Au	Au; Pt	-	$1 \cdot 10^{-6}$	25,5	1,5	5 -120	10 -40	0,2 – 3	[135]
Me	Au	НЧ Au (15-30 нм); NaCl	$5 \cdot 10^{-6}$-$2 \cdot 10^{-4}$	50-250	-	$2 \cdot 10^{3}$ - $1 \cdot 10^{4}$	$2 \cdot 10^{3}$ - $1 \cdot 10^{5}$	неск. нм	[136]

Материал электрода	Состав наноструктур	Состав раствора	ν, МГц	ACV V_{pp}, В	DCV, В	d, мкм	l, мкм	Диаметр наноструктур, мкм	ссылка
Au	Pd	$Pd(CH_3COO)_2$; HEPES буф.р-р	$3\cdot10^{-4}$-0,3	22,6-28,2	-	10 - 25	10 - 25	0,1	[129]
Pt	Au	AuI_3	неск.	18	0,7	≈50	≈50	0,01-0,05	[137]
Pt	Au	Au, I_2, KI, этанол	2	18	-0,6	2-5	≥100	0,2	[125]
Al	In	$In(CH_3COO)_3$	1	18	-	60	60	0,367-0,556	[126]
Au	Pt	H_2PtCl_6	0,1-1	18	-	-	-	0,015-0,06	[138]
Au	Pt	K_2PtCl_4	0,100	4	-	2-4	2-4	0,023	[124]
Pt	Au/Ag	$AgNO_3$; Au-электролизный р-р	0,5-1	20	2 В	8-10	-	-	[121]

1.6.2. Миниатюризированные системы для определения пероксида водорода в среде клеточных культур

Источниками пероксида водорода в биологических средах являются спонтанно или каталитически образовавшиеся анионы супероксида. Эти анионы получаются при восстановлении кислорода в течение аэробного дыхания, либо как следствие действия на клетку различных физических, химических или биологических раздражителей [139-142]. Пероксид водорода и его радикалы являются активными формами кислорода, и их потенциал восстановления находится в диапазоне от плюс 0,77 до плюс 1,44 В. Прямое электрохимическое окисление пероксида водорода на стеклоуглеродном электроде, как метод для определения пероксида водорода в среде клеточных культур, был предложен в 1984 году. Но такое воздействие на клетки может привести к изменению макромолекул в клетке, нарушить их физиологические функции в жизнедеятельности клеточной ткани. Такие нарушения приводят к тому, что клетки задействуют сигнальный и защитный механизмы, что в свою очередь приводит к старению клетки и ее смерти. При этом пероксид водорода является одним из самых стабильных продуктов метаболизма клетки [143], что приводит к потребности в разработке электрохимических методов его детектирования в биологических средах. Электрохимические методы детектирования пероксида водорода при низких потенциалах не приводит к нарушению жизнедеятельности клетки. Помимо электрохимических методов анализа для определения пероксида водорода и других продуктов метаболизма клеток используют флуоресцентный и другие оптические методы анализа. Для снижения потенциалов детектирования пероксида водорода используют различные новые наноструктурированные материалы и биологические молекулы [55, 56, 144, 145].

Коммерческие электрохимические биосенсоры позволяют проводить экспрессное определение концентрации глюкозы в домашних условиях. Несмотря на это они обладают рядом недостатков: низкой точностью определения и низкой стабильностью работы. Создание вольтамперометрических сенсоров на основе

электродов, модифицированных наноструктурами золота, приведет к увеличению стабильности работы и повышению чувствительность сенсоров. Для создания миниатюризированных вольтамперометрических сенсоров наиболее перспективным является метод DENA, так как данным методом можно синтезировать ультрамикроэлектроды с воспроизводимой поверхностью. Метод DENA ранее не применялся для синтеза ультрамикроэлектродов.

Поэтому данная работа посвящена разработке методов синтеза воспроизводимых наноструктур золота, палладия и их сплавов и, разработке рабочих электродов для вольтамперометрических сенсоров на их основе и изучению их аналитических характеристик.

2. Методическая часть

2.1. Оборудование и реактивы

Используемые реактивы

1) Гексацианоферрат (III) калия ≥99.0% (Fluka)

2) Нитрат калия ≥99% (Sigma Aldrich)

3) Дигидрофосфат натрия моногидрат 98-102% (Sigma Aldrich)

4) Гидрофосфат натрия ≥99% (Sigma Aldrich)

5) D-(+)-Глюкоза ≥99% (Sigma Aldrich)

6) Ферроценметанол 97% (Sigma Aldrich)

7) Пероксид водорода 30%, для определения следовых количеств (Sigma Aldrich)

8) Хлорид золота (III) тригидрат ≥99% (Sigma Aldrich)

9) Хлорид палладия (II) (Sigma Aldrich)

10) Олеиламин 70% (Sigma Aldrich)

11) Тетрахлоропалладат (II) калиия 99% (Sigma Aldrich)

12) Гидрохинон 99% (Sigma Aldrich)

19) Глутаровый альдегид, 50% водный раствор ≥99% (Sigma Aldrich)

20) Цистеамин ≥98% (Sigma Aldrich)

21) Глюкозоксидаза 50KU, 100000-25000 единиц/грамм (Sigma Aldrich)

23) L-аскорбиновая кислота ≥99% (Sigma Aldrich)

24) Толуол для ВЭЖХ ≥99% (Sigma Aldrich)

25) Гексан для ВЭЖХ ≥98,5% (Sigma Aldrich)

26) Этанол, для анализа (Emsure)

27) Ацетон для ВЭЖХ ≥99,9% (Sigma Aldrich)

28) Кислота серная, концентрированная 95-97% (Sigma Aldrich)

29) 2-пропанол ≥99% (Sigma Aldrich)

30) Вода дистиллированная

31) Вода бидистиллированная (MilliQ)

2.1.1. Приготовление растворов

1) 5мМ раствор цистеамина для иммобилизации на электроде готовили с помощью взятия навески (или аликвоты) в бюксе объемом 10 мл, и растворенияем в 5 мл растворителя (гексан или этанол).

2) Готовили 0,1М раствор гидрофосфата натрия: навеску, массой 0,8659г растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, затем переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки дистиллированной водой.

3) Готовили 0,1М раствор дигидрофосфата натрия: навеску массой 0,5303г растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, затем переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки дистиллированной водой.

4) Готовили 0,1М фосфатный буферный раствор pH 7: смешивали 500 мл 0,1М раствора гидрофосфата натрия и 325 мл 0,1М раствора дигидрофосфата натрия.

5) Готовили 0,1М фосфатный буферный раствор pH 5,8: смешивали 250 мл 0,1М дигидрофосфата натрия и 21,7 мл 0,1М гидрофосфата натрия.

6) Готовили 0,1М раствор нитрата калия: навеску массой 2,5275 г растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, затем переносили в мерную колбу на 250 мл и доводили до метки дистиллированной водой.

7) Готовили 0,1М раствор гидроксида калия: навеску массой 0,6452 г растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды и переносили в мерную колбу на 100 мл, затем доводили до метки дистиллированной водой.

8) Готовили 0,1М раствор серной кислоты: брали аликвоту концентрированной серной кислоты (95-97%) объемом 273 мкл и разбавляли в небольшом количестве дистиллированной воды, затем переносили в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

9) Готовили 0,001М раствор гексацианоферрата (III) калия: навеску массой 0,03293 г растворяли в небольшом количестве 0,1М фосфатного буферного раствора (pH 7) или 0,1М раствора нитрата калия. Растворенную навеску переносили в мерную колбу объемом 100 мл, затем доводили до метки 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 7) или 0,1М раствором нитрата калия. Растворы с меньшими концентрациями готовили путем разбавления исходного раствора.

10) Готовили 0,001М раствор гидрохинона: навеску массой 0,0111г растворяли в небольшом количестве 0,1М фосфатного буферного раствора (pH 7) и переносили в мерную колбу на 100 мл, затем доводили до метки метки 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 7). Растворы с меньшими концентрациями готовили путем разбавления исходного раствора.

11) Готовили 0,001М раствор ферроценметанола: навеску массой 0,026г растворяли в небольшом количестве 0,1М фосфатного буферного раствора (pH 7) или 0,1М растворе нитрата калия. Растворенную навеску переносили в мерную колбу объемом 100 мл, затем доводили до метки 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 7) или 0,1М раствором нитрата калия. Растворы с меньшими концентрациями готовили путем разбавления исходного раствора.

12) Готовили 0,1М раствор D-(+)-глюкозы: навеску массой 0,4504 г растворяли в небольшом количестве 0,1М фосфатного буферного раствора (pH

5,8) и переносили в мерную колбу объемом 25 мл, затем доводили до метки 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 5,8).

13) Растворы глюкозы в диапазоне от 10^{-2} М до 10^{-5} М готовили последовательным разбавлением из более концентрированного раствора перед каждым измерением.

14) 0,1 М раствор пероксида водорода готовили разбавлением из 30% раствора в деионизованной воде. Растворы пероксида водорода с концентрациями от 10^{-2} М до 10^{-4} М готовили последовательным разбавлением более концентрированного раствора. Все растворы готовили перед каждым измерением.

2.1.2. Оборудование

Контактные электроды и электроды для модификации наноструктурами были изготовлены в чистой комнате со степенью чистоты соответствующей классу 10 (ISO 5). Для этого на кремниевую подложку наносили слой оксида кремния с заданной толщиной (1 мкм) путем окисления в печи для обжига фирмы Tempress. Напыление золота (100 нм) и титана (10 нм) проводилось осаждением из фазы пара на приборе для нанесения тонких пленок Balzers (Pfeiffer) PLS 500. В дальнейшем такие тонкопленочные электроды использовали в качестве немодифицированных электродов. Фотолитографические процедуры были выполнены на установке Mask Aligner Süss MA-6 (ртутная газоразрядная лампа, мощность 350 Вт). Для характеристики поверхности полученных наноструктур использовали метод сканирующей электронной микроскопии на приборе Magellan™ XHR SEM, оснащенном приставкой для энергодисперсионного спектрального анализа. Данная приставка использовалась для изучения характеристик и элементного состава наноструктур. Для приготовления образцов в виде продольных срезов использовался сканирующий электронный микроскоп с приставкой фокусированного ионного луча для травления поверхности наноструктур. Оптический микроскоп Leica INM100 использовался для получения изображений поверхности подложки во время синтеза

наноструктурированных УМЭ. DENA синтез наноструктур и нанодендритов проводили с генератором высоких частот Agilent Trueform Series Waveform Generator (33600 Series, Higher Frequency Model). Все электрохимические измерения проводились на потенциостате-гальваностате AUTOLAB PGSTAT302N. Электрохимическая ячейка состояла из: электрода сравнения (Ag/AgCl, 3 M KCl, World Precision Instruments), вспомогательного платинового электрода в виде спирали, а также рабочего электрода (в виде наноструктурированного УМЭ или нанодендрита). Обескислораживание раствора обеспечивали путем продувки через него аргона высокой чистоты. Все измерения проводились при температуре 22±1°C (по комнатному термостату). Обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Origin 9.0.

Для получения микрофотографий на сканирующем электронном микроскопе приборе Magellan™ XHR SEM использовали следующую методику. Устанавливали подложку с синтезированными наноструктурами, размером 13×13 мм, в держатель камеры микроскопа и закрепляли металлическим винтом, который служил стоком заряда с поверхности подложки. Камеру закрывали и откачивали воздух, создавая давление не более $1 \cdot 10^{-9}$ бар. Манипулятором регулировали положение столика с образцом в камере так, чтобы расстояние между ним и источником излучения составляло 4 мм. При помощи программного обеспечения Zeiss SmartSEM фокусировали электронный зонд на поверхности исследуемого образца, регулируя параметры фокусировки в программном обеспечении кнопками fine (точно) и coarse (грубо). Фокусировку проводили по детектору вторичных электронов. Для получения более детального изображения при большем разрешении для объектов размером от 200 нм до 20 нм использовали детектор отраженных электронов.

Рентгеновский энергодисперсионный анализ проводили с использованием дрейфового кремниевого детектора (SDD) X-Max^{N} (Oxford Instruments) при помощи программного обеспечения Inca Wave и AZtecEnergy (Oxford Instruments).

Исследование образца и выбор места снятия спектра проводили при помощи программного обеспечения электронного микроскопа в режиме детектирования вторичных электронов. В таком режиме существует возможность задания более низкого ускоряющего напряжения порядка 5-10 кВ, тем самым сохраняя поверхность для последующего снятия энергодисперсионного рентгеновского спектра. Затем включали дрейфовый кремниевый детектор для снятия энергодисперсионного спектра. Величина ускоряющего напряжения при включенном SDD детекторе составляла 10 кВ. Корректировку фона проводили относительно материала подложки (Si/SiO_2). Такое значение ускоряющего напряжения позволяет детектировать рентгеновские спектры благородных металлов (таких как Au, Pd, Ni и др.), вплоть до K_α линий некоторых из них. Энергодисперсионный рентгеновский спектр снимали как для определенной точки на участке синтезированных наноструктур, так и на всей поверхности наноструктур. По полученным спектральным данным были построены карты распределения элементов в синтезированных наноструктурах и гистограммы относительного содержания элементов. Обработка спектральных данных проводилась на программном обеспечении Inca Wave и AZtecEnergy,

2.2. Методы синтеза наноструктур и модификации электродов

Для синтеза наноструктур использовался олеиламиновый метод, а модификация проводилась методами in situ и методом «дроп кастинг» а для синтеза наноструктурированных УМЭ использовали метод DENA.

2.2.1. Синтез наноструктур золота олеиламиновым методом

Наноструктуры золота были получены, как описано в обзоре литературы (см. раздел 1.5), методом, предусматривающим использование олеиламина в количестве 20мл (в гексане, объемом 20 мл) и хлорида золота (I), массой 3,5 мг [94]. В данном методе предусматривается мягкое восстановление соли золота при комнатной температуре в течение 6 часов. В данном методе примущественно получается смесь наночастиц и нанопроволок с преобладанием наночастиц.

Другой метод химического восстановления хлорида золота (III) массой 35 мг с использованием олеиламина (300 мкл) и толуола (25 мл) в качестве растворителя при нагревании до 120°С [96]. В данном случае к раствору добавляли аскорбиновую кислоту (20 мг) после снижения температуры раствора до комнатной. Аскорбиновая кислота выступает в качестве мягкого восстановителя, таким образом, получалась смесь из наночастиц и нанопроволок.

Для дополнительного подтверждения образования наноструктур, после проведения синтеза, были исследованы спектральные характеристики наноструктур в растворе в УФ-видимом диапазоне от 300 до 800 нм. Растворы содержали растворитель (гексан или толуол), олеиламин, наноструктуры. Фоновые растворы содержали растворитель (гексан или толуол) и олеиламин. Из полученного спектра раствора толуола и олеиламина можно сделать вывод о том, что спектры поглощения олеиламина и наноструктур золота не перекрываются (рисунок 10).

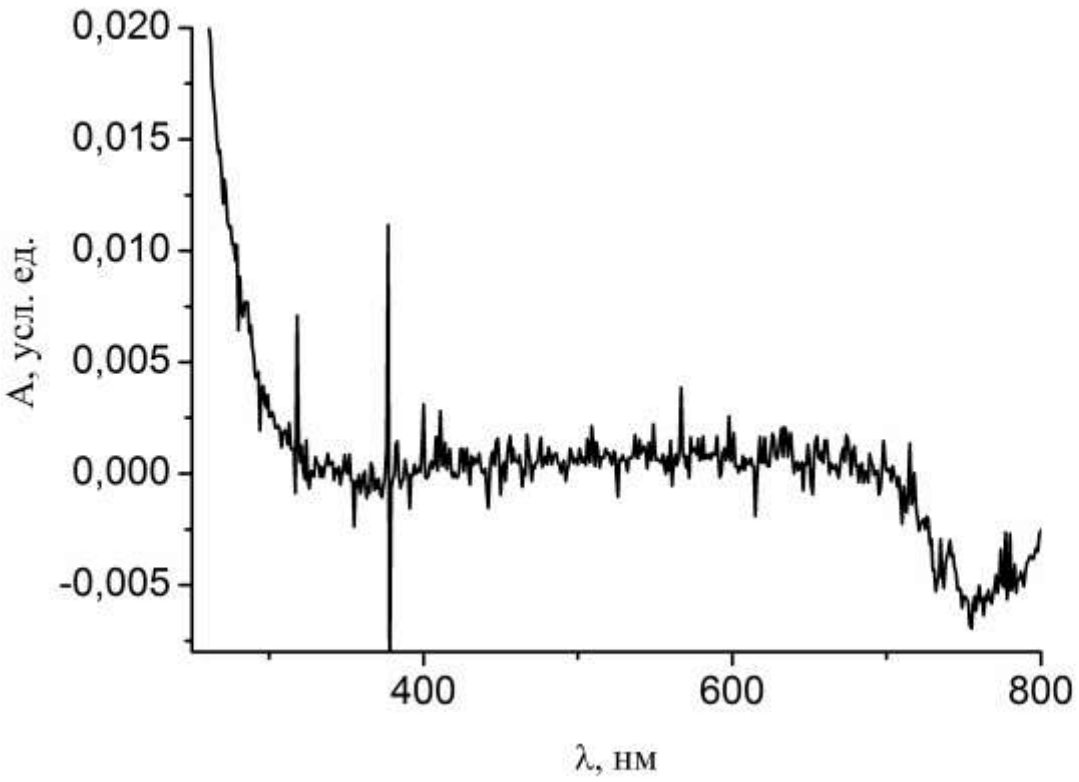


Рисунок 10. Спектр фонового сигнала молекулярного спектра.

Наночастицы золота, диаметром от 10 до 20 нм, поглощают излучение в диапзоне 520-550 нм [146]. Также на спектре наблюдается пик при 300 нм, соответствующий комплексу олеиламина с золотом (I) (рисунок 11).

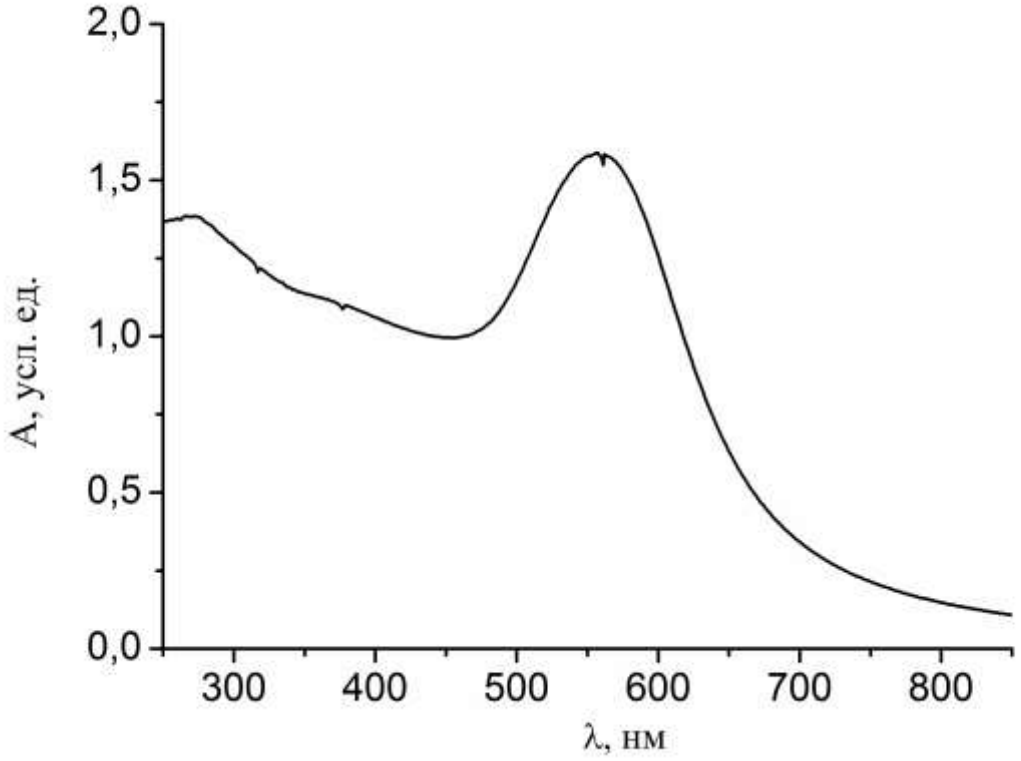


Рисунок 11. Спектр смеси наночастиц и нанопроволок, с преобладанием наночастиц золота (метод с использованием гексана).

Смесь наночастиц и нанопроволок, с преобладанием нанопроволок, поглощает в более длинноволновой области, по сравнению с раствором смеси с преобладанием наночастиц. Это связано с увеличением отношения длины проволок к их ширине [146], чем больше это соотношение, тем в более длинноволновую область сдвигается спектр поглощения. В данном случае это подтверждается спектром, приведенным на рисунке 12.

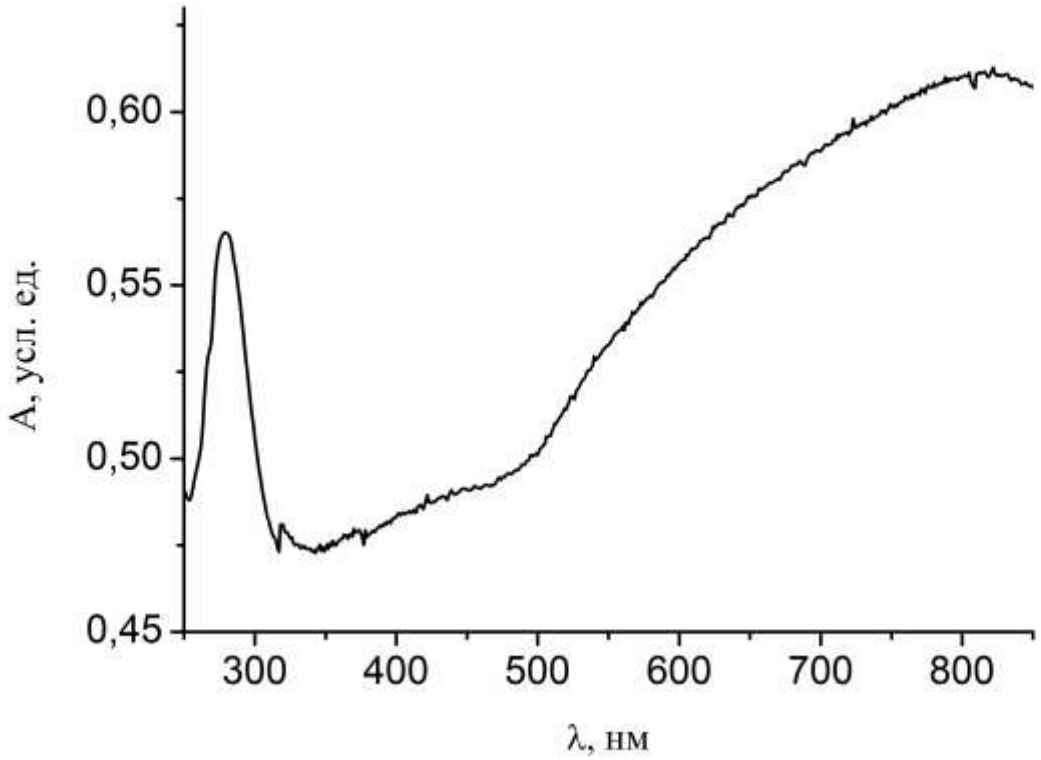


Рисунок 12. Спектр смеси наночастиц и нанопроволок, с преобладанием нанопровлок (метод с использованием толуола).

После исследования растворов наноструктур спектральными методами, было доказано образование смеси наночастиц и нанопроволок различного диаметра.

Для нанесения наноструктур на поверхность золотого электрода использовали два метода: «дроп кастинг» и метод модификации электрода in situ в растворе наноструктур золота. Методом «дроп кастинг» раствор наноструктур золота наносили пипет-дозатором объемом 100 мкл на поверхность золотого электрода и давали высохнуть, такую процедуру повторяли пять раз.

Модификация золотого электрода in situ проводилась путем помещения электродов в раствор наноструктур золота на сутки так, чтобы раствор полностью покрывал электрод, затем электрод отмывали последовательно этанолом, водой и ацетоном и давали высохнуть.

Для проверки эффективности модификации золотых электродов и контроля наноструктурированной поверхности были сделаны микрофотографии на сканирующем электронном микроскопе (SEM) для немодифицированного (рисунок 13) и модифицированных электродов (рисунок 14, 15). Из полученных изображений можно сделать вывод об эффективности применения метода «дроп кастинг» для модификации поверхности наноструктурами синтезированными в растворе гексана, поскольку этот метод модификации показал большую плотность наноструктур на поверхности электрода. Для наноструктур синтезированных в толуоле наиболее подходящим методом модификации поверхности был выбран метод in situ, так как именно в этом случае была получена модифицированная поверхность с большей плотностью наноструктур (рисунках 14а-б).

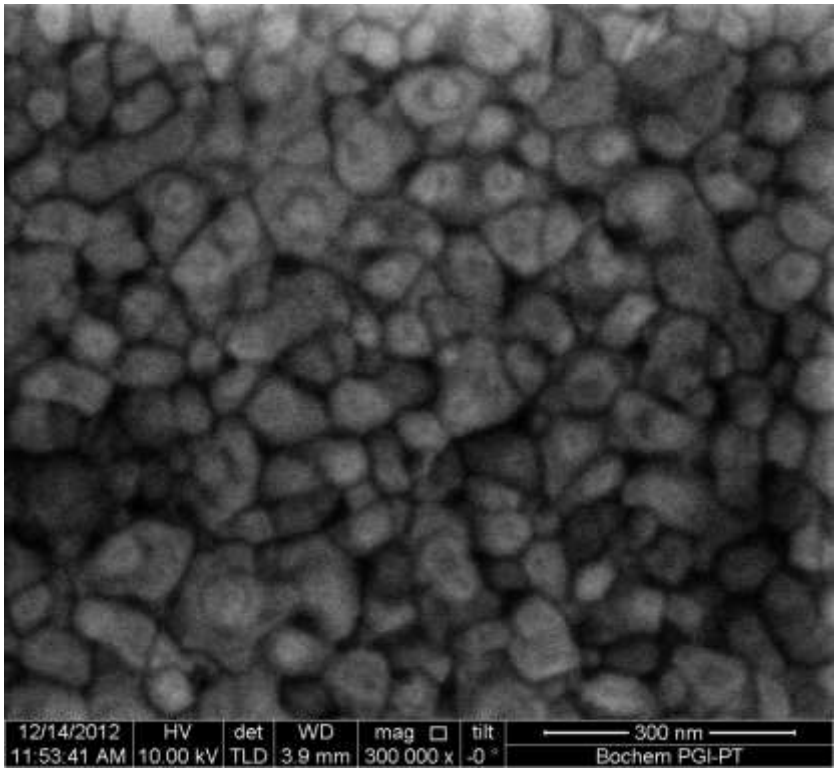


Рисунок 13. Изображение SEM поверхности тонкопленочного золотого электрода.

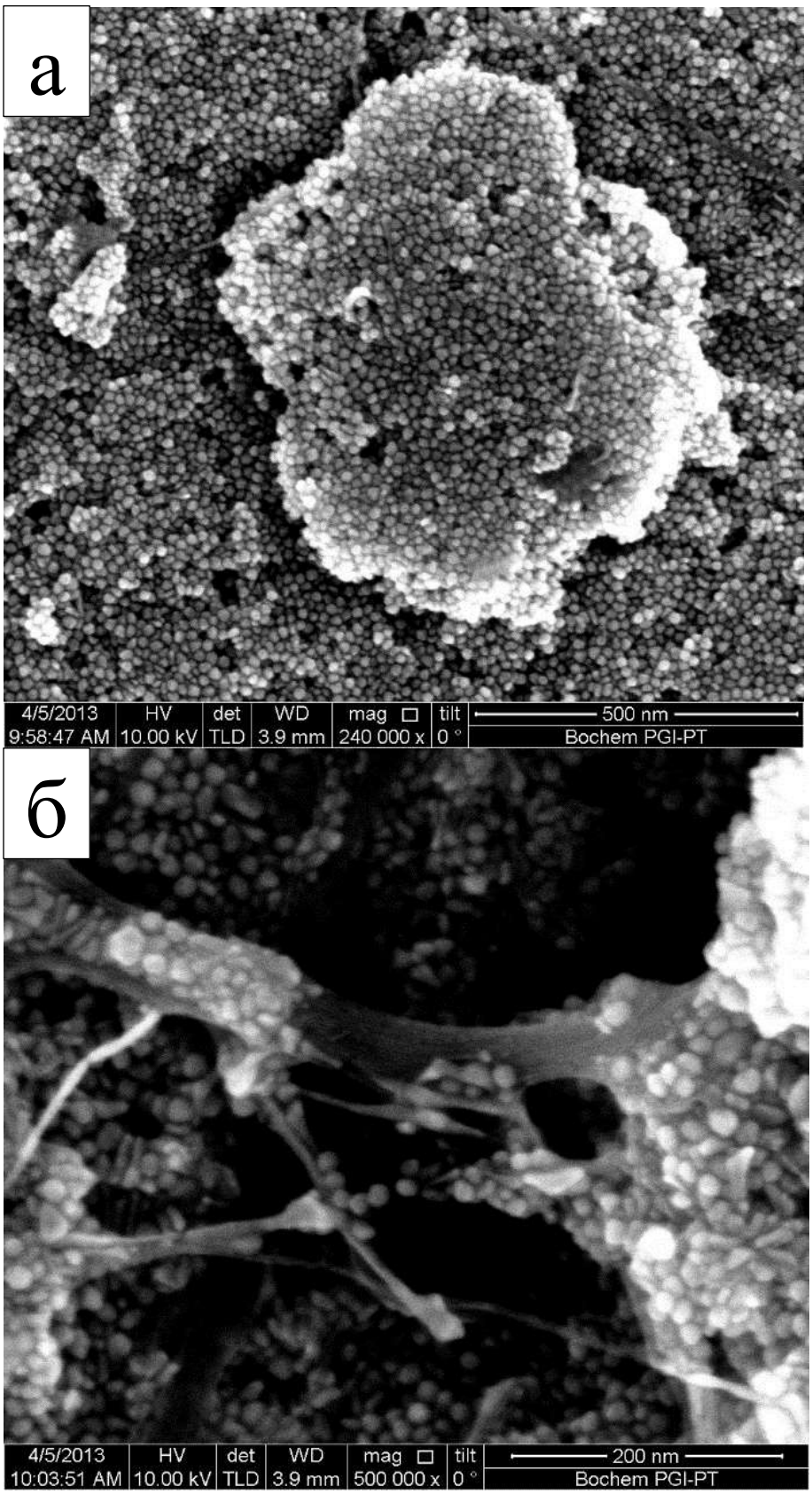


Рисунок 14. Изображение SEM золотого электрода, модифицированного наноструктурами, полученными методом синтеза из раствора толуола и олеиламина (а-б).

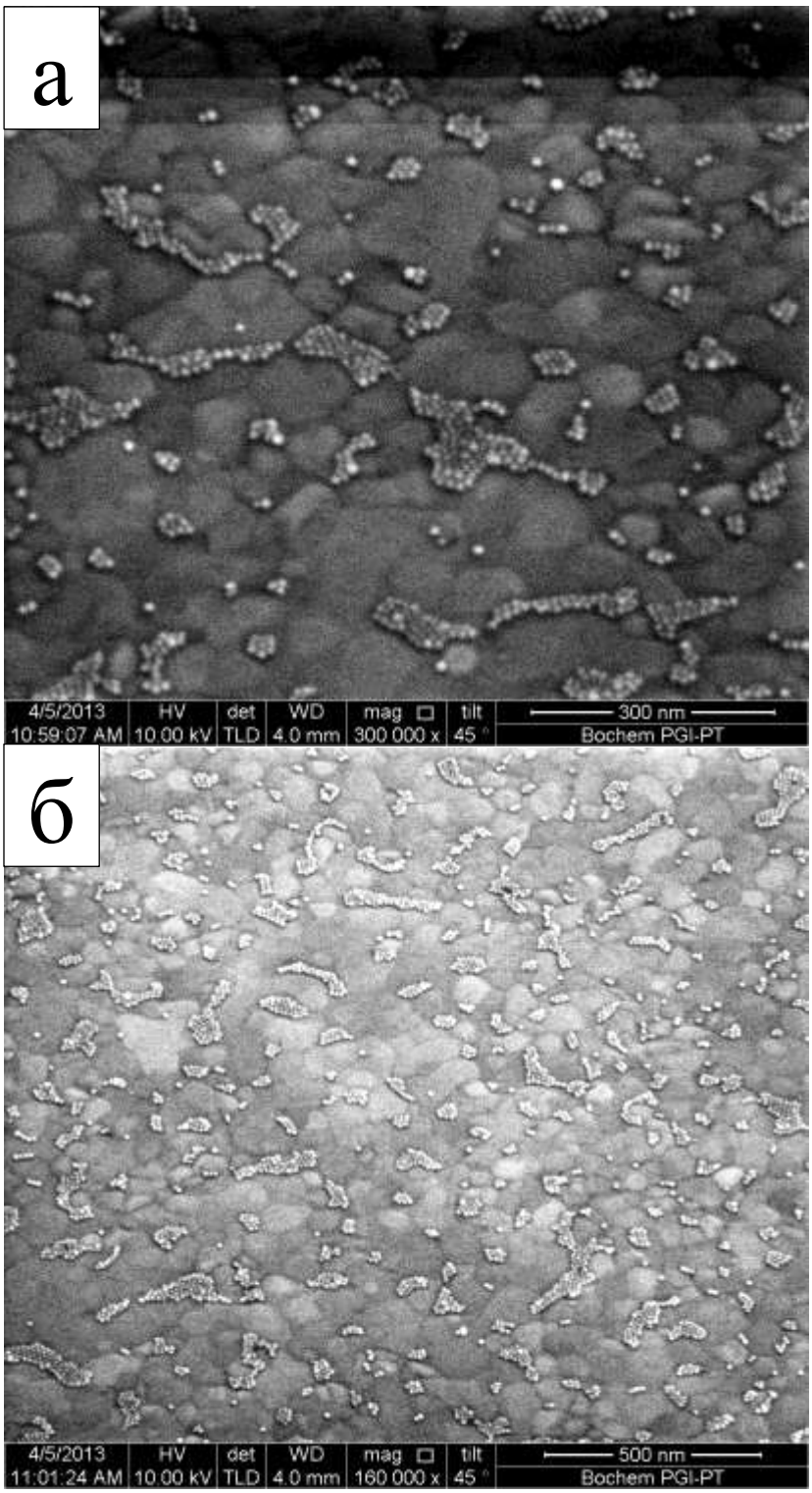


Рисунок 15. Изображение SEM золотого электрода, модифицированного наноструктурами, полученными методом синтеза из раствора гексана и олеиламина (а-б).

Приведенные на рисунках 14-15 микрофотографии подтверждают, что в результате проведенных экспериментов, были получены электроды, модифицированные смесью наночастиц от 10 до 20 нм в диаметре, и нанопроволок, длиной до 1 мкм.

Обработка наноструктур для использования их в электрохимических измерениях заключается в деструкции органической части стабилизирующей оболочки олеиламина. Для этого используют генераторы плазмы кислорода с мощностью 200 Вт.

Для разрушения оболочки органических аминов с поверхности наноструктур используют реагент Меервейна [147, 148] (тетрафторборат триэтилоксония). Как известно, этот реагент взаимодействует с оболочкой органических аминов. В литературе было предложено использовать этот реагент для удаления олеиновой кислоты с поверхности нанокристаллов Fe_3O_4 и сплава PbSe. Нами было предложено использовать реагент Меервейна для удаления олеиламина с поверхности наноструктур золота. Также был предложен следующий механизм взаимодействия реагента Меервейна с олеиламином на поверхности наночастиц золота (рисунок 16).

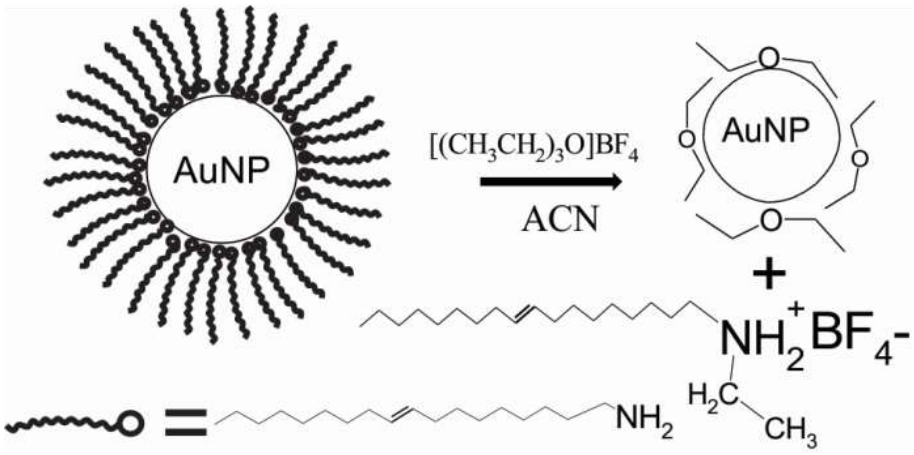


Рисунок 16. Схема реакции реагента Меервейна с органическими молекулами, имеющими концевую аминогруппу.

Этот механизм основан на реакции N-алкилирования олеиламина [149]. Обработка поверхности модифицированного электрода и удаление олеиламина проводилась реагентом Меервейна по следующей схеме. Электроды, модифицированные наночастицами золота, опускали в 0,1М раствор реагента Меервейна в ацетонитриле на 10 минут, затем электроды промывали последовательно ацетонитрилом и этанолом. Для контроля поверхности наноструктурированного электрода были сняты изображения поверхности наноструктурированного электрода с помощью сканирующего электронного микроскопа (рисунки 17а-б).

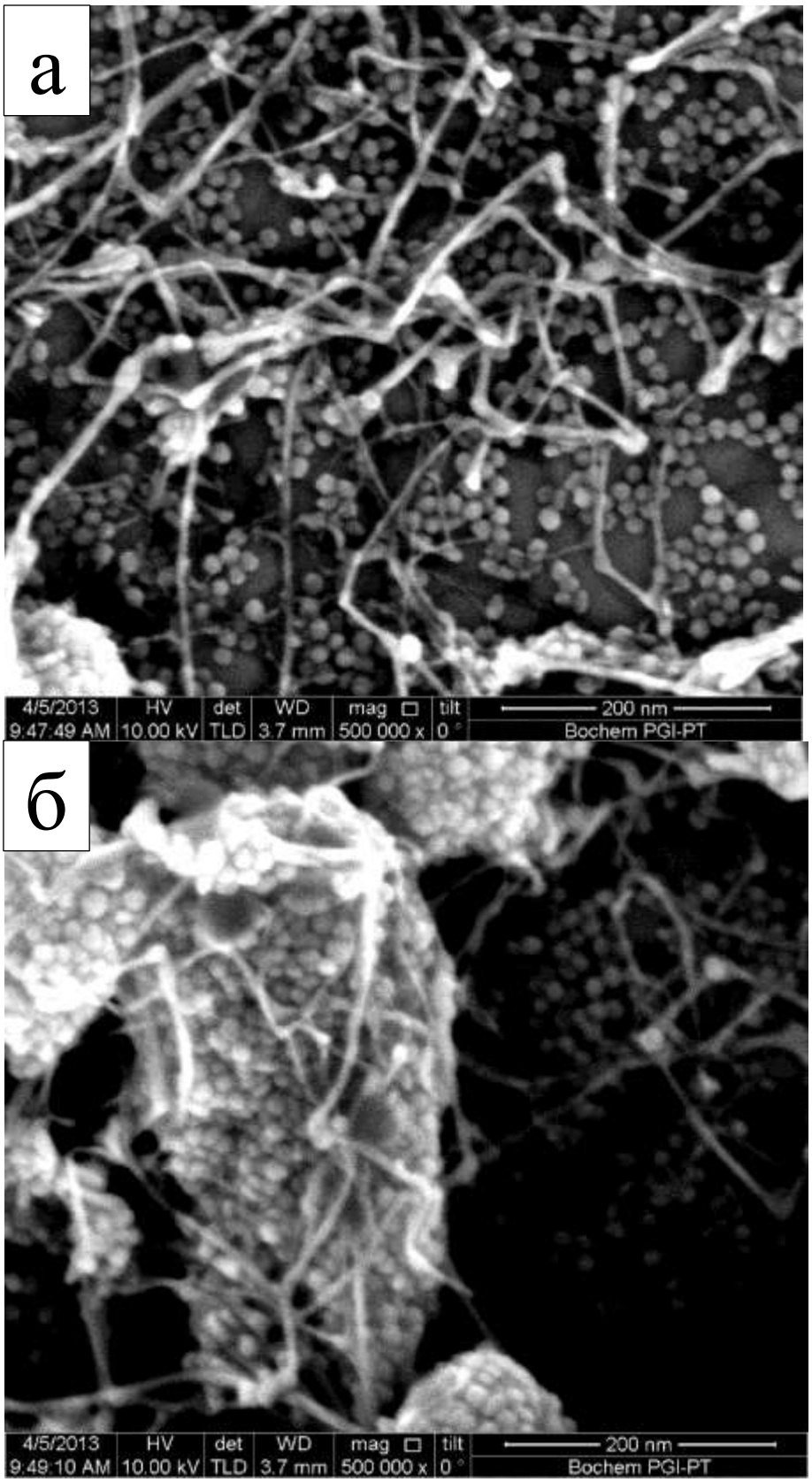


Рисунок 17. Изображение SEM золотого электрода, модифицированного наноструктурами, полученными методом синтеза из толуола и олеиламина после обработки реагентом Меервейна (а-б).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что наноструктуры на поверхности электрода не удаляются с поверхности после обработки реагентом Меервейна. Обработка реагентом Меервейна приводит с одной стороны к их частичной агрегации, а с другой стороны к удалению гидрофобной оболочки, что делает модифицированную поверхность доступной для дальнейшей модификации.

2.2.2. Изготовление электродов для DENA синтеза наноструктурированных ультрамикроэлектродов

Для изготовления электродов был использован метод фотолитографии. В качестве подложки использовалась пластина n-кремния (111) допированная бором (с диаметром 10,16 см), со слоем оксида кремния на поверхности толщиной 1 мкм. Кремниевая пластина перед нанесением фоторезиста осушалась на плитке при температуре 180˚С в течение 20 минут. Далее кремниевая подложка была покрыта 2,5 мл фотоактивного полимера LOR 3B и помещена на прибор для равномерного распределения растворов центрифугированием (спин-коутер) при 3000 об./мин. в течение 35 секунд. Данный полимер наносился с целью задания высоты слоя электродов толщиной 5 мкм. В последующем кремниевую подложку с нанесенным полимером поместили на плитку и нагревали при температуре 150˚С в течение 5 минут. После этого при помощи спин-коутера наносили следующий слой толщиной 2 мкм фотоактивного полимера AZ nLOF 2020 (из объема раного 2,5 мл) при 3000 об./мин. в течение 35 секунд. Данный фотоактивный полимер был использован для точного задания ширины электродов (рисунок 18а). Следующим этапом было предварительное «запекание» слоев полимера при 115˚С в течение 1,5 минут. «Проявление» подложки с нанесенными слоями полимеров проводили в течение 1,4 секунд воздействием УФ лампы мощностью 325 Вт. Для этого применяли заранее изготовленную стеклянную «маску», на которую предварительно был нанесен слой хрома, задающий геометрические параметры электродов. Так как был использован положительный фотоактивный полимер, который при воздействии света определенной длины

волны отвердевает, то «маска» имела хромовое покрытие лишь по внутреннему контуру электродов. Далее кремниевую подложку нагревали на плитке до 115˚С в течение 1 минуты и растворяли полимер в AZ® 326 (MIF, 2,38% TMAH водный раствор). Под воздействием AZ® 326 необлученная часть фотоактивного полимера растворяется, таким образом, задавая углубления в слое полимера для дальнейшего нанесения слоя металла. Кремниевая подложка, с заданной при помощи полимеров структурой электродов, была последовательно покрыта слоем Ti толщиной 10 нм и слоем Au толщиной 100 нм (рисунок 18а). Напыление слоя титана проводилось для улучшения адгезии золота к поверхности оксида кремния. Покрытие проводилось машиной для нанесения тонких пленок. После напыления металлов, лишнее количество золота и все слои полимеров были удалены при помощи ацетона. Схематические изображения конечной геометрии электродов и их расположение на чипе размером 13×13 мм приведены на рисунке 18в.

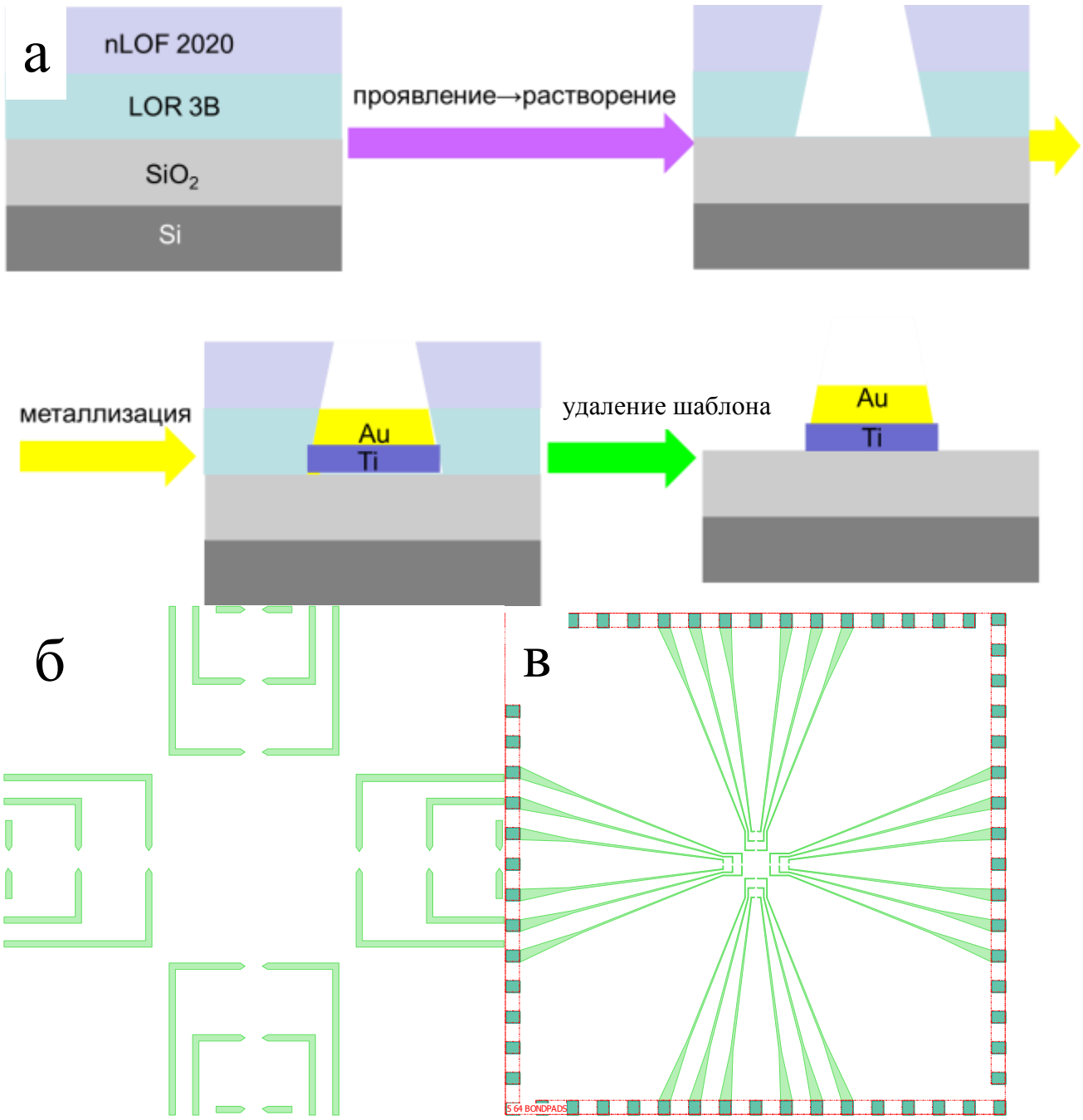


Рисунок 18. Схематическое изображение процесса изготовления электродов (а) и расположение электродов для синтеза на чипе размером 13×13 мм (б,в).

2.2.3. Синтез наноструктурированных УМЭ методом направленного электрохимического осаждения

Направленнный электрохимический синтез наноструктурированных УМЭ на электродах описанных выше проводился следующим образом. Электроды попарно подключались к высокочастотному генератору постоянного и переменного напряжения Agilent Trueform Series Waveform Generator (33600 Series, Higher Frequency Model). Один из электродов при этом служит источником напряжения, а другой – электродом стока. Переменное напряжение высокой частоты генерировали в виде прямоугольной модуляции напряжения. Постоянное напряжение модулировалось путем сдвига развертки по оси напряжений на определенную величину. Прямоугольная модуляция напряжения была выбрана в связи с тем, что в случае синусоидальной модуляции рост наноструктур не наблюдается. Также была выбрана максимальная частота 50 МГц, так как при больших частотах прямоугольная развертка принимает вид синусоидальной, что объясняется возникновением паразитной емкости.

Для получения развитой наноструктурированной поверхности рабочего электрода была изменена конструкция подложки (чип Si/SiO2, 13×13 см) и диаметр контактных линий (20 мкм) по сравнению с конструкциями, предложенными ранее для микроэлектроники. Расстояние между контактами варьировалось от 2 до 50 мкм. Такая модификация привела к увеличению сопротивления между контактами. Поэтому для проведения процесса электроосаждения металлов и их сплавов был проведен выбор параметров методики DENA. Переменное напряжение варьировали в диапазоне от 13 до 18,5 В. Величину постоянного напряжения изменяли от 1,0 до 3,25 В. Частота переменного напряжения варьировалась от 35 до 50 МГц для уменьшения диаметра УМЭ. Выбор параметров электроосаждения из вышеуказанных диапазонов позволил синтезировать УМЭ с развитой наноструктурированной поверхностью. Схема установки для проведения направленнго синтеза наноструктурированных УМЭ приведена на рисунке 19б.

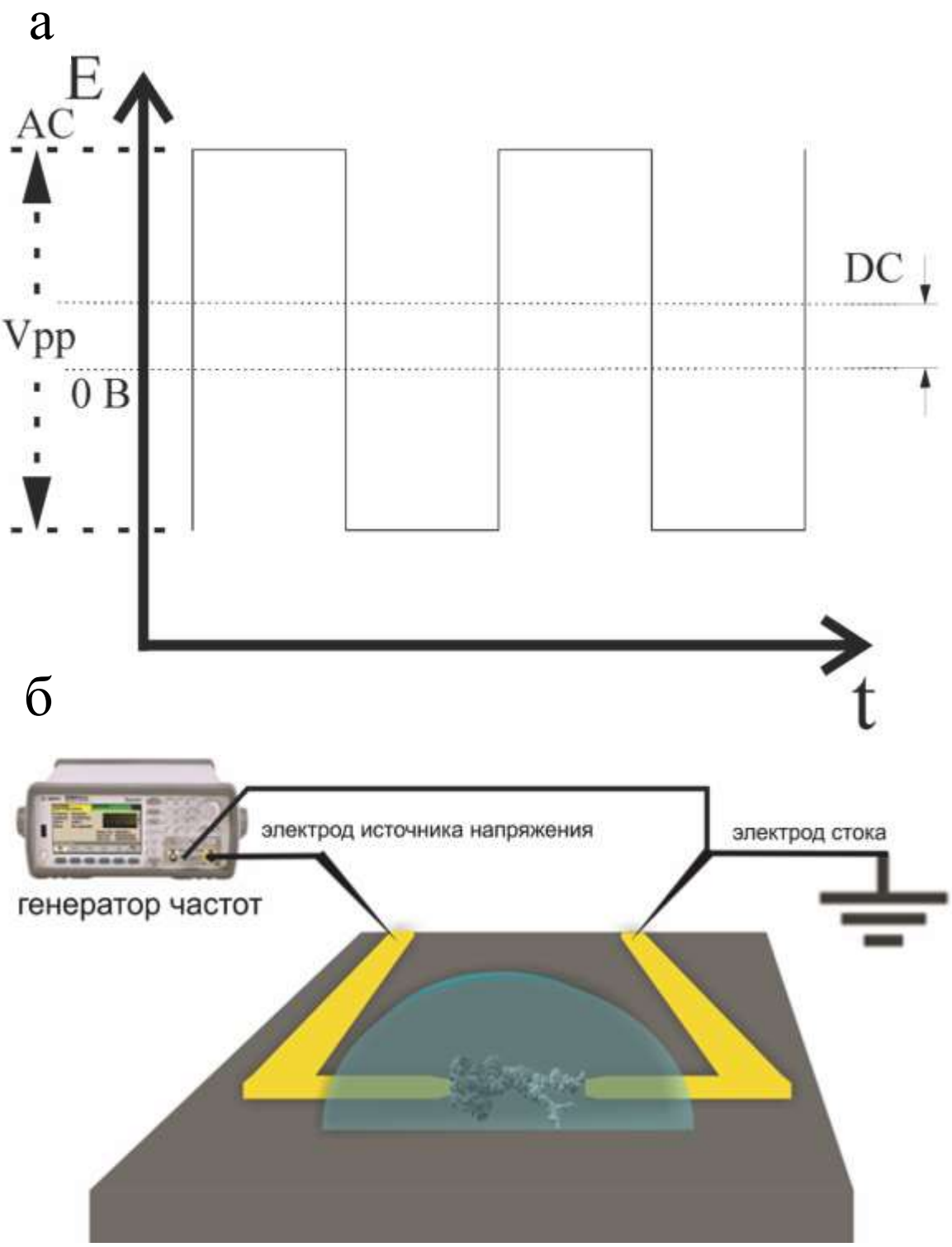


Рисунок 19. Схематическое изображение наложения сигнала при электроосаждении (а) и схема установки для направленного электрохимического синтеза наноструктурированных УМЭ (б).

Поскольку эти два металла биосовместимы, то можно ожидать, что и их сплав будет обладать аналогичным свойством, также эти металлы образуют твердый раствор. Сплав Pd-Au также может существенно улучшить

аналитические характеристики сенсора на его основе: снизить потенциалы детектирования аналитов и увеличить чувствительность бесферментных сенсоров. Поэтому для стабильной работы сенсора в биологических средах был выбран сплав Pd-Au. Дальнейшие исследования были направлены на получение электродов из этих металлов и их сплавов. Предварительно был проведен выбор параметров синтеза наноструктурированных УМЭ для Pd, Au и сплава Pd-Au. Использованные параметры для синтеза представлены в таблице 5.

*Таблица 5. Использованные параметры направленнного электрохимическго синтеза наноструктурированных УМЭ (*PBS – фосфатный буферный раствор).*

металл/сплав	AC напряжение	DC напряжение	частота	состав раствора
Pd	17 В	1,5 В	45 МГц	10^{-2} М K_2PdCl_4 водн.р-р
Pd	17 В	1,5 В	38 МГц	10^{-2} М $PdCl_2$ в PBS* (pH 8)
Au	18 В	1,0 В	45 МГц	10^{-2} М $HAuCl_4$ водн. р-р
Pd/Au	17 В	1,5 В	38 МГц	$5\cdot10^{-3}$ М $HAuCl_4$; $5\cdot10^{-3}$ $PdCl_2$ в PBS* (pH 8)

Для синтеза сплава были выбраны такие минимальные параметры, которые удовлетворяли бы росту наноструктурированных УМЭ каждого отдельного металла. Так, например при частоте 45 МГц невозможно осаждение палладия из раствора в фосфатном буфере. Процесс электроосаждения длится до 10 секунд. При выборе соли палладия руководствовались тем, что осаждение из раствора тетрахлоропалладата (II) калия проходило значительно медленнее, чем из

раствора хлорида палладия (II) в фосфатном буферном растворе. Это объясняется тем, что восстановление из раствора, приготовленного на фосфатном буфере, происходит легче, чем из комплексной соли палладия, константа устойчивости которой достаточно высока ($lg\beta_1$=6,1). Для синтеза наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au использовали эквимолярные соотношения Pd и Au. Электроосаждение проходило из раствора объемом 5 мкл. Скважность импульсов составляла 50%. Постояннотоковое напряжение было установлено экспериментально, для каждого металла отдельно, в соответствии с теоретическими значениями потенциалов восстановления этих металлов (плюс 0,987 В для Pd, плюс 1,5 В для Au). В случае осаждения сплава Pd-Au постояннотоковое напряжение было приложено исходя из большего значения потенциала для индивидуального металла. Постояннотоковое напряжение (DC) модулировалось в области положительных значений потенциалов путем сдвига осцилляций переменного напряжения (AC). При такой модуляции напряжения рост наноструктурированных УМЭ наблюдался со стороны электрода стока и был воспроизводим от эксперимента к эксперименту. В отсутствие приложенного постоянного напряжения рост наноструктурированных УМЭ был либо случайным, либо требовалось много больше времени для инициирования роста. Процесс роста наблюдался при помощи оптического микроскопа до момента закрепления наноструктурированного УМЭ на противоположном электроде.

После проведения синтеза чип с наноструктурированными УМЭ отмывали несколько раз в дистиллированной воде, сушили, и затем исследовали поверхность методом сканирующей электронной микроскопии, элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, измерение электропроводности полученных наноструктурированных УМЭ.

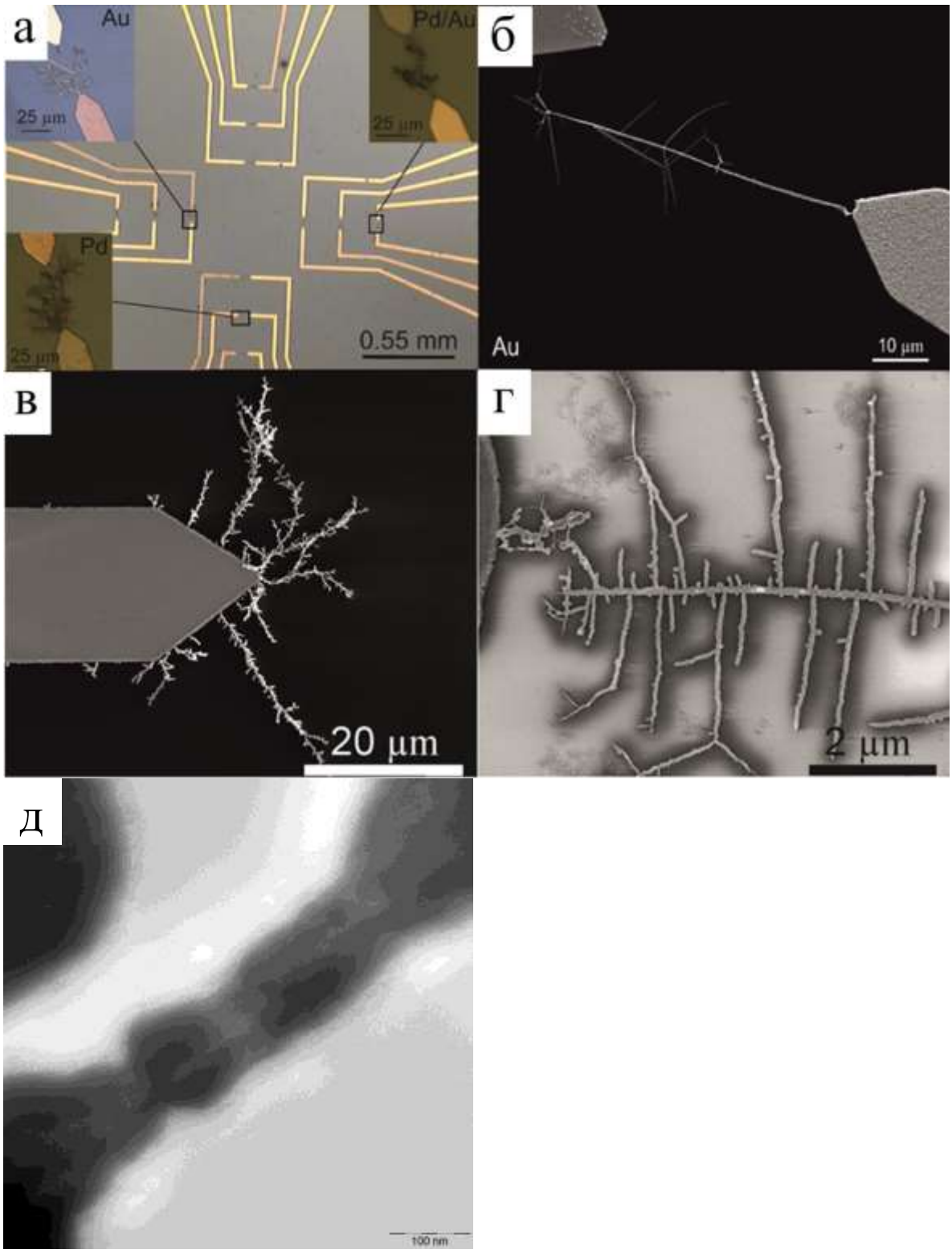


Рисунок 20. Оптическая микрофотография чипа с синтезированными наноструктурированными УМЭ (а) и SEM-изображения направленно выращенных наноструктурированных УМЭ Au (б) Pd (в) и Pd-Au (г) ПЭМ-изображения среза наноструктурированных УМЭ Pd-Au (д).

На рисунке 20а показан снимок, полученный на оптическом микроскопе, центральной части чипа с электродами для синтеза и направленно выращенными наноструктурированными УМЭ Pd, Au и Pd-Au. Также на рисунке 20 приведены микрофотографии электродов для синтеза нанопроволок и самих наноструктурированных УМЭ Pd, Au и Pd-Au. В результате были получены структуры сплава Pd-Au с фиксированной длиной 50 мкм, что обусловлено расстоянием между электродами для синтеза, и диаметром от 50 до 900 нм. Анализ ПЭМ-изображения (рисунок 20д) показал наличие наноразмерных частиц на поверхности синтезированного УМЭ. Синтезированные ультрамикроструктуры имеют разветвленную и наноструктурированную поликристаллическую поверхность, таким образом полученные электроды являются наноструктурированными.

2.3. Иммобилизация глюкозоксидазы на поверхности электрода

Для создания вольтамперометрических сенсоров поверхность электродов модифицировали наноструктурами золота. Затем иммобилизовали глюкозоксидазу для создания биосенсора для определения глюкозы. Для иммобилизации глюкозоксидазы использовали метод самоорганизующихся монослоев цистеамина на поверхности золота, за счет специфической сорбции тиольных групп. Такой выбор объясняется специфической сорбцией тиолов на поверхности золота. Кроме того, тиолы обеспечивают дальнейшее равномерное распределение молекул фермента на поверхности электрода и предотвращают связывание его активных центров друг с другом и с кросс-линкером.

В качестве тиола для иммобилизации был выбран цистеамин, поскольку это один из короткоцепочечных тиолов, что обеспечивает более низкое сопротивлеение переноса заряда к электроду в процессе электрохимических измерений. Наличие аминогруппы у цистеамина позволяет проводить дальнейшую ковалентную сшивку с ферментом (глюкозоксидазой). Иммобилизацию тиолов проводили на поверхности тонкопленочного золотого

электрода и модифицированных наноструктурами золота электродов. Навески 1,9 мг, для получения растворов цистеамина с концентрацией 5мМ, растворяли в 5 мл этанола или гексана, и оставляли на 2 часа при комнатной температуре. Затем электроды промывали сначала этанолом или гексаном, а затем фосфатным буферным раствором.

Перед иммобилизацией глюкозоксидазы на поверхность монослоя цистеамина был нанесен кросс-линкер – глутаровый альдегид, для ковалентной сшивки молекул фермента с поверхностью электрода через слой цистеамина.

Иммобилизацию глюкозоксидазы проводили на поверхности тонкопленочного золотого электрода или модифицированного золотого электрода. На первом этапе иммобилизовали глутаровый альдегид из 2,5% раствора, для этого аликвоту 250 мкл 50% водного раствора глутарового альдегида вносят в 5 мл 0,1М фосфатного буферного раствора (pH 7), и помещали в полученный раствор золотые электроды на 1-2 ч при температуре 25°С, затем промывали электроды 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 7). На втором этапе электроды помещали в раствор гюкозооксидазы с концентрацией 12-13 мг/мл и оставляли на 2 ч при температуре 25°С, а потом еще на 12 часов в при температуре 4°С, в конце электроды промывали 0,1М фосфатным буферным раствором (pH 7). Таким образом, был получен вольтамперометрический сенсор для определения глюкозы на основе электродов, модифицированных наноструктурами золота. На рисунке 21 приведена графическая схема модифицированного электрода.

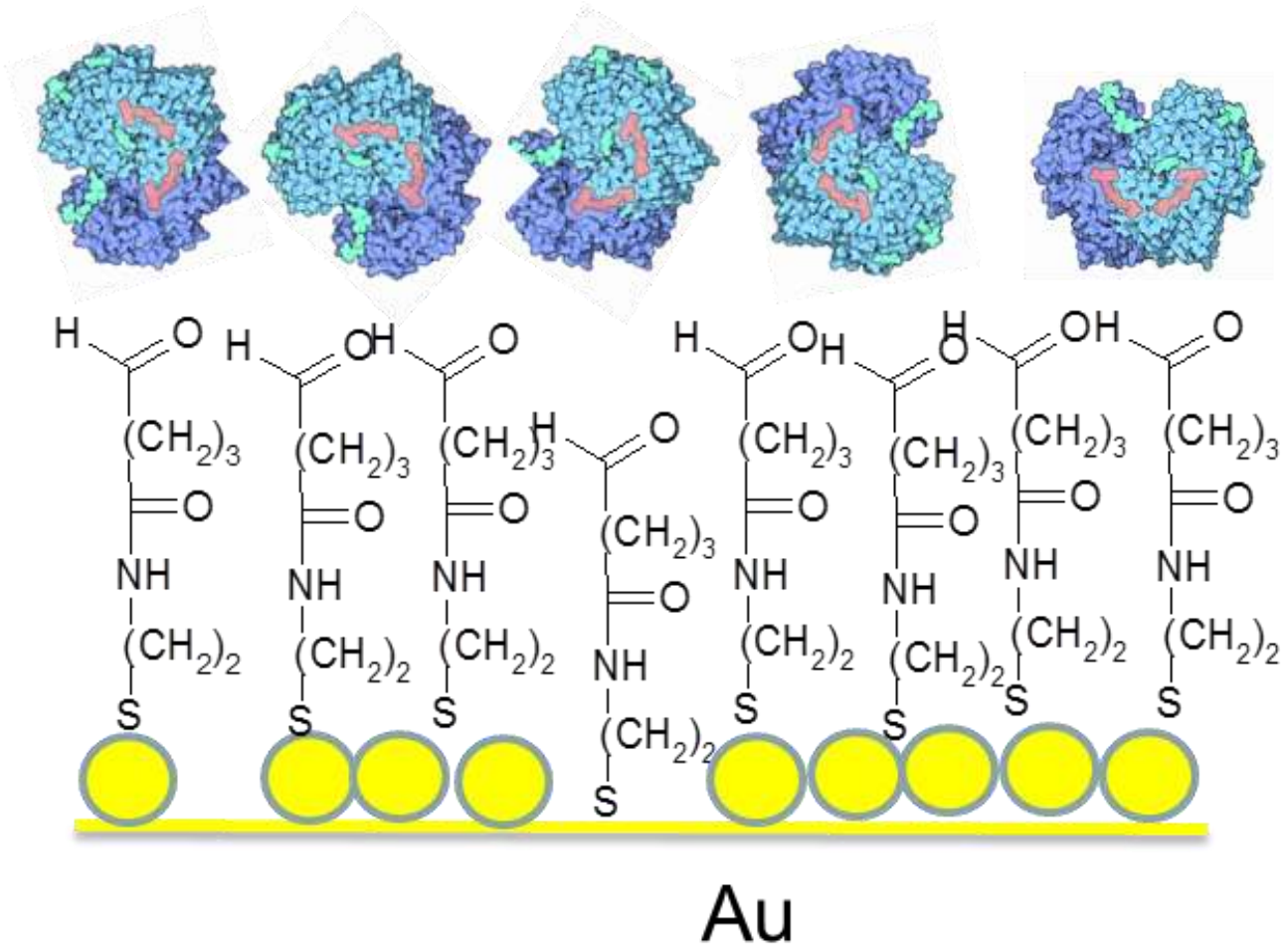


Рисунок 21. Схематическое изображение структуры модифицированного электрода глюкозоксидазой с использованием самоорганизующихся слоев и метода ковалентной сшивки.

2.4. Изоляция металлических контактов

Для постановки электрохимического эксперимента с наноструктурированными УМЭ синтезированными методом направленного электрохимического синтеза требуется изоляция контактной части внешней цепи, которая служила для приложения напряжения при синтезе наноструктурированных УМЭ. Для нанесения изоляции использовали метод фотолитографии. Выбор полимера для изоляции контактной части проводили исходя из требования к его химической стойкости в широком интервале pH, а также низкой температуре затвердевания. Низкая температура затвердевания

полимера требуется для того, чтобы структура наноструктурированных УМЭ при нагревании не разрушилась и их поверхность не деформировалась. В качестве полимера для изоляции контактной части были выбраны два фотоотвердевающих полимера: SU-8-2005 (эпоксидная смола) и HD-8820 (полиимид).

Температура запекания HD-8820 достаточно низкая (120°C), что удовлетворяет требованию к температуре затвердевания изолирующего полимера. Однако интервал химической стойкости полиимида находится в области нейтральных значений pH. Поэтому данный полимер использовали исключительно для изоляции контактной части чипа для электрохимических измерений в нейтральной среде. Для улучшения адгезии полимера к поверхности подложки оксида кремния использовали VM-652 (α-аминопропилтриэтоксисилан). VM-652 объемом 2,5 мл наносили на четырехдюймовую подложку с синтезированными наноструктурированными УМЭ и в течение 35 секунд равномерно распределяли на спин-коутере со скоростью 5000 оборотов в минуту. Затем подложку покрывали 2,5 мл HD-8820 при 4000 об./мин. в течение 60 секунд и проводили предварительное отверждение полимера при 100°C в течении 8 минут. Проявляли каналы для открытия наноструктурированных УМЭ при 325 Вт в течение 5 секунд. Растворяли полимер из каналов при помощи AZ 326 (MIF, 2.38% TMAH водный раствор) в течение 2,5 минут, растворение останавливали изопропанолом, а затем окончательно отверждали полимер при 120°C в течение 4 минут. Таким образом, получали закрытые контактные линии и открытые наноструктурированные УМЭ в каналах шириной 20 и 50 мкм (±1 мкм) и высотой 5 мкм.

SU-8-2005 представляет собой раствор эпоксидной смолы в циклопентаноне, молекула этой смолы имеет 8 эпоксидных групп. Интервал химической устойчивости этого эпоксидного полимера достаточно широк и включает в себя сильнокислые и сильнощелочные среды, а также окислители в небольших концентрациях. Использование такого полимера ограничивает высокая температура его запекания (150°C). Поэтому в качестве изолятора

контактной части его использовали только при электрохимических измерениях в 0,1 М серной кислоте. Полимер объемом 2,5 мл наносили на подложку и распределяли при 2000 оборотах в минуту, в течение 1 минуты. Предварительно запекали 2 минуты при 65°С и 5 минут при 95°С. Проявляли полимер при 325 Вт в течении 11 секунд. Далее проводили отверждение полимера в течение 1 минуты при 95°С. Полимер, из образовавшихся каналов, растворяли при помощи AZ 326 (MIF, 2.38% TMAH водный раствор) в течение 1 минуты, растворение останавливали изопропанолом. Окончательно отверждение полимера выполняли при 150°С на протяжении 1 минуты. Ширина открытых каналов с наноструктурированными УМЭ составила 20 и 50 мкм (±1 мкм), а высота 5 мкм (рисунок 22).

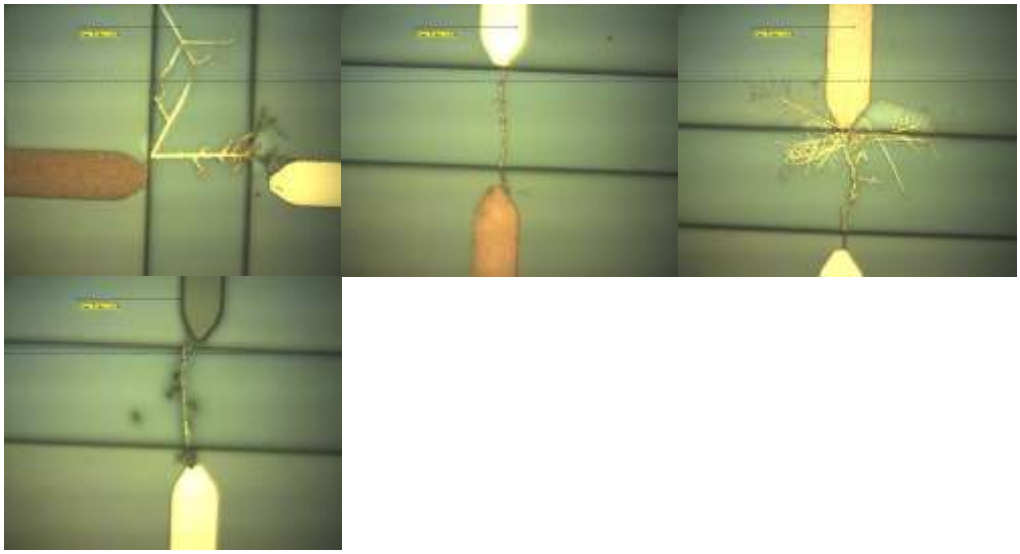


Рисунок 22. Изображения наноструктурированных УМЭ на чипе с изолированными контактными линиями, полученные на оптическом микроскопе.

2.5. Способы задания концентраций и техника электрохимических измерений

Для задания концентраций глюкозы и пероксида водорода использовали метод стандартных добавок. Кроме того, были выбраны потенциалы детектирования для этих аналитов и фоновые растворы, удовлетворяющие требованиям к

измерениям в биологических жидкостях, т.е. нетоксичны и близки по составу к соответствующим жидкостям.

2.5.1. Ячейки для электрохимических измерений глюкозы

Все модельные растворы для электрохимических измерений готовили перед каждым измерением. Концентрацию глюкозы в электрохимической ячейке задавали методом стандартных добавок из растворов, приготовленных по точной навеске.

Все электрохимические измерения на тонкопленочном электроде, модифицированном наноструктурами золота, синтезированными химическим методом, проводили в ячейке, приведенной на рисунках 23а-г. Для выбора медиатора переноса электронов использовали ячейку объемом 20 мл.

Определение глюкозы проводили на тонкопленочном электроде, модифицированном наноструктурами золота (химически синтезированными) и глюкозоксидазой. Электрохимическое определение глюкозы выполняли в ячейке изображенной на рисунке 23в. Объем ячейки составлял 1 мл.

Перед измерениями все растворы глюкозы и фоновый раствор в ячейке продували аргоном в течение 5-15 минут в зависимости от объема ячейки для удаления кислорода из раствора. Объем добавок выбирали таким образом, чтобы увеличение общего объема раствора было незначительным (не превышало 2%).

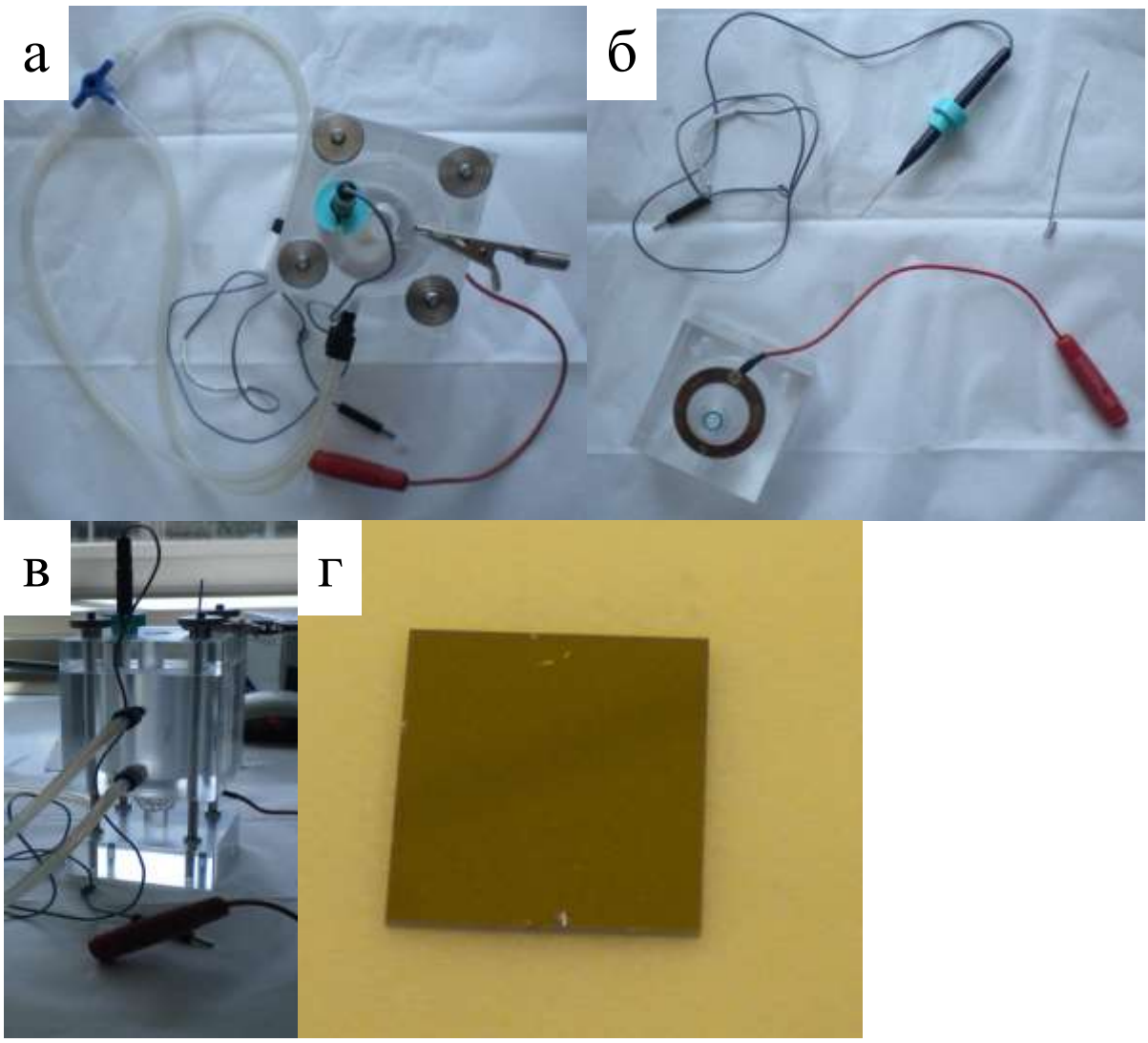


Рисунок 23. Электрохимическая ячейка (а-в), вид рабочего электрода (г) для электрохимических измерений.

2.5.2. Электрохимические ячейки для электрохимических измерений на электродах синтезированных DENA-методом

Наноструктурированные ультрамикроэлектроды (УМЭ) Au, Pd и сплава Pd-Au были использованы для электрохимических измерений в растворе в ячейках, приведенных на рисунке 24. Ячейки для измерений на электрохимически синтезированных наноструктурированных УМЭ конструировались из стеклянных трубок диаметром 9 мм, высотой 10 мм и толщиной стенок 2 мм. Стеклянные трубки крепились к поверхности чипа клеящим составом из смеси эпоксидных смол, обладающих химической стойкостью к сильнокислым и сильнощелочным

средам, а также к окислителям. Объем раствора в ячейке для измерений методом циклической вольтамперометрии составлял 250 мкл. Амперометрическое определение пероксида водорода в вышеуказанных ячейках выполняли в растворе объемом 100 мкл. Все растворы продували аргоном высокой чистоты в течение 5 минут (в случае растворов для добавок) и 1 минуты (в случае продувки фонового раствора). Для удаления кислорода из раствора в ячейке, продували аргоном высокой чистоты с использованием капилляра для ВЭЖХ с внутренним диаметром 1 мм в течение всего эксперимента.

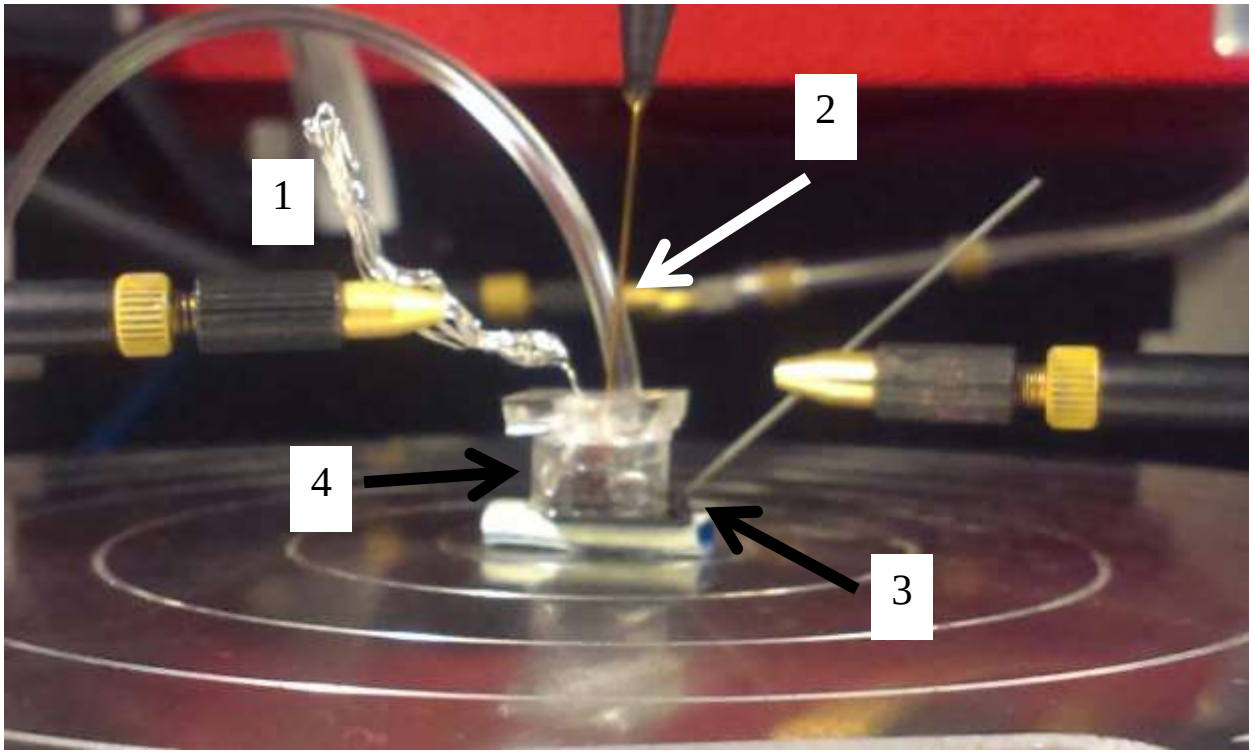


Рисунок 24. Вид электрохимической ячейки для измерений с использованием синтезированных методом направленного электрохимического синтеза (DENA) наноструктурированных УМЭ, в качестве рабочих. 1 – Pt вспомогательный электрод, 2 –капилляр с электродом сравнения (Ag/AgCl), 3 – чип с рабочим электродом (наноструктурированным УМЭ), 4 – стеклянная ячейка для электрохимических измерений.

3. Результаты эксперимента и их обсуждение

Было проведено изучение поверхности наноструктурированных электродов электрохимическими и спектральными методами анализа.

3.1. Определение эффективной площади поверхности наноструктур, полученных олеиламиновым методом

Для определения эффективной площади поверхности электродов, модифицированных наноструктурами золота, полученными олеиламиновым методом, использовали циклическую вольтамперометрию и спектроскопию электрохимического импеданса. Эти методы измерения эффективной площади поверхности электродов основаны на количественном определении, исходя из данных плотности заряда золота на поверхности электрода (циклическая вольтамперометрия), и изменении эффективной площади поверхности по результатам измерения емкости ДЭС.

3.1.1. Исследование изменения эффективной площади поверхности электродов модифицированных наночастицами золота

Одним из методов для оценки увеличения эффективной площади поверхности золотого электрода является расчет площади электрода по пику восстановления золота (I) из циклической вольтамперограммы, полученному в ходе генерации на поверхности электрода оксидов золота (I) в растворе 0,1 М серной кислоты. По методике [150], по циклическим вольтамперограммам, изучалось изменение эффективной площади поверхности в 0,1 М растворе серной кислоты (см. рисунки 25, 26).

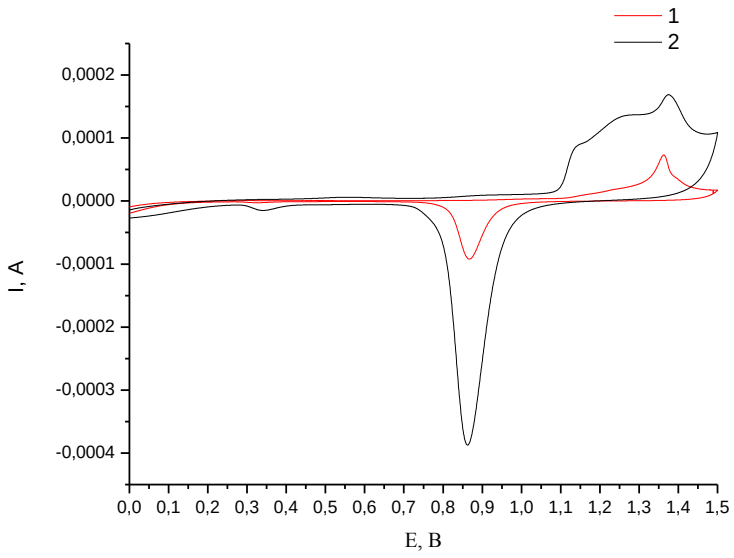


Рисунок 25. Циклическая вольтамперограмма, снятая в растворе 0,1М серной кислоты, для немодифицированного золотого электрода (1) и золотого электрода, модифицированного наноструктурами и обработанного реагентом Меервейна (2).

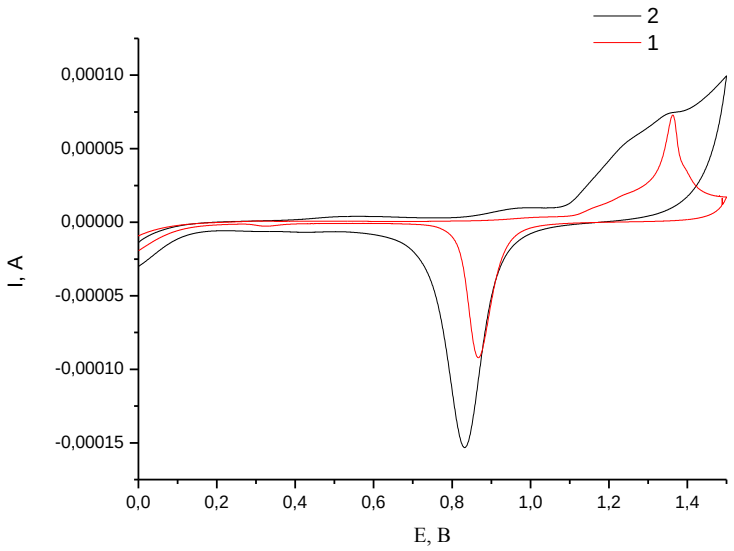


Рисунок 26. Циклическая вольтамперограмма, снятая в растворе 0,1М серной кислоты, для немодифицированного золотого электрода (1) и золотого электрода, модифицированного наноструктурами (2).

Для этого из циклической вольтамперограммы (см. рисунки 25-26) по формуле 2 рассчитали площадь восстановительного пика золота из оксидной формы на катодной ветви (*A*), при скорости развертки (ν) 50 мВ/с, с учетом плотности заряда на поверхности золотого электрода равной 482 мкКл/см^2.

$$Г = \frac{A}{\nu \cdot 482 \, мкКл/см^2} \quad (2)$$

где Г – эффективная площадь поверхности электрода;

A – площадь пика на циклической вольтампрограмме (А·мВ);

ν – скорость развертки (мВ/с);

482 мкКл/см^2 – плотность заряда на поверхности золотого электрода.

Были рассчитаны эффективные площади электродов для тонкопленочного золотого электрода, золотого электрода, модифицированного наноструктурами без обработки и с обработкой реагентом Меервейна (см. таблицу 6).

Таблица 6. Результаты измерения эффективной площади поверхности немодифицированного и модифицированных электродов.

наименование электрода	Г, см^2
тонкопленочный Au электрод	0,288
Au электрод с наноструктурами	0,858
Au электрод с наноструктурами после обработки реагентом Меервейна	1,423

Результаты расчета эффективной площади поверхности электродов свидетельствуют о её увеличении в случае золотого, модифицированного наноструктурами, электрода по сравнению с площадью немодифицированного

электрода более чем в два раза, а для модифицированного электрода, обработанного реагентом Меервейна более чем в три раза.

Электроды, модифицированные наноструктурами золота из раствора толуола и олеиламина, продемонстрировали большую устойчивость в растворе 0,1 М серной кислоты, по сравнению с электродами, синтезированными из раствора гексана и олеиламина (рисунок 27). Поэтому для дальнейших исследований использовали наноструктуры золота, которые были химически синтезированы, при нагревании, из раствора толуола и олеиламина.

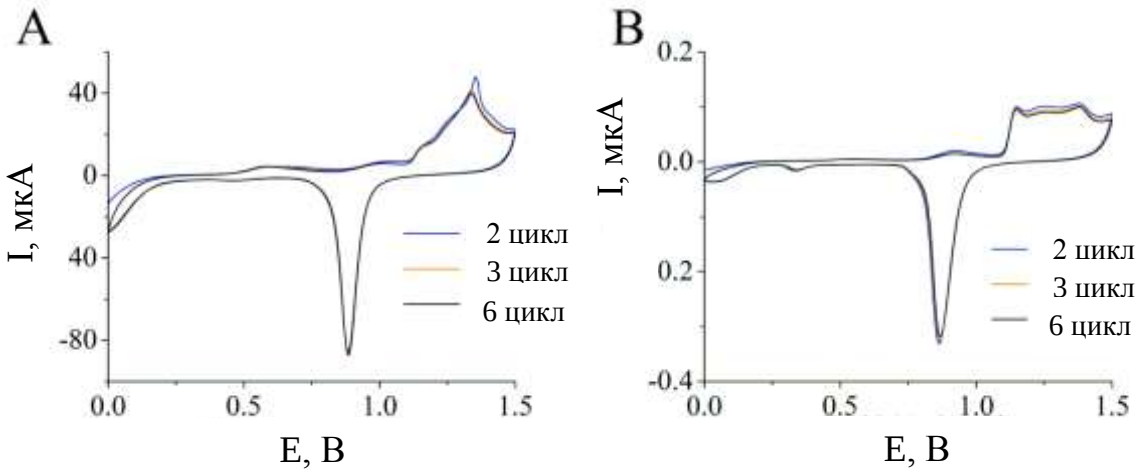


Рисунок 27. Циклические вольтамперограммы для электродов, модифицированных наноструктурами золота, синтезированных из раствора толуола и олеиламина (а) и из раствора гексана и олеиламина (б).

После электрохимических измерений в растворе 0,1 М серной кислоты, было проведено исследование поверхности модифицированных электродов на сканирующем электронном микроскопе и установлено, что наноструктурированная поверхность не изменилась в течение измерений (рисунок 28), что говорит об устойчивости химически синтезированных наноструктур золота на поверхности электродов в растворах при проведении электрохимических измерений.

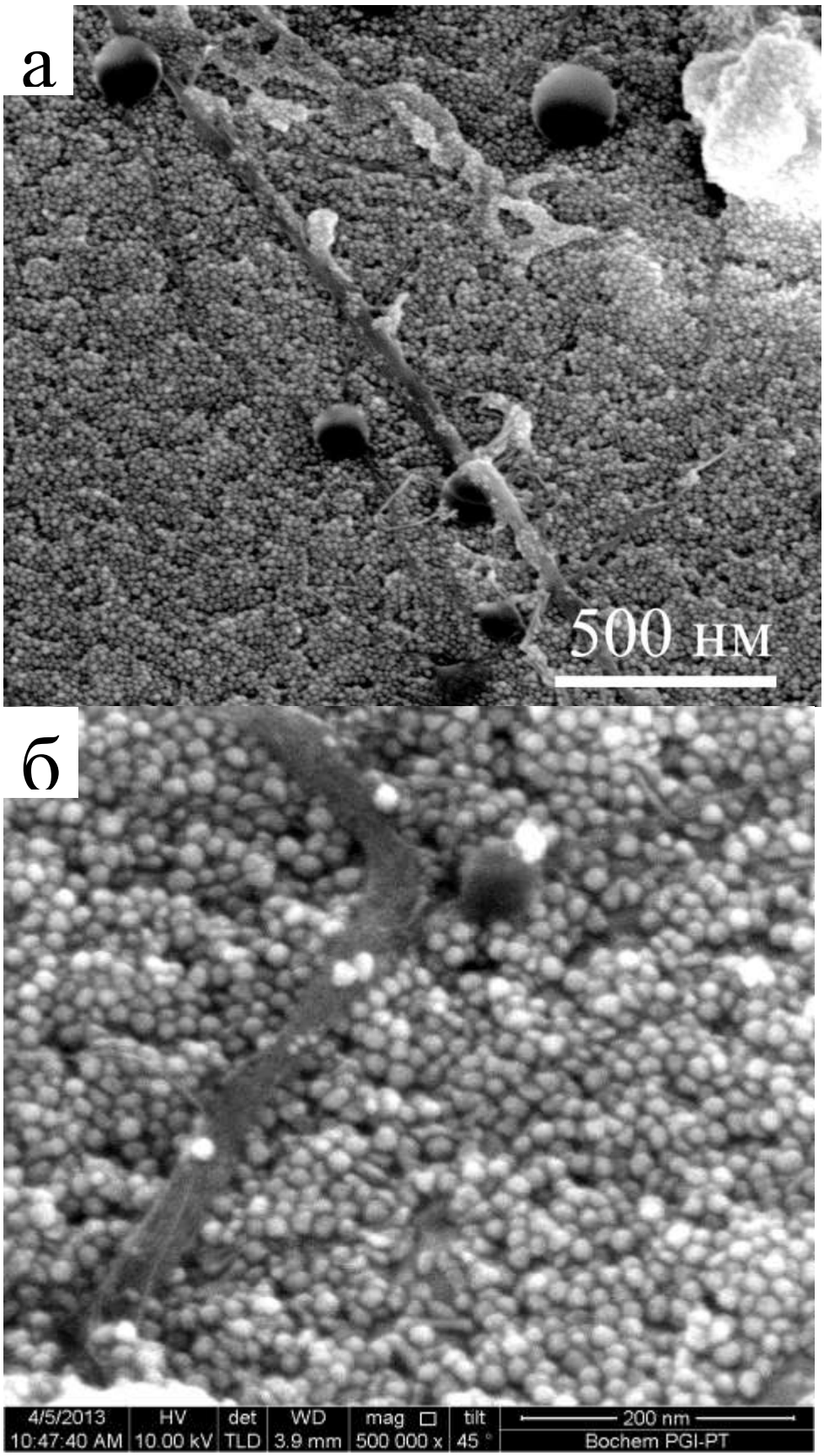


Рисунок 28. Микрофотографии поверхнсти электрода до (а) и после (б) измерений в растворе 0,1 М H_2SO_4.

3.1.2. Изучение поверхности модифицированных электродов методом спектроскопии электрохимического импеданса

Метод импедансной спектроскопии был использован для оценки увеличения истинной поверхности модифицированного электрода по отношению к поверхности немодифицированного электрода. Оценка увеличения площади истинной поверхности проводилась по изменению емкости двойного электрического слоя. Измерения проводились в растворе $5 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$ в 0,1 М KNO_3. Выбор состава раствора для измерений объясняется тем, что такая система характеризуется высокой обратимостью и, следовательно, сопротивлением переноса заряда можно пренебречь, а система будет описываться реактивным сопротивлением и импедансом Варбурга. В этом случае, с учетом реактивного сопротивления, эквивалентная схема для процесса, протекающего в этой системе на электроде, при приложенном равновесном потенциале может быть представлена в виде, приведенном на рисунке 29. Равновесный потенциал для системы $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ выбирали индивидуально для каждого электрода, по циклическим вольтамперограммам, находя среднее для значений потенциалов пика окисления и восстановления. Диапазон частот составлял от 1Гц до 10^4Гц

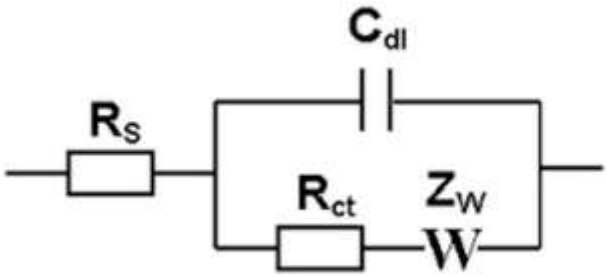


Рисунок 29. Эквивалентная схема электрохимической ячейки, состоящей из рабочего золотого электрода, хлоридсеребрянного электрода сравнения, и платинового вспомогательного электрода в $5\times10^{-4}M$ растворе гексацианоферрата (III) калия. В данной эквивалентной схеме резистивная часть R_s, описывает сопротивление электролита (фонового раствора). С нею последовательно соединены емкость двойного электрического слоя (C_{dl}) и фарадеевский импеданс(Z_W). C_{dl} и Z_W находятся в параллельной комбинации. Фарадеевский импеданс состоит из двух последовательно соединенных элементов – сопротивления переноса заряда R_{ct} и импеданса Варбурга.

На рисунках 30-33 приведены результаты измерений для тонкопленочного золотого электрода, золотого электрода, модифицированного наностуктурами, а также годографы импеданса (зависимости Найквиста) для рабочих электродов модифицированных наноструктурами и модифицированных электродов обработанных реагентом Меервейна.

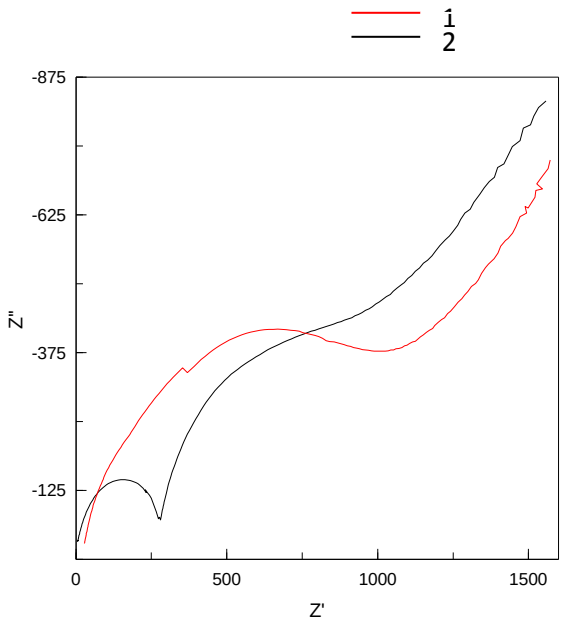


Рисунок 30. Годограф импеданса для тонкопленочного золотого электрода (2) и для золотого электрода, модифицированного наноструктурами из синтеза(метод синтеза из гексана) [94] (1).

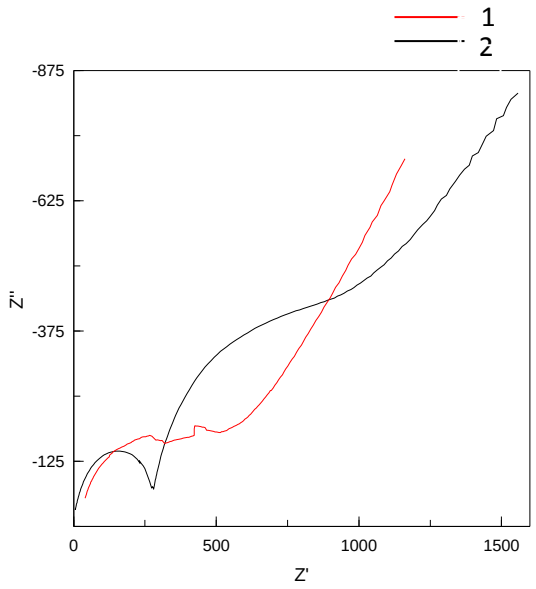


Рисунок 31. Годограф импеданса (зависимость Найквиста) для тонкопленочного золотого электрода (2) и для золотого электрода, модифицированного наноструктурами из синтеза [94] и обработанными регентом Меервейна (1).

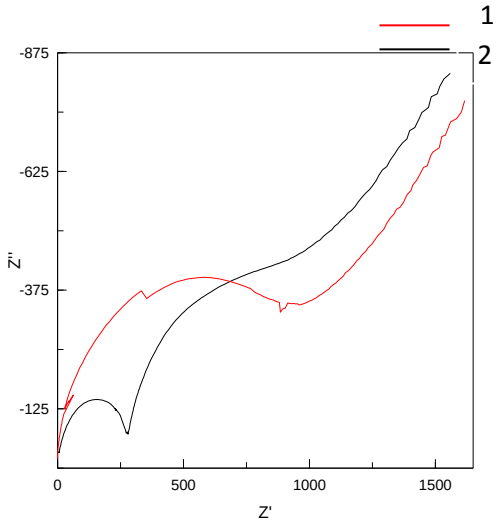


Рисунок 32. Годограф импеданса (зависимость Найквиста) для тонкопленочного золотого электрода (2) и для золотого электрода, модифицированного наноструктурами из синтеза [95] (1).

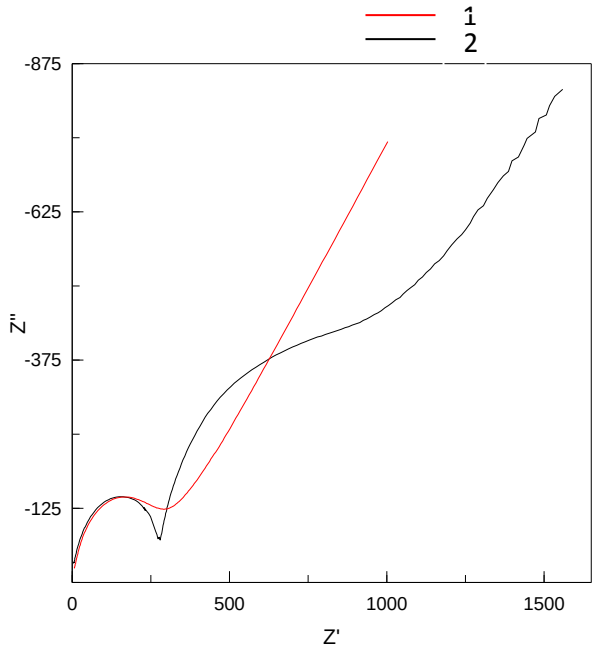


Рисунок 33. Годограф импеданса (зависимость Найквиста) для тонкопленочного золотого электрода (2) и для золотого электрода, модифицированного наноструктурами методом синтеза из толуола [95] после обработки реагентом Меервейна (1).

Для обработки результатов измерения и нахождения реактивной и активной составляющей сопротивления использовали программное обеспечение Zview 3.2®. Данная программа позволяет строить схемы описывающие состояние поверхности и подбирать одновременно несколько параметров, используя при этом алгоритмы решения систем линейных уравнений. С помощью эквивалентной схемы (рисунок 29) для данной системы, были рассчитаны значения общей емкости и сопротивления (таблица 7).

Таблица 7. Рассчитанные емкости двойного электрического слоя и сопротивления для немодифицированного электрода и электродов, модифицированных наноструктурами золота ($R_{\Sigma}=R_s+R_{ct}$) .

наименование электрода	C, мкФ·см$^{-2}$	R_{Σ}, Ом·см$^{-2}$
тонкопленочный Au электрод	2,9	1467
Au электрод модифицированный наночастицами синтезированными из раствора гексана	5,9	3460
Au электрод модифицированный наночастицами синтезированными из раствора гексана после обработки реагентом Меервейна	2,8	1994
Au электрод модифицированный наночастицами синтезированными из раствора толуола	6,8	3768
Au электрод модифицированный наночастицами синтезированными из раствора толуола после обработки реагентом Меервейна	6,6	1808

Полученные результаты свидетельствуют о том, что модифицированные электроды обладают большей площадью эффективной поверхности, что приводит к большей величине токов, и, следовательно более высокой чувствительности, а также более низкому сопротивлению переноса заряда (что свидетельствует об эффективном удалении олеиламина с поверхности электрода), поэтому такие электроды подходят для дальнейшей модификации ферментами и использования в конструкции вольтамперометрических сенсоров.

3.2. Исследование состава и структуры наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au

Электрохимическое осаждение металлов может сопровождаться соосаждением таких примесей как оксиды этих металлов, твердые соли (расплавы) или продукты разложения органических соединений, находящихся в составе раствора, так как включение примесей может приводить к существенному изменению свойств сплава. Для контроля состава наноструктурированных ультрамикроэлектродов, синтезированных методом DENA применяли рентгеноспектральные методы исследования поверхности.

3.2.1. Рентгеноспектральные исследования наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au

Спектральные исследования наноструктурированных УМЭ синтезированных методом направленного электрохимического синтеза проводили методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Данный метод позволяет осуществить полуколичественный элементный анализ. Анализ сплава Pd-Au был выполнен для исследования состава наноструктурированных УМЭ, синтезированных при различных условиях и из растворов различного состава. В зависимости от использованных солей металлов, расстояния между электродами для синтеза и параметрами электролиза, наноструктурированные УМЭ различались по форме и составу.

Наноструктурированные УМЭ палладия осаждали из 10^{-1} М раствора ацетата Pd (II) при частоте 39 МГц, переменном напряжении 18 V_{pp} и постоянном напряжении 1,8 В. Диаметр наноструктурированных УМЭ Pd составил 800 нм. Из данных энергодисперсионного рентгеноспектрального анализа (рисунок 34) было выявлено влияния ацетат-ионов на структуру осажденного металла. По рентгеновскому спектру можно судить о том, что полученный наноструктурированный УМЭ не имеет никаких примесей за исключением большого количества углерода. Присутствие углерода можно объяснить либо разложением ацетат-ионов в ходе процесса электроосаждения с последующим соосаждением углерода, либо сорбцией ацетата на поверхности осажденного палладия.

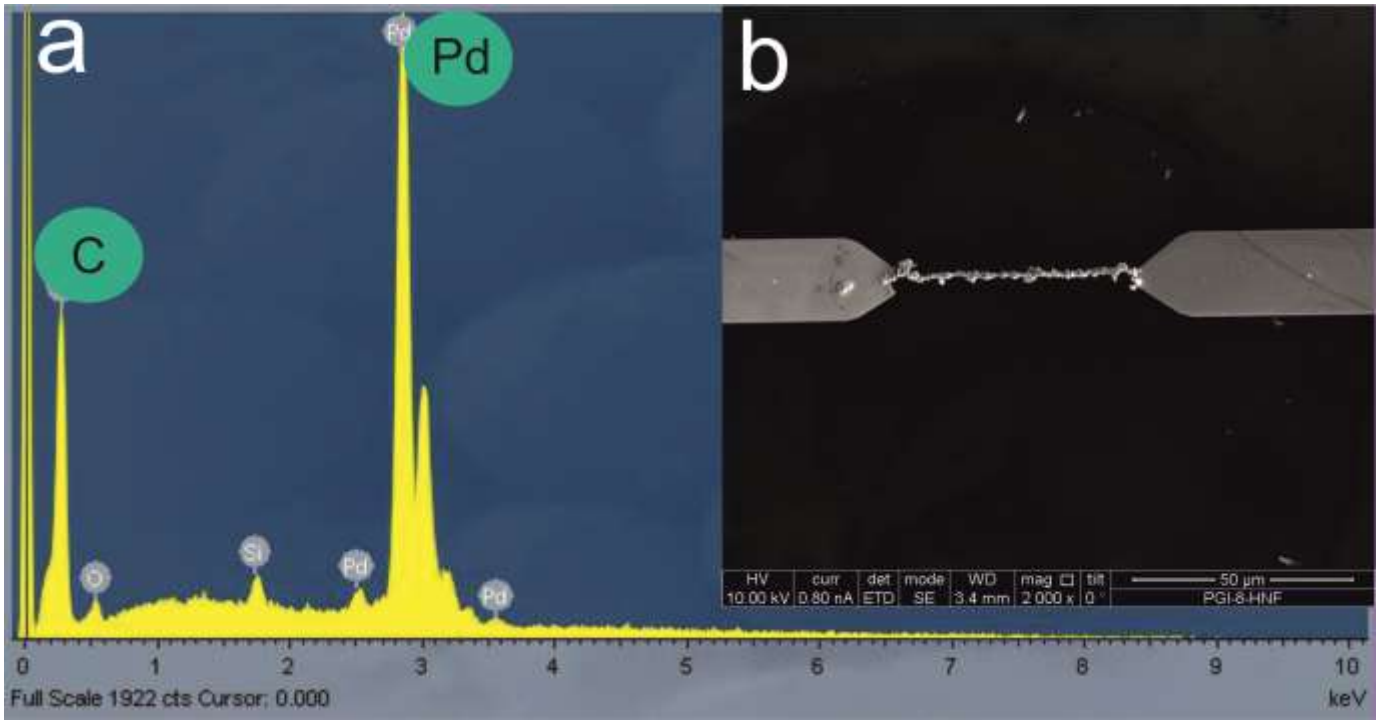


Рисунок 34. EDX-спектр наноструктурированного УМЭ *палладия (а), SEM-изображение* наноструктурированного УМЭ *Pd (б).*

Процесс захвата углерода металлом нежелателен, так как это будет приводить к уменьшению проводимости наноструктурированных УМЭ и изменению структуры наноструктурированного УМЭ. Поэтому дальнейшее электроосаждение наноструктурированных УМЭ Pd выполняли из водного

раствора 10^{-2} М K_2PdCl_4 и $PdCl_2$ в натрий-фосфатном буферном растворе (pH 8). На рисунке 35 представлен энергодисперсионный рентгеновский спектр наноструктурированного УМЭ Pd осажденного из 10^{-2} М K_2PdCl_4 при частоте 45 МГц, переменном напряжении 17 V_{pp} и постоянном напряжении 1,5 В. На том же рисунке показана микрофотография осажденного наноструктурированного УМЭ и картированная микрофотография этой проволоки. Таким образом, в обоих случаях были синтезированы наноструктурированные УМЭ палладия без каких либо примесей. Для дальнейших электрохимических измерений были синтезированы наноструктурированные УМЭ палладия диаметром от 200 до 800 нм и длиной 20 и 50 мкм.

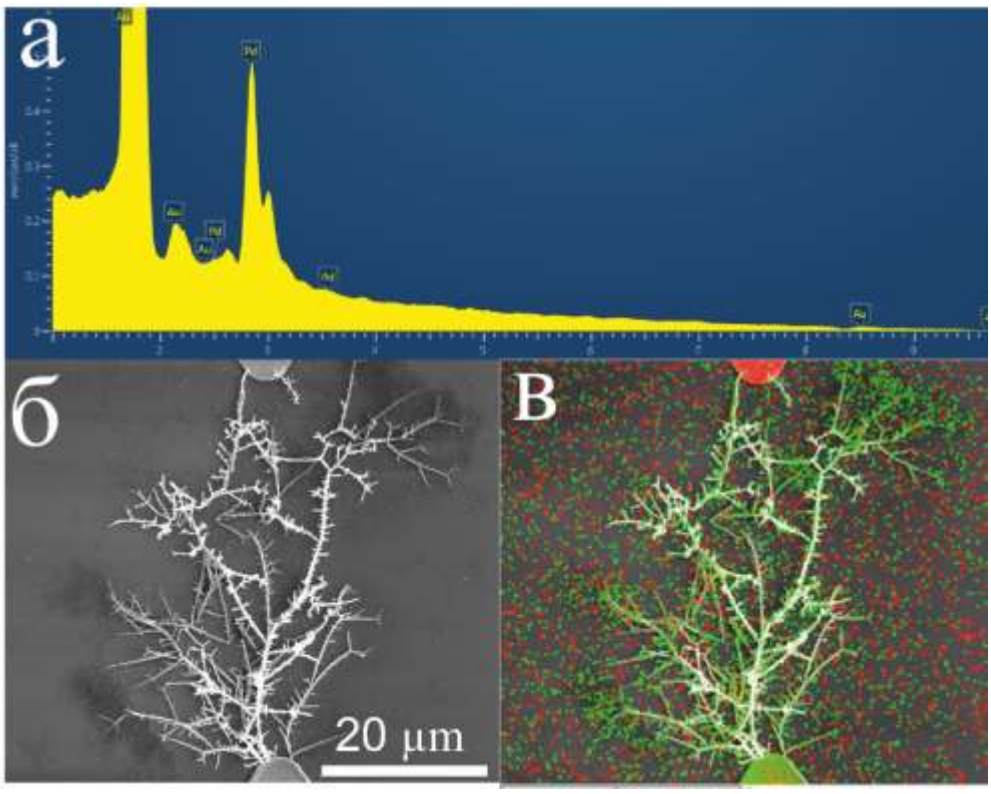


Рисунок 35. Энергодисперсионный рентгеновский спектр наноструктур Pd, синтезированных из 10^{-2} М K_2PdCl_4 при частоте 45 МГц, переменном напряжении 17 V_{pp} и постоянном напряжении 1,5 В(красный цвет – Pd, зеленый – Au).

При синтезе наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au из хлоридных комплексов обоих металлов возникает проблема осаждения палладия из раствора, что может быть связано с ограничением массопереноса в отсутствии фонового электролита. В таком случае при эквимолярных соотношениях $HAuCl_4$ и K_2PdCl_4 с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ М соотношение этих элементов в сплаве составляет 70 и 30% соответственно (40 МГц, 17 V_{pp} и 1,5 В). Это соотношение было установлено из результатов энергодисперсионного рентгеновского спектрального анализа (рисунок 36а-б) и визуализированно при помощи картирования спектральных данных (рисунок 36в). Таким образом, осаждение из хлоридных комплексов водных растворов Pd и Au приводит к получению сплавов с нестабильным соотношением этих элементов.

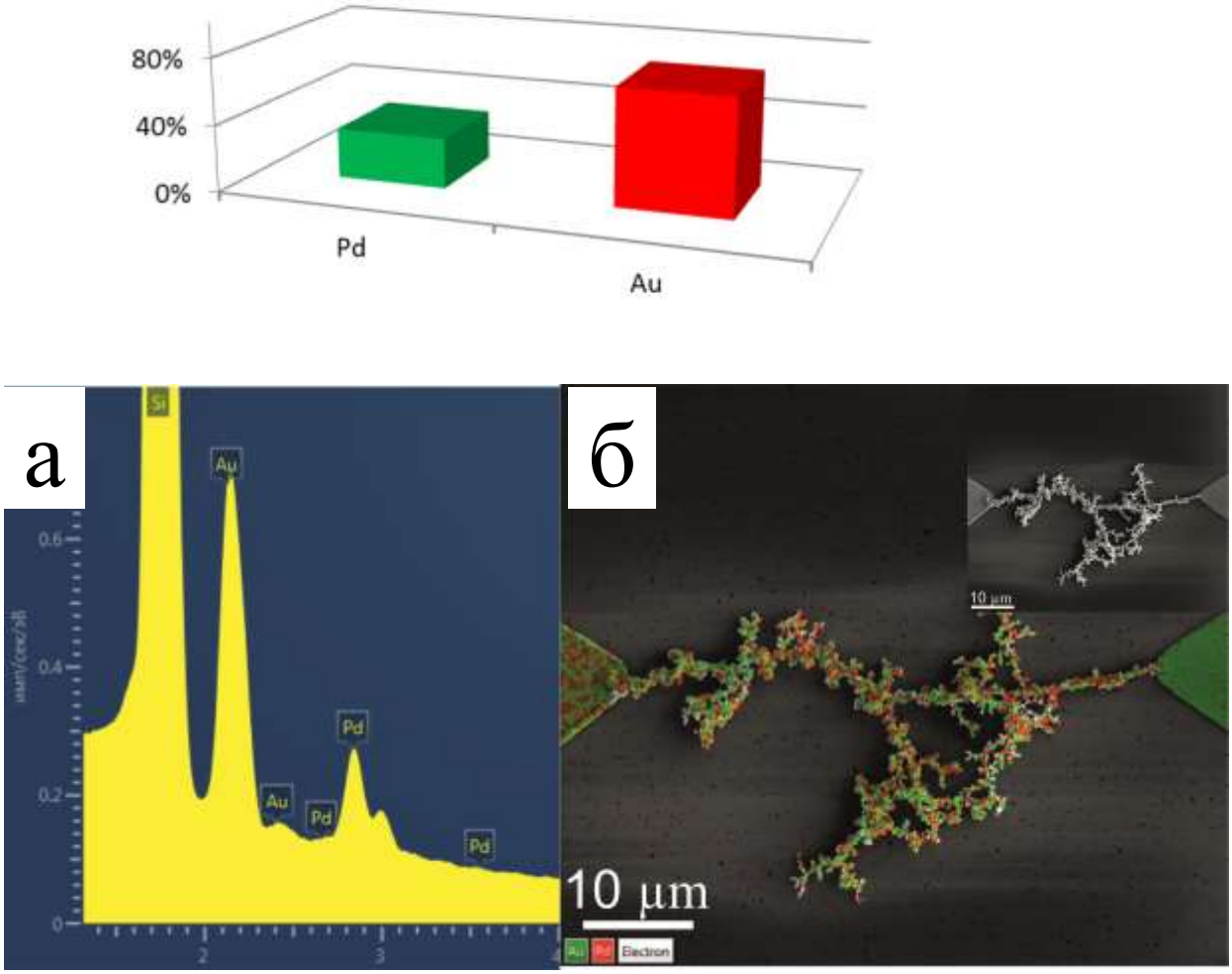


Рисунок 36. Наноструктурированные УМЭ Pd-Au синтезированные из $HAuCl_4$ и K_2PdCl_4 с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ М при частоте 40 МГц, переменном напряжении 17 V_{pp} и постоянном напряжении 1,5 В (красный цвет – Pd, зеленый – Au).

Исходя из литературных данных [151], Pd и Au способны образовывать твердые растворы, то есть неограниченно растворяться друг в друге при осаждении и обладать общей кристаллической решеткой с соотношением атомов в той же пропорции, что и в исходном растворе. Это связано с тем, что Pd и Au имеют одинаковый тип решетки (кубическая гранецентрированная). Атомные радиусы Pd и Au отличаются менее чем на 10% (144 пм у Au и 137 пм у Pd), а электроотрицательность этих металлов близка (2,20 у Pd и 2,64 у Au (по Полингу)), также они имеют близкое значение потенциала ионизации (8,33 эВ у

Pd и 9,22 эВ у Au). На основании всего вышеизложенного можно сделать вывод о том, что при подборе исходных солей металлов при их эквимолярном соотношении в растворе, можно получить твердый раствор этих металлов, то есть их равномерное распределение в кристаллической решетке сплава.

Для синтеза наноструктурированных УМЭ была выбрана соль $PdCl_2$, а также для создания условий повышения растворимости данной соли и введения в систему фонового электролита использовали 10 мМ натрий-фосфатный буферный раствор (pH 8). Электроосаждение сплава выполняли из вышеуказанного раствора с эквимолярным соотношеним $PdCl_2$ и $HAuCl_4$ ($5 \cdot 10^{-3}$ М). Частота переменного напряжения составляла 38 МГц, амплитуда переменного напряжении – 17 V_{pp} и постоянное напряжение – 1,5 В. Для установления состава сплава был проведен энергородисперсионный рентгеновский спектральный анализ (рисунок 37а), а также составлено картированное изображение по микрофотографии наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au. Анализ полученного спектра (рисунок 37б-в) показал соотношение Au и Pd в сплаве 55,5% и 45,5% соответственно

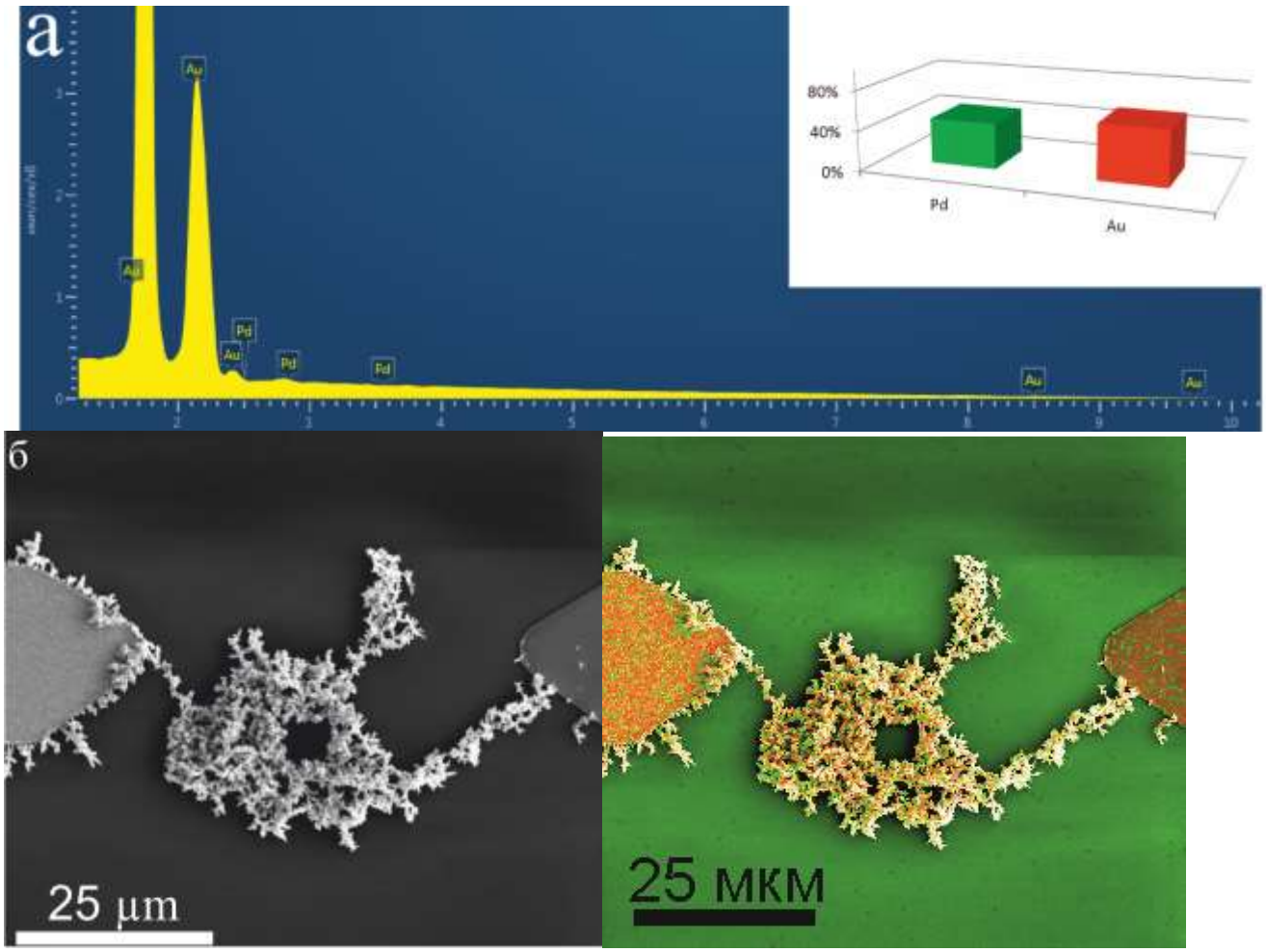


Рисунок 37. Энергодисперсионный рентгеновский спектр сплава Pd-Au (синтезированный при частоте переменного напряжения 38 МГц, переменном напряжении 17 V_{pp} и постоянном напряжении 1,5В) (а), микрофотография наноструктурированного УМЭ Pd-Au, полученная на сканирующем электронном микроскопе (б), картирование микрофотографии по данным энергодисперсионного рентгеновского анализа (в;) (красный цвет – Pd, зеленый – Au).

Для того, чтобы доказать получение в наноструктурированном УМЭ сплава Pd-Au твердого раствора был выполнен продольный срез наноструктурированного УМЭ методом травления сфокусированным ионным пучком. После этого продольный срез наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au был перенесен на медную подложку для исключения попадания в энергодисперсионный детектор сигнала от золотых контактных линий и кремниевой подложки. На рисунке 38 приведен энергодисперсионный рентгеновский спектр и картированное изображение со сканирующего электронного микроскопа с распределением Pd и Au в продольном сечении наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au. Спектральные и визуальные данные также доказывают образование твердого раствора в наноструктурированном УМЭ сплава Pd-Au.

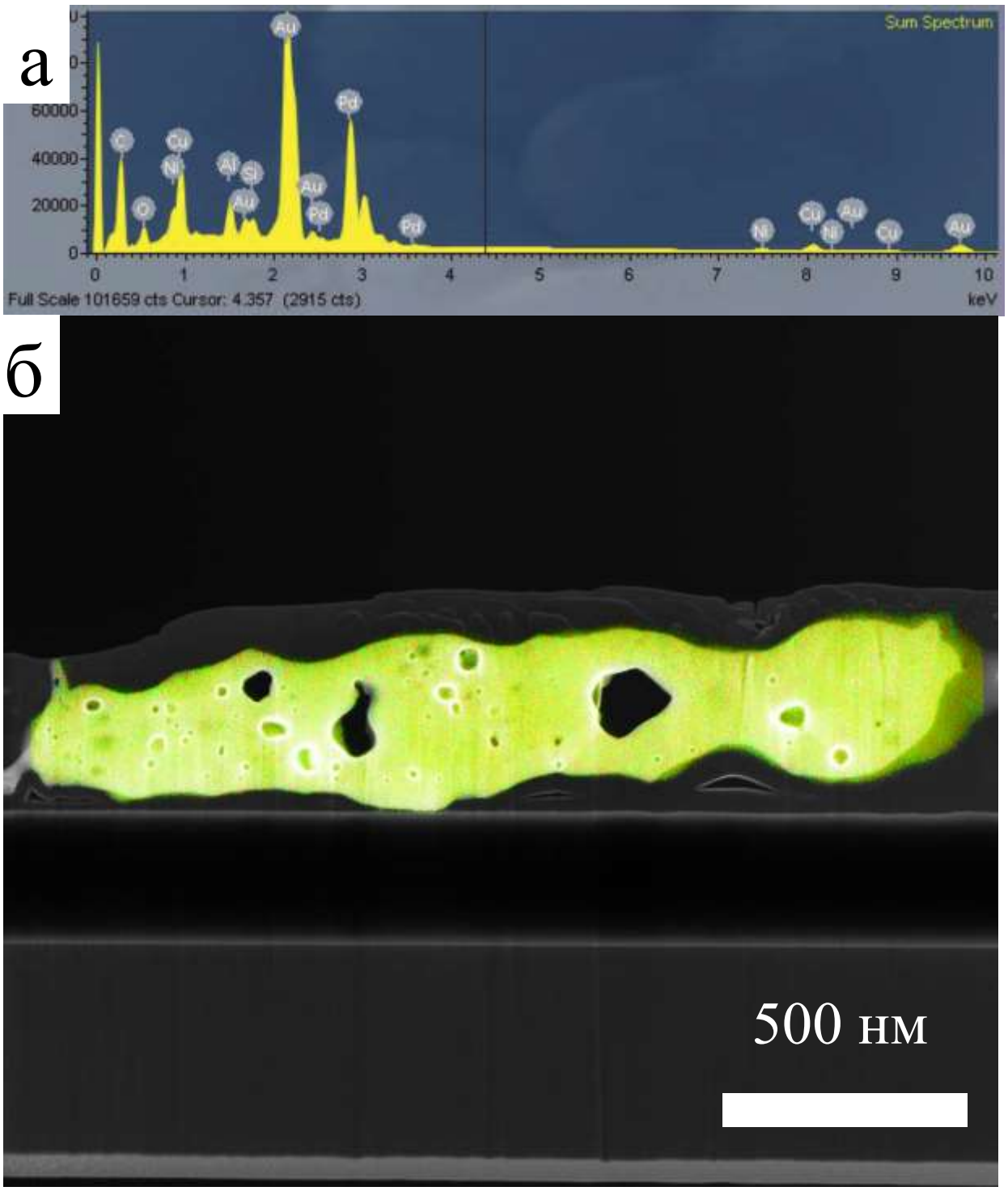


Рисунок 38. Энергодисперсионный спектр продольного сечения наноструктурированного УМЭ Pd-Au (а), картированное изображение продольного среза наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au (красный цвет – Pd, зеленый – Au, ;желтый – равное соотношение Pd и Au).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что при эквимолярном соотношении растворов солей металлов полученный сплав Pd-Au имеет равное соотношение обоих металлов [151], а также синтезированные наноструктурированные УМЭ не содержат примесей в своей структуре.

3.2.2. Исследование проводимости наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au

Для исследования влияния примесей в составе наноструктурированных УМЭ, синтезированных методом направленного электрохимического синтеза исследовали их проводимость. Эксперимент выполняли на станции для измерения (probestation), оснащенной микроскопом и контактами-манипуляторами, помещенными в ящик Фарадея. Для задания напряжения и измерения тока использовали двухточечную схему подключения, то есть измерения проводили в точках на контактных линиях (токоподводы между которыми выращены проволоки), а не на концах наноструктурированных УМЭ. Такая схема подключения объясняется тем, что электропроводность контактных линий соответствует объемной электропроводности, что много больше проводимости наноструктурированных УМЭ. Поэтому электропроводность цепи будет определяться электропроводностью наноструктурированных УМЭ. Для задания развертки напряжения использовали цифровой мультиметр высокой точности (DMM Keithley). Была задана развертка потенциала от минус 50 мВ до плюс 50 мВ и измерено значение тока. На рисунке 39 представлена вольтамперная характеристика для наноструктурированных УМЭ Pd, Au и их сплава.

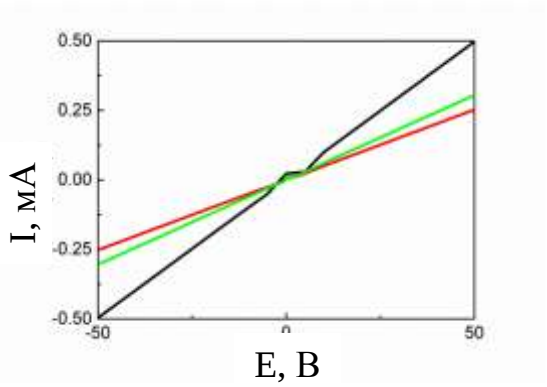


Рисунок 39. Результаты измерений проводимости наноструктурированных УМЭ: Au (красная линия), Pd (черная линия) и сплава Pd-Au (зеленая линия).

На основании полученных вольтамперных зависимостей по закону Ома были рассчитаны значения сопротивлений для каждого наноструктурированного УМЭ. С учетом геометрических параметров наноструктурированных УМЭ (длина и диаметр), определенных по микрофотографиям, были рассчитаны величины удельного сопротивления (таблица 8).

Таблица 8. Рассчитанные значения удельного сопротивления ($\rho_{рассч}$) для наноструктурированных УМЭ различного состава, а также теоретические значения удельного сопротивления ($\rho_{теор}$) для Pd и Au.

металл/сплав	$\rho_{рассч}$, Ω·m	$\rho_{теор}$, Ω·m
Pd	$6{,}30\cdot10^{-8}$	$1{,}05\cdot10^{-7}$
Au	$3{,}80\cdot10^{-7}$	$2{,}44\cdot10^{-8}$
Pd/Au	$1{,}02\cdot10^{-7}$	-

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что значения удельного сопротивления для наноструктурированных УМЭ отличаются от теоретических для благородных металлов. Значение удельного сопротивления для наноструктурированного УМЭ золота достаточно высоко по сравнению с теоретическим значением, что можно объяснить дефектами в местах соединения наноструктурированных УМЭ с контактными линиями, а также полостями внутри

наноструктурированных УМЭ. Представленные расчеты определяются точностью определения геометрических параметров наноструктурированных УМЭ. Рассчитанное удельное сопротивление сплава Pd-Au близко к значениям удельного сопротивления наноструктурированных УМЭ из чистых металлов. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что удельное сопротивление наноструктурированных УМЭ, синтезированных методом направленного электрохимического синтеза, близко к удельному сопротивлению проводников с объемной электропроводностью, что свидетельствует об осаждении металлов и их сплава без посторонних примесей, ухудшающих электропроводность. Последний факт является очень важным показателем для использования наноструктурированных УМЭ в качестве рабочих электродов вольтамперометрических сенсоров.

В результате DENA-синтеза были получены наноструктурированные ультрамикроразмерные электроды из металлов и сплавов, которые подходят для электрохимических измерений в биологических объектах, как правило, характеризующихся малыми объемами, и в среде клеточных культур. Это связано с тем, что такие наноматериалы характеризуются биосовместимостью и лучшими механическими характеристиками, по сравнению с обычными УМЭ и наноструктурами благородных металлов и их сплавов.

4. Исследование аналитических характеристик наноструктурированных электродов.

Наноструктурированные электроды использовали для проведения определения глюкозы и пероксида водорода методами амперометрии и циклической вольтамперометрии.

4.1. Аналитические характеристики вольтамперометического сенсора с иммобилизованной глюкозоксидазой на примере определения глюкозы

Электрод, модифицированный наноструктурами золота, был использован для создания прототипа вольтамперометрического сенсора. Для этого нужно было выбрать медиатор электронного переноса и фермент. В качестве медиатора был выбран ферроценметанол, а в качестве фермента глюкозоксидаза. Дальнейшие исследования были направлены на исследование аналитических характеристик вольтамперометрического сенсора на основе наноструктур золота, полученных химическим методом с последующей обработкой реагентом Меервейна.

Выбор медиатора электронного переноса. Выбор медиатора электронного переноса в электрохимическом биосенсоре для определения глюкозы проводили из числа трех обычно используемых в коммерческих глюкометрах: гексацианоферрат (III) калия, ферроценметанол и гидрохинон. Циклические вольтамперограммы были сняты на электроде, модифицированном наноструктурами золота, синтезированными олеиламиновым методом в толуоле и гексане (см. рисунок 40а). На рисунке 40б представлены циклические вольтамперограммы для трех вышеуказанных соединений, в растворе 0,1 М KNO_3, с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ М. Ферроценметанол показал наименьшую разность потенциалов окисления и восстановления и наибольшую величину тока окисления на циклических вольтамперограммах. Этим и объясняется выбор его в качестве медиатора.

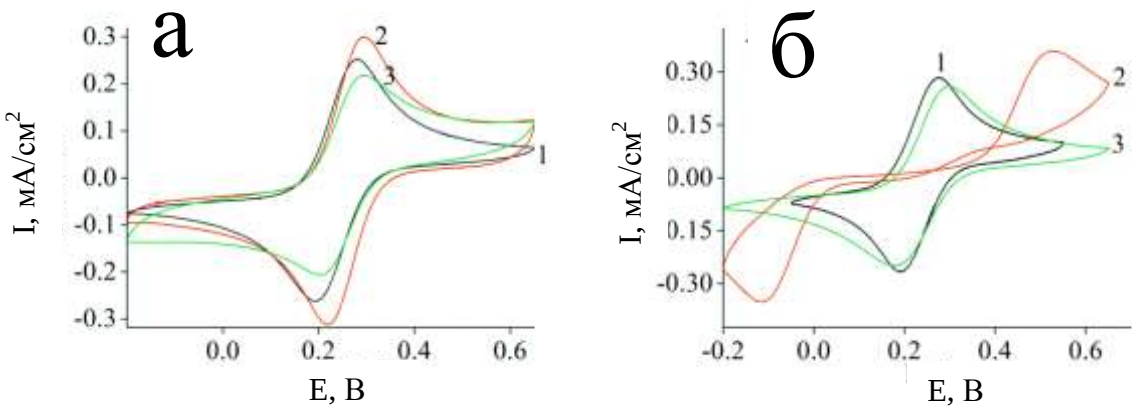


Рисунок 40. (а) Циклические вольтамперограммы, снятые в растворе гексацианоферрата (III) калия для наноструктурированных электродов на основе наноструктур синтезированных олеиламиновым методом в толуоле (1) и олеиламиновым методом в толуоле после обработки реагентом Меервейна (2), а также на тонкопленочном золотом электроде (3). (б) Циклические вольтамперограммы для растворов медиаторов электронов в электрохимическом биосенсоре: ферроценметанола (1), гидрохинона (2) и гексацианоферрата (III) калия. Скорость развертки 50 мВ/с.

Из вольтамперных зависимостей (рисунок 40а) можно сделать вывод о том, что в случае модификации поверхности наноструктурами золота токи окисления/восстановления медиатора с диффузионным контролем (гексацианоферрат (III) калия) изменяются незначительно по сравнению с тонкопленочным золотым электродом. Это можно объяснить тем, что расстояние между наноструктурами меньше толщины диффузионного слоя (то есть наноструктуры плотно упакованы на поверхности) и наблюдаемое ограничение токов окисления и восстановления объясняется линейной диффузией, что хорошо согласуется с литературными данными [93, 152].

Выбор потенциала измерений для построения градуировочной зависимости и состава фонового раствора. Фоновый электролит состоял из $5\cdot10^{-4}$ М ферроценметанола в 0,1 М растворе фосфатного буфера (NaH_2PO_4+Na_2HPO_4) (pH

7). Выбор фонового электролита обусловлен потребностью в измерении концентрации глюкозы в биологических средах. Выбранный натрий-фосфатный буфер является изотоническим раствором, что делает его подходящим для исследований поведения электрохимического биосенсора в биологических средах. При введении в систему глюкозы происходит реакция окисления до глюконолактона, при этом глюкозоксидаза переходит из окисленной формы в восстановленную. Ферроценметанол восстанавливается глюкозоксидазой, таким образом, на электроде регистрируется ток, соответствующий процессу окисления диффузионного медиатора, который пропорционален концентрации глюкозы в растворе. Исходя из вышесказанного, регистрацию сигнала отклика электрохимического биосенсора нужно проводить при потенциале окисления ферроценметанола.

Определение глюкозы с использованием вольтамперометрического сенсора на основе рабочего электрода, модифицированного химически синтезированными наноструктурами золота.

Были определены интервал линейной зависимости тока от концентрации глюкозы, чувствительность, предел обнаружения, стабильность и селективность биосенсора. Определение глюкозы было выполнено на электроде, модифицированном наноструктурами золота in situ, а также глюкозоксидазой, ковалентно «пришитой» к наноструктурированной поверхности электрода. Детектирование концентрации глюкозы было проведено методом циклической вольтамперометрии, диапазон развертки потенциала составлял от минус 0,1до плюс 0,55 В (рисунок 41). Значение потенциала для построения градуировочной зависимости при этом был выбран равным плюс 0,250 мВ, так как такой выбор отвечает максимальному значению аналитического сигнала. Были построеные градуировочные зависимости тока окисления фероценметанола от концентрации глюкозы (рисунок 42-43)

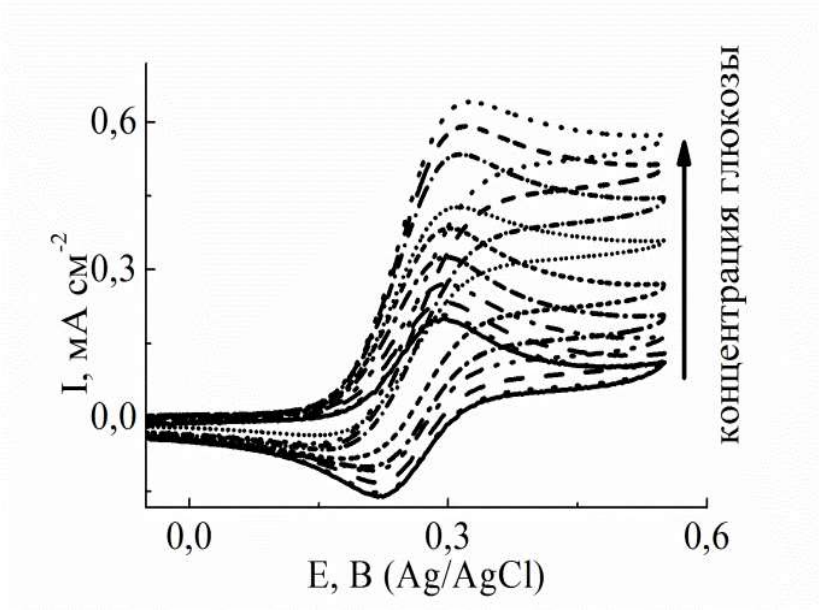


Рисунок 41. Циклические вольтамперограммы на модифицированном электроде, с различной концентрацией глюкозы в ячейке в диапазоне концентраций от 0 до 20 мМ.

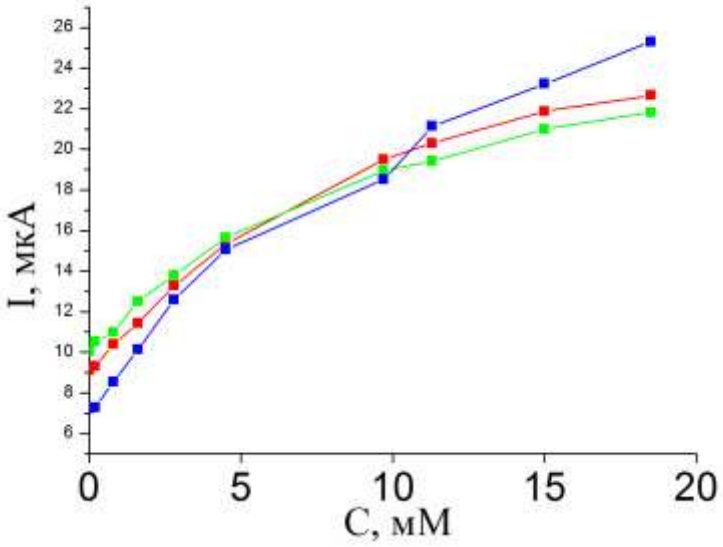


Рисунок 42. Зависимость величины тока (E=+250 мВ) от концентрации глюкозы на циклических вольтамперограммах для трех модифицированных электродов.

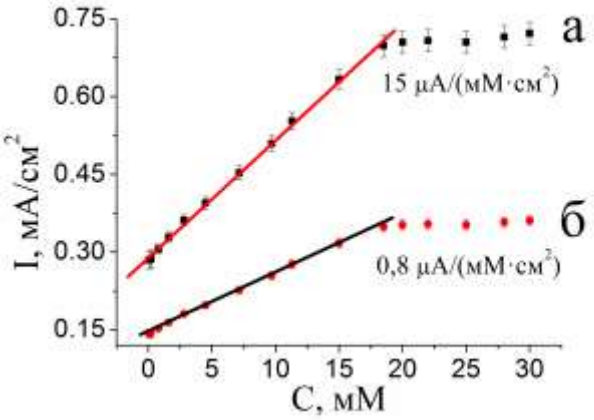


Рисунок 43. Градуировочная зависимость для биосенсора на основе наноструктур Au (а), а также градуировочная зависимость для биосенсора на основе тонкопленочного золотого электрода (б) (зависимость высоты пика окисления ферроценметанола от концентрации глюкозы).

Из полученных градуировочных зависимостей можно сделать вывод о том, что чувствительность электрода, модифицированного наноструктурами золота увеличилась практически в два раза (от 0,8 до 15 мкА/(мМ·см^2)).

Одной из важнейших характеристик биосенсора является его стабильность во времени. Измерения стабильности биосенсора проводили в течение 60 дней, с периодичностью 5 дней в интервале концентраций от 0,06 до 18,5 мМ. На рисунке 44 представлена динамика относительной чувствительности биосенсора (отношение результатов чувствительности, полученных через N дней к значению, измеренному в начальный период времени) на основе наноструктурированного электрода и тонкопленочного золотого.

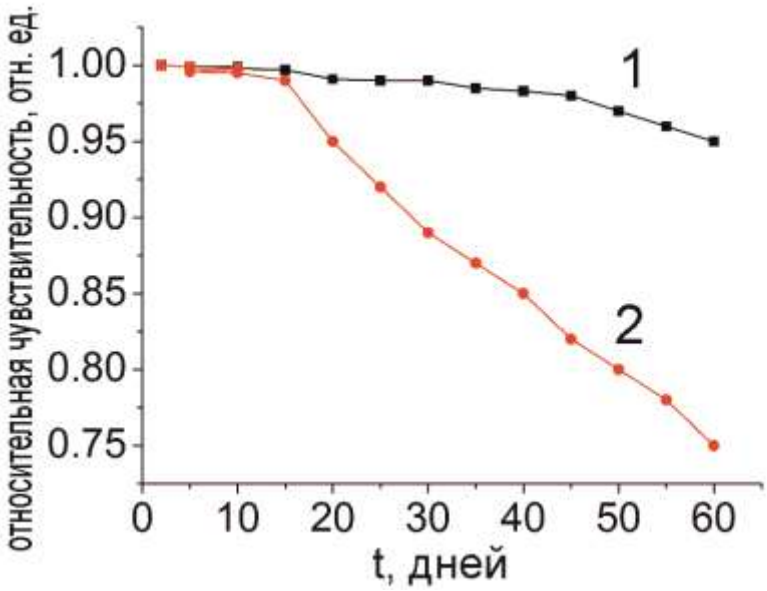


Рисунок 44. Зависимость относительной чувствительности от времени для биосенсора на основе электрода модифицированного наноструктурами золота (1) и тонкопленочного золотого электрода (2).

Спустя 60 дней биосенсор на основе наноструктур золота, обработанных реагентом Меервейна показал значение относительной чувствительности 93%, в то время как относительная чувствительность биосенсора на основе тонкопленочного золотого электрода снизилась до 67% (рисунок 44). Это связано с тем, что, как описано в литературе, наноструктуры золота предотвращают денатурацию молекул глюкозоксидазы иммобилизованной на поверхности [153]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что полученный биосенсор обладает существенно большей стабильностью по сравнению с тонкопленочным модифицированным электродом. Сравнительные аналитические характеристики биосенсора на основе наноструктур золота, синтезированных олеиламиновым методом и обработанных реагентом Меервейна, приведены в таблице 9.

Таблица 9. Аналитические характеристики биосенсора на основе наноструктур золота. ЛИ – линейный интервал; ПО – предел обнаружения; S – чувствительность; $E_{дет}$ – потенциал детектирования; НЧ – наночастицы; GOX –глюкозоксидаза;

модификатор электрода	ЛИ, мМ	S, мкА·мМ$^{-1}$см$^{-2}$	ПО, мМ	Стабильность (дней)	Ссылка
НС Au	0,06 – 18,5	15,0	0,02	93% (60)	наст. работа
НЧ Au	0,02-5,7	8,8	0,0082	70% (30)	[154]
(НЧ Au)$_6$	0,01-13	5,7	0,008	85% (28)	[155]
мультислои графена	0,2-1,8	10,5	0,064	95% (14)	[156]

Селективность биосенсора определялась по отношению к мочевой кислоте, этанолу и аскорбиновой кислоте (таблица 10). Такой выбор объясняется тем, что данные вещества присутствуют в биологических системах и оказывают наибольшее влияние на аналитический сигнал глюкозы в биосенсоре. Так, аскорбиновая кислота восстанавливает ферроценметанол, таким образом, завышая сигнал биосенсора. Этанол и мочевая кислота меняют отклик сенсора, так как в незначительных количествах взаимодействуют с отдельными участками глюкозоксидазы.

Таблица 10. Влияние некоторых электроактивных метаболитов на отклик биосенсора на основе наноструктур золота в присутствии 1,5 мМ глюкозы в растворе. % отклика биосенсора – отношение сигнала в присутствии к сигналу в отсутствие мешающего вещего вещества.

Мешающее вещество	% отклика биосенсора (n=3)
	GOx-AuNP
Мочевая кислота, 2,5 мМ	98
Этанол, 0,1 v/v %	101
Аскорбиновая кислота, 2,5 мМ	111

Для проверки работы сенсора на реальных объектах было проведено определение глюкозы в сыворотке крови человека (Sigma Aldrich) методом введено-найдено (таблица 11). Концентрация глюкозы в сыворотке крови составляло 6,4 мМ. Образец разбавляли в 10 раз в растворе фонового электролита.

Таблица 11. Данные по определению глюкозы предложенным биосенсором, методом введено-найдено.

Начальная концентрация глюкозы в образце сыворотки крови, мМ,	Введено глюкозы, мМ	Найдено глюкозы, мМ	Определено глюкозы, мМ
0,64	0,50	1,13	0,49±0,01
0,64	3,0	3,52	2,88±0,12
0,64	6,0	6,58	5,94±0,06
0,64	12,0	12,45	11,81±0,24

Приведенные в таблице 11 результаты абсолютной погрешности найденных концентраций глюкозы приводят к выводу о соответствии введенных и найденных концентраций. Олеиламиновый метод синтеза наноструктур золота, с дальнейшей обработкой реагентом Меервейна, позволяет получить наноструктуры золота, использование которых для дальнейшей модификации электродов приводит к получению высокочувсвительных и стабильных вольтамперометрических сенсоров для определения глюкозы.

4.1.1. Расчет каталитической активности глюкозоксидазы из данных полученных при определении глюкозы

Расчет кажущейся константы Михаэлиса выполняли из данных, полученных методом циклической вольтамперометрии при измерении зависимости значений тока окисления ферроценметанола от концентрации глюкозы в растворе. Константа Михаэлиса рассчитывалась из кинетической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (в данном случае глюкозы) по формуле (1).

Данное равенство допустимо только в случае кинетического режима работы сенсора, так как именно в этом режиме сигнал сенсора определяется не градиентом концентрации глюкозы, а исключительно кинетическими параметрами. Кинетический режим соответствует области задания высоких концентраций аналита в ячейке. Такая область соответствует интервалу перехода от линейной зависимости тока от концентрации глюкозы к экспоненциальной. На основании вышеизложенного был проведен расчет константы Михаэлиса, для этого была построена обратная зависимость концентрации глюкозы от тока, затем выделен участок перехода из диффузионного режима в кинетический. Для выделенного участка была проведена линейная аппроксимация, по результатам которой по формуле (1) была рассчитана кажущаяся константа Михаэлиса (K_m^{app}) (рисунок 45).

Значение константы Михаэлиса (K_m^{free}) для глюкозоксидазы составляет от 33 до 110 мМ, при ее получении из плесневых грибов *Aspergillus niger* [157, 158]. Известно, что соотношение между K_m^{app} and K_m^{free} может изменяться в зависимости от условий иммобилизации фермента на поверхности [159]. В литературе кажущаяся константа Михаэлиса для различных электродов, модифицированных глюкозоксидазой: 4,3 мМ [154], 6,7 мМ [87], 10,5 мМ [89], 14,9 мМ [90], 20 мМ [91], и 6,3 мМ [160].

Для глюкозоксидазы, иммобилизованной на золотом электроде, предварительно in situ модифицированном наноструктурами золота, была

рассчитана кажущаяся константа Михаэлиса. Значение K_m^{app} составило 10,5 мМ. Такое значение K_m^{app} хорошо согласуется со значениями для биосенсоров, приведенных в вышеуказанной литературе.

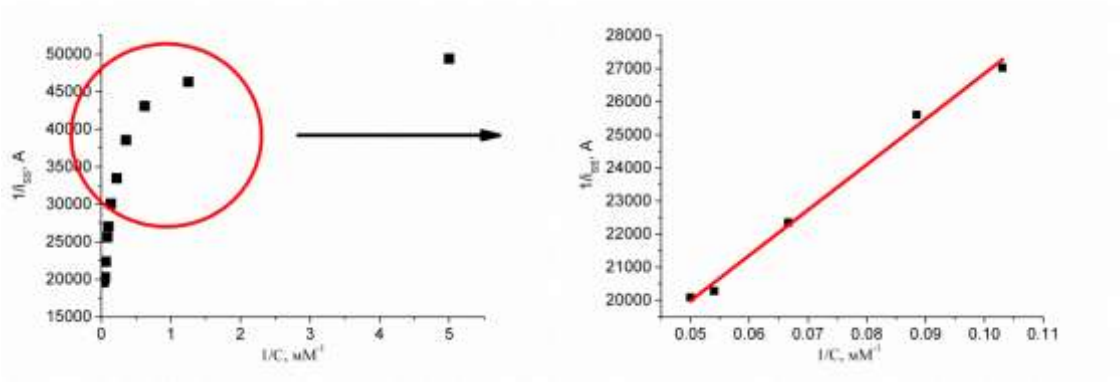


Рисунок 45. Обратные зависимости тока окисления ферроценметанола от концентрации глюкозы в ячейке для расчета кажущейся константы Михаэлиса.

Полученное значение константы Михаэлиса свидетельствует о сохранении активности глюкозоксидазы после иммобилизации и в течение измерения концентрации глюкозы.

4.2. Исследование аналитических характеристик электродов на основе наноструктурированных УМЭ Au, Pd сплава Pd-Au на примере пероксида водорода

Электрохимические биосенсоры, содержащие ферменты, имеют ряд недостатков, которые ограничивают их практическое применение. Использование бесферментных сенсоров на основе наноструктурированных электродов благородных металлов позволяет проводить анализ биологических объектов (см. раздел 1.6). Электрохимические бесферментные сенсоры сочетают преимущества электрохимических методов и уникальные свойства наноматериалов, что позволяет значительно увеличить чувствительность и уменьшить продолжительность анализа. Стабильность и интенсивность аналитического сигнала электрохимических сенсоров увеличивают такие перспективные наноматериалы как наночастицы Au, Pt и Pd. Из довольно широкого круга биологических аналитов наиболее важным является

пероксид водорода. Детектирование пероксида водорода проводят в фармацевтических исследованиях, в медицинской диагностике и для контроля окружающей среды. Также пероксид водорода вовлечен в различные биологические процессы, включая внутриклеточный обмен и является продуктом деятельности оксидоредуктаз.

4.2.1. Аналитические характеристики амперометрического сенсора на основе наноструктурированных УМЭ на примере бесферментного определения пероксида водорода

Выбор состава фонового электролита. В качестве фонового электролита был выбран 0,1 М фосфатный буферный раствор (NaH_2PO_4+Na_2 HPO_4) с pH 7,2, так как он является раствором близким по составу к физиологической жидкости и не представляет токсичности при измерениях в среде клеточных структур.

Выбор потенциалов определения пероксида водорода. В соответсвии с механизмом, представленным в главе 1.6, процесс электровосстановления пероксида водорода на поверхности электрода будет включать в себя этап адсорбции гидроксильного радикала или пергидроксильного радикала на поверхности электрода, с образованием так называемой «оксидной пленки». В таком случае, аналитическим сигналом будет служить восстановление поверхности электрода с последующей десорбцией кислорода при потенциале электровосстановления соответствующего металла. Для выбора потенциала детектирования был проведен анализ данных методом циклической вольтамперометрии на наноструктурированных УМЭ Au, Pd и сплава Pd-Au в растворе фонового электролита. Объем ячейки для измерений методом циклической вольтамперометрии составлял 1 мл, а для измерений методом амперометрии – 100 мкл. Потенциалы восстановления поверхности наноструктурированных УМЭ для Au и Pd из оксидов составили плюс 0,48 и минус 0,2 В соответственно (рисунок 46а-б).

Потенциалы восстановления из оксидных форм на катодной ветви циклических вольтамперограмм в сплаве для Pd и Au (рисунки 46а-б) были определены как минус 0,12 В и плюс 0,05 В соответственно. Такое смещение потенциалов связано с тем, что потенциалы восстановления каждого металла зависят от суммарного восстановительного потенциала сплава и концентрации каждого металла в сплаве [161]. На основании вышеизложенного и полученных данных восстановительных потенциалов было получено дополнительное доказательство о том, что состав сплава соответствует образованию твердого раствора. Для детектирования пероксида водорода на наноструктурированном УМЭ состава Pd-Au, исходя из информации, извлеченной из циклических вольтамперограмм, был выбран потенциал детектирования минус 0,05 В.

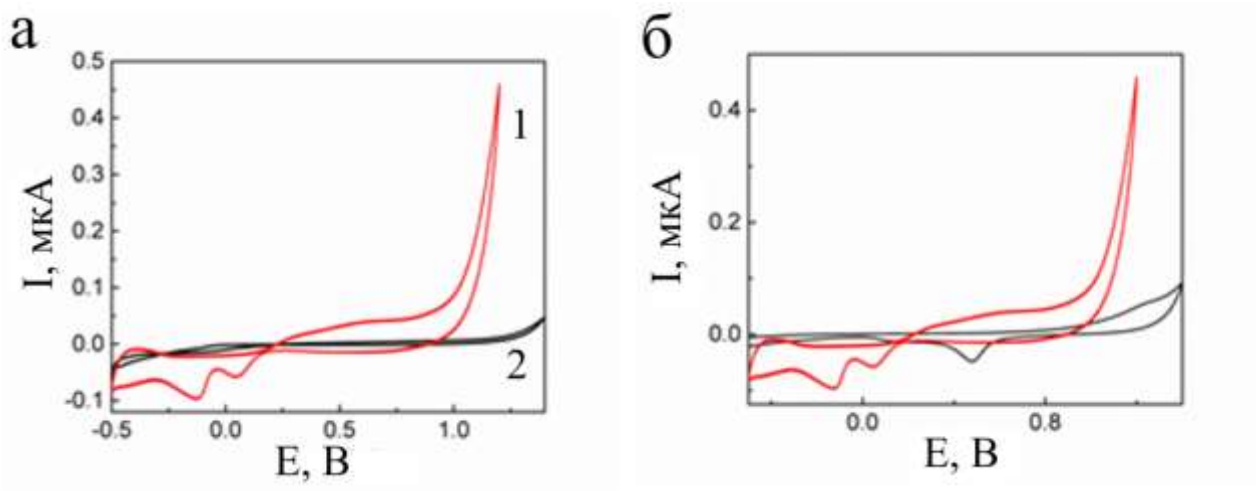


Рисунок 46. Циклическая вольтамперограмма наноструктурированного УМЭ Pd в фоновом растворе (а2) и наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au (а1). Циклическая вольтамперограмма наноструктурированного УМЭ Au в фоновом растворе (б2) и наноструктурированного УМЭ сплава Pd-Au (б1).

Определение пероксида водорода на Pd и Au нанструктурированном электродах. Определение пероксида водорода проводилось в фоновом растворе фосфатного буфера (pH 7,2) в ячейке объемом 100 мкл методом амперометрии. В качестве сравнения, определение пероксида водорода проводилось на наноструктурированных УМЭ Au и Pd, методом амперометрии, при потенциалах

детектирования плюс 0,48 В и минус 0,2 В соответственно и были построены градуировочные зависимости (рисунок 47-48).

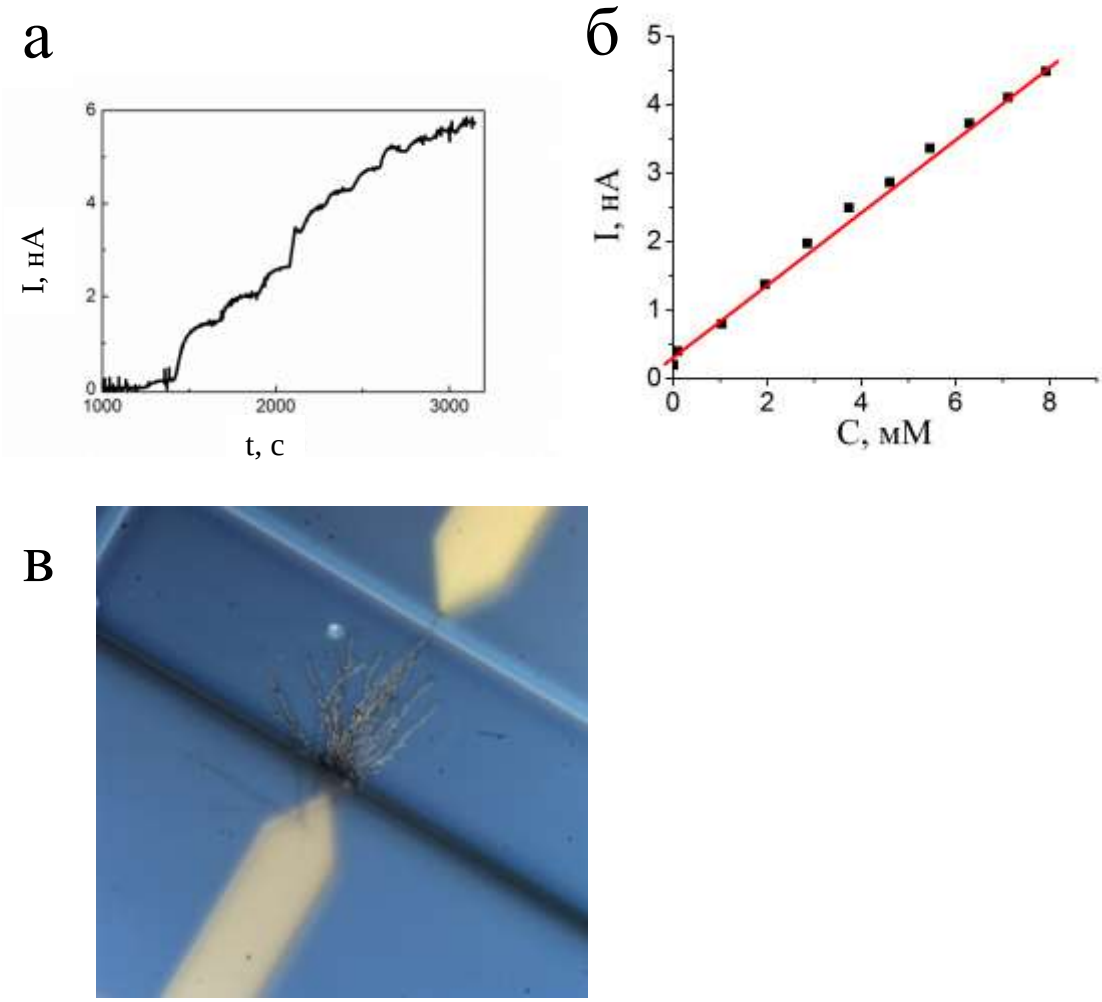


Рисунок 47 Амперограмма измерений добавок пероксида водорода на наноструктурированном УМЭ Pd (а), градуировочная зависимость тока восстановления палладия от концентрации пероксида водорода (б), фотография наноструктурированного УМЭ палладия в оптическом микроскопе (в)

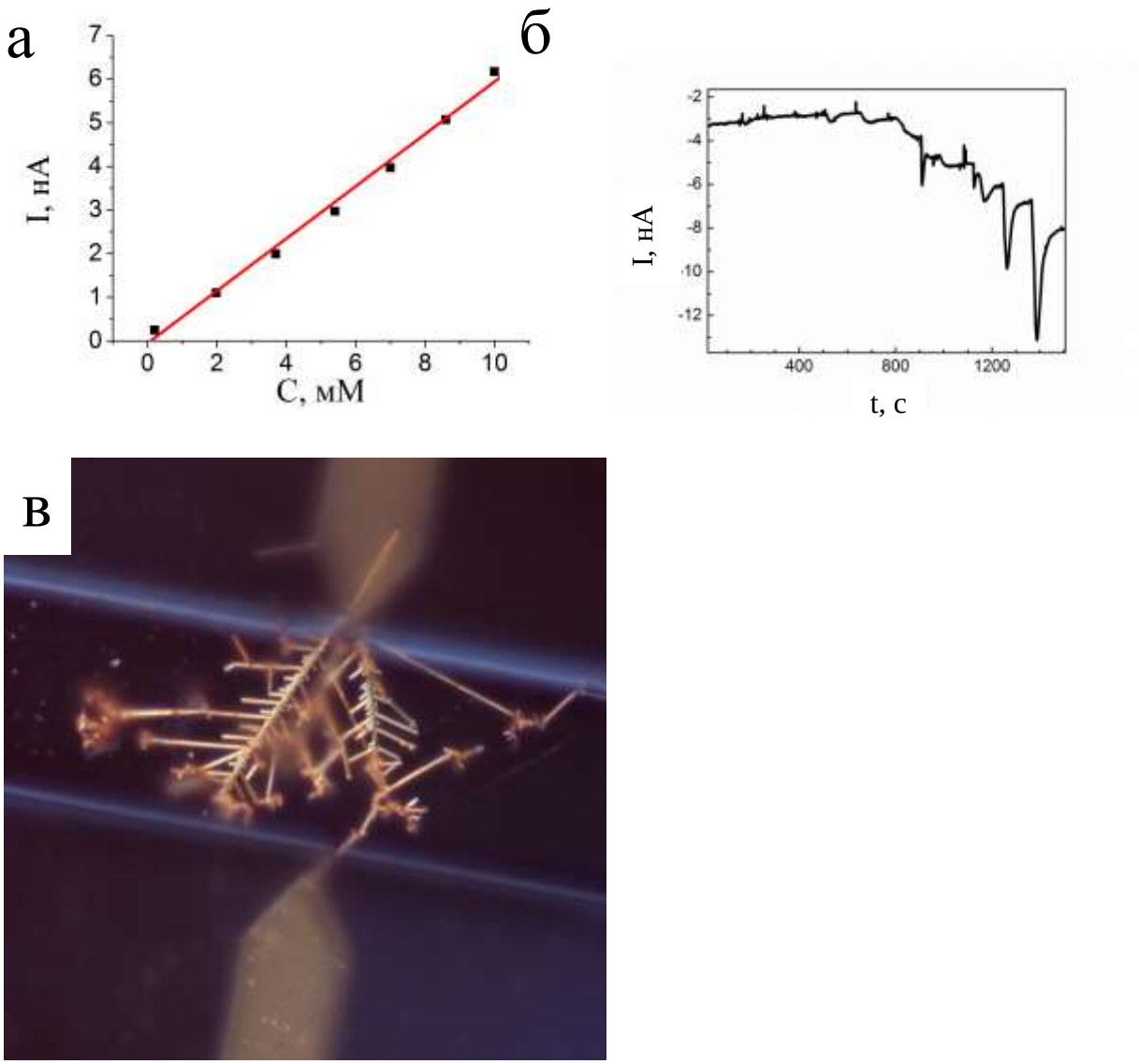


Рисунок 48. Амперограмма измерений добавок пероксида водорода на наноструктурированном УМЭ Au (а), градуировочная зависимость тока восстановления золота от концентрации пероксида водорода (б), фотография наноструктурированного УМЭ золота в оптическом микроскопе (в).

Наноструктурированные УМЭ Pd и Au использовались в качестве электродов для детектирования пероксида водорода. Это позволило повысить чувствительность бесферментного сенсора и достичь низких педелов обнаружения при использовании малых объемов раствора (до 100 мкл) (таблица 12). Однако оба электрода имеют небольшой интервал линейной зависимости тока восстановления металлов от концентрации пероксида водорода.

Таблица 12. Аналитические характеристики бесферментных электрохимических сенсоров для определения пероксида водорода. ЛИ – линейный интервал; ПО – предел обнаружения; S – чувствительность; $E_{дет}$ – потенциал детектирования; НЧ – наночастицы; НС – наноструктуры; МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки; ПАН – полианилин; ОГ - оксид графена..

модификатор электрода	ЛИ, М	ПО, М	S, мА·мМ$^{-1}$·см$^{-2}$	$E_{дет}$, В	Ссылка
НС УМЭ Au	$2{,}0\cdot10^{-4}\div1{,}0\cdot10^{-2}$	$5{,}9\cdot10^{-5}$	0,052	0,48	данная работа
НС УМЭ Pd	$1{,}0\cdot10^{-5}\div7{,}9\cdot10^{-3}$	$6{,}0\cdot10^{-6}$	0,162	-0,2	данная работа
НС УМЭ Pd/Au	$1{,}0\cdot10^{-6}\div1{,}0\cdot10^{-3}$	$2{,}4\cdot10^{-7}$	4,176	-0,05	данная работа
НЧ $Au_{73}Ag_{27}$	$1{,}0\cdot10^{-5}\div7{,}0\cdot10^{-5}$	$1{,}0\cdot10^{-6}$	0,008 мА·мМ$^{-1}$	-0,65	[162]
НЧ Pd	$1{,}0\cdot10^{-6}\div8{,}2\cdot10^{-4}$	$6{,}8\cdot10^{-7}$	-	-0,45	[163]
НЧ Pt/МУНТ-ПАН	$7{,}0\cdot10^{-6}\div2{,}5\cdot10^{-3}$	$2{,}0\cdot10^{-6}$	0,748	-0,25	[164]
НЧ Ag /хитозан-ОГ	$6{,}0\cdot10^{-6}\div1{,}8\cdot10^{-2}$	$7{,}0\cdot10^{-7}$	0,0624 мА·мМ$^{-1}$	-0,40	[165]

Динамическоий диапазон концентраций пероксида водорода для УМЭ Pd охватывает более низкую область концентраций, чем Au. Для Au наноструктурированного УМЭ, диапазон линейной зависимости концентрации находится в области более высоких концентраций пероксида водорода. Можно ожидать, что на наноструктурированном УМЭ сплава Pd-Au диапазон линейной

зависимости концентраций пероксида водорода будет находиться в более широком интервале, а также проявится кумулятивный эффект и возрастет чувствительность бесферментного электрохимического сенсора.

Определение пероксида водорода на Pd-Au наноструктурированном электроде. Определение пероксида водорода на наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au (см. рисунок 49а) выполняли в фоновом растворе фосфатного буфера (pH 7,2) в ячейке объемом 100 мкл методом амперометрии (см. рисунок 49б). Определение пероксида водорода проводилось на наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au, методом амперометрии при потенциале минус 0,05 В. Потенциал детектирования был выбран в более отрицательной области, чтобы происходило восстановление оксидных форм обоих металлов (см. рисунок 49в). По полученным данным были построены градуировочные зависимости (см. рисунок 49г).

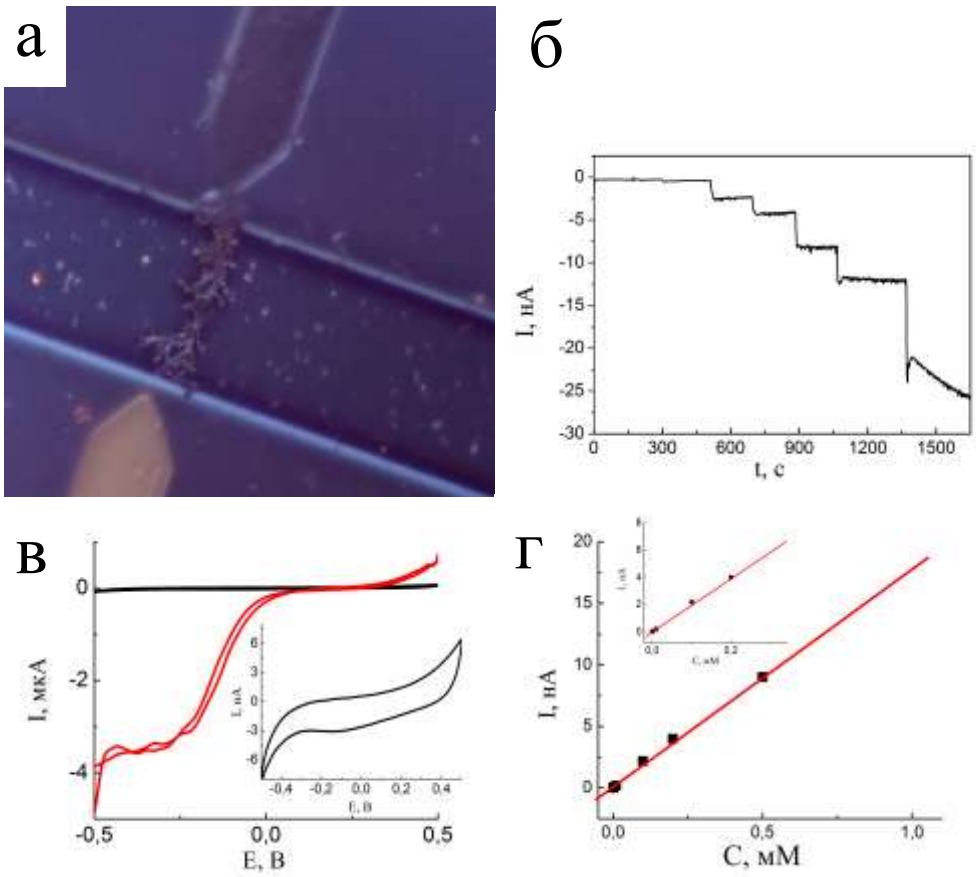


Рисунок 49. Фотография сплава Pd-Au в оптическом микроскопе (а), амперограмма измерений добавок пероксида водорода на наноструктурированном электроде сплава Pd-Au (б), циклическая вольтамперограмма сплава Pd-Au в растворе фонового электролита и с добавкой пероксида водорода в ячейке $1{\cdot}10^{-2}$М(в), градуировочная зависимость тока восстановления сплава Pd-Au от концентрации пероксида водорода (г).

Проанализировав все вышеперечисленные данные, полученные при определениии пероксида водорода на наноструктурированных УМЭ (таблица 12), можно сделать вывод о том, что полученные амперометрические сенсоры на основе наноструктурированных УМЭ Pd, Au и сплава Pd-Au могут быть использованы для высокочувствительного и точного детектирования уровня пероксида водорода в объеме 100 мкл.

Чувствительность наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au много выше по сравнению с Au наноструктурированными УМЭ ($5{,}7{\cdot}10^{-7}$ А/мМ) и Pd ($5{,}4{\cdot}10^{-7}$

А/мМ). В [20] при определении пероксида водорода на кристаллах палладия на наночастицах золота, при том же потенциале детектирования, линейный интервал зависимости концентрации пероксида водорода составил от 1мкМ до 10 мМ. Чувствительность бесферментных сенсоров представленных в литературе [166] схожа и составляет 17,4 мкА/мМ. Предел обнаружения на порядок ниже для синтезированных наноструктурированных УМЭ сплава Pd-Au, чем полученный на нанокристаллах [166] (1 мкМ). Таким образом, были получены амперометрические сенсоры для определения пероксида водорода с большей чувствительностью, чем в литературе [101, 102].

Полученная высокая чувствительность в сочетании с малым объемом раствора (до 100 мкл) позволили использовать наноструктурированные УМЭ для электрохимического определения пероксида водорода, в том числе в биологических жидкостях.

4.2.2. Определение внеклеточной концентрации пероксида водорода при гипоксии клеток HL-1

Для проверки биосовместимости бесферментного электрохимического сенсора для определения пероксида водорода был использован метод гипоксии клеточных культур на поверхности подложки с наноструктурированным УМЭ. В качестве клеточной культуры использовали раковые клетки сердечных мышц HL-1. Количество клеток на чипах составляло $\approx 0.036 \cdot 10^6$. В процессе гипоксии в клетках появляется недостаток кислорода, что приводит к остановке метаболических процессов. При возобновлении потребления кислорода в клетках происходит более интенсивный процесс метаболизма и это приводит к увеличению концентрации пероксида водорода во внутриклеточной и внеклеточной средах. Гипоксию клеток проводили деаэрированием аргоном в течение 5 и 10 минут, после этого ячейку для измерений продували 100 мл воздуха, для насыщения кислородом. Затем измеряли ток восстановления пероксида водорода на электроде. В качестве

раствора фонового электролита использовали раствор состава: NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, Na_2HPO_4 8 мМ, KH_2PO_4 1,8 мМ. Данный раствор используется для моделирования биологических сред организма человека. Для данного фонового электролита по циклической вольтамперограмме на наноструктурированном УМЭ сплава Pd-Au бы выбран потенциал детектирования пероксида водорода, который составил минус 0,15 В. Измерения проводили методом амперометрии в течение 60 секунд (рисунок 49а) на наноструктурированном УМЭ сплава Pd-Au (рисунок 49б).

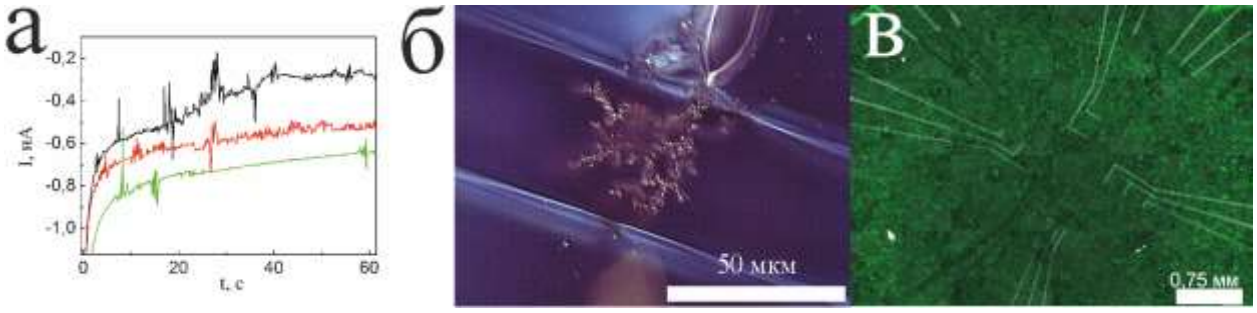


Рисунок 49. Амперограмма электровосстановления пероксида водорода в фоновом растворе (черная линия), после гипоксии клеток в течение 5 минут (красная линия), после гипоксии в течение 10 минут (зеленая линия) на наноструктурированном УМЭ Pd-Au (б). Изображение в оптическом микроскопе поверхности подложки с наноструктурированным УМЭ, покрытые клетками HL-1.

Для определения концентрации пероксида водорода, выделившегося в результате гипоксии, были сделаны две стандартные добавки раствора пероксида водорода. Концентрации, полученные при расчетах, представлены в таблице 13.

Таблица 13. Расчет внеклеточной концентрации пероксида водорода методом стандартных добавок.

	I (A)	C (M)
5 мин. гипоксии	$-6{,}3\cdot10^{-10}$	$(2{,}90\pm0{,}04)\cdot10^{-4}$
10 мин. гипоксии	$-7{,}8\cdot10^{-10}$	$(3{,}00\pm0{,}03)\cdot10^{-4}$
1-я станд. добавка	$4{,}0\cdot10^{-9}$	$(5{,}00\pm0{,}05)\cdot10^{-4}$
2-я станд. добавка	$1{,}2\cdot10^{-8}$	$(1{,}00\pm0{,}03)\cdot10^{-3}$

Данные значения концентраций пероксида водорода во многом согласуются с литературными данными [167]. Таким образом была показана применимость наноструктурированных УМЭ при изучении оксидативного стресса в малом объеме раствора, что особенно важно при работе в среде клеточных культур.

Выводы

- предложен способ активации поверхности наноструктур золота реагентом Меервейна, приводящий к существенному увеличению эффективной площади поверхности электрода (в пять раз), модифицированного наноструктурами золота
- разработан вольтамперометрический сенсор на основе наноструктур золота, обладающий высокой стабильностью относительно тонкопленочного золотого электрода. На примере определения глюкозы получены такие аналитические характеристики как интервал линейной зависимости концентрации глюкозы (от 0,06 до 18,5 мМ), предел обнаружения (0,02 мМ) и чувствительность (15,0 мкА/(мМ·см^2))

- разработаны амперометрические сенсоры на основе наноструктурированных УМЭ Au, Pd и их сплава. На примере бесферментного определения H_2O_2 показана их высокая чувствительность (4,176 мА·мМ$^{-1}$см$^{-2}$) и низкий предел обнаружения ($2{,}4\cdot10^{-7}$ М), а также применимость при определении гипоксии клеток.

Список литературы

1. Capetanopoulos C. D. Gas sensors and method of using same // Book Gas sensors and method of using same / EditorGoogle Patents, 1998.

2. Pratt K. F. E., Chapples J., Jones M., Costea S. D., Gologanu M. Methods of operation of electrochemical gas sensors // Book Methods of operation of electrochemical gas sensors / EditorGoogle Patents, 2012.

3. Karyakin A. Chaper 13 - Chemical and biological sensors based on electroactive inorganic polycrystals // Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications / Wang X. Z. J. – San Diego: Academic Press, 2008. – С. 411-439.

4. Biosensors: Essentials. Analytical and Bioanalytical Chemistry. / Moreno-Bondi M.; Под ред. Evtugyn G.: Springer Berlin Heidelberg, 2014. Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 1-2 с.

5. Возможности электроаналитической химии в решении проблем фармацевтического анализа. / Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. – Москва: АРГАМАК-МЕДИА, 2013.

6. Амперометрические сенсоры с каталитическими свойствами в органической вольтамперометрии. / Шайдарова Л. Г., Будников Г. К. – Москва: Наука, 2011.

7. О химическом анализе в медицинской диагностике. / Будников Г. К., Зиятдинова Г. К. – Москва: Наука, 2010.

8. Krivetskiy V. V., Rumyantseva M. N., Gaskov A. M. Chemical modification of nanocrystalline tin dioxide for selective gas sensors // Russian Chemical Reviews. – 2013. – Т. 82, № 10. – С. 917.

9. Mikhelson K. N., Peshkova M. A. Advances and trends in ionophore-based chemical sensors // Russian Chemical Reviews. – 2015. – Т. 84, № 6. – С. 555.

10. Будников Г. К. Что такое химические сенсоры // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – Т. 3. – С. 72.
11. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. / Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н.; Под ред. Беленькая И. С. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2010.
12. Chen S., Yuan R., Chai Y., Hu F. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: a review // Microchimica Acta. – 2013. – Т. 180, № 1-2. – С. 15-32.
13. Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Под ред. Alwan D. A.: World Health Organization, 2011. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
14. Clark L. C., Wolf R., Granger D., Taylor Z. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography // Journal of Applied Physiology. – 1953. – Т. 6, № 3. – С. 189-193.
15. Updike S. J., Hicks G. P. The Enzyme Electrode // Nature. – 1967. – Т. 214, № 5092. – С. 986-988.
16. Guilbault G. G., Lubrano G. J. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose // Analytica Chimica Acta. – 1973. – Т. 64, № 3. – С. 439-455.
17. Wang J. CHAPTER 3 - Electrochemical glucose biosensors // Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. – San Diego: Academic Press, 2008. – С. 57-69.
18. Gough D. A., Lucisano J. Y., Tse P. H. S. Two-dimensional enzyme electrode sensor for glucose // Analytical Chemistry. – 1985. – Т. 57, № 12. – С. 2351-2357.
19. Armour J. C., Lucisano J. Y., McKean B. D., Gough D. A. Application of Chronic Intravascular Blood Glucose Sensor in Dogs // Diabetes. – 1990. – Т. 39, № 12. – С. 1519-1526.
20. Degani Y., Heller A. Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. I. Electron transfer from glucose oxidase to metal

electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme // The Journal of Physical Chemistry. – 1987. – Т. 91, № 6. – С. 1285-1289.
21. Willner I., Heleg-Shabtai V., Blonder R., Katz E., Tao G., Bückmann A. F., Heller A. Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Т. 118, № 42. – С. 10321-10322.
22. Das P., Das M., Chinnadayyala S. R., Singha I. M., Goswami P. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications // Biosensors & Bioelectronics. – 2016. – Т. 79. – С. 386-397.
23. Liu Q., Lu X., Li J., Yao X., Li J. Direct electrochemistry of glucose oxidase and electrochemical biosensing of glucose on quantum dots/carbon nanotubes electrodes // Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – Т. 22, № 12. – С. 3203-3209.
24. Liu M., Shi G., Zhang L., Cheng Y., Jin L. Quantum dots modified electrode and its application in electroanalysis of hemoglobin // Electrochemistry Communications. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 305-310.
25. Химические и биохимические сенсоры: от биосенсоров к биочипам и мультисигнальным сисмтемам. / Брайнина Х. З., Козицына А. Н. – Москва: Изд-во Наука, 2011. – с. 314 с.
26. Joachim C. To be nano or not to be nano? // Nat Mater. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 107-109.
27. del Alamo J. A. Nanometre-scale electronics with III-V compound semiconductors // Nature. – 2011. – Т. 479, № 7373. – С. 317-323.
28. Arico A. S., Bruce P., Scrosati B., Tarascon J.-M., van Schalkwijk W. Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices // Nat Mater. – 2005. – Т. 4, № 5. – С. 366-377.
29. Campbell F. W., Compton R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2010. – Т. 396, № 1. – С. 241-259.

30. Pingarrón J. M., Yáñez-Sedeño P., González-Cortés A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors // Electrochimica Acta. – 2008. – T. 53, № 19. – C. 5848-5866.
31. Siqueira Jr J. R., Caseli L., Crespilho F. N., Zucolotto V., Oliveira Jr O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing // Biosensors and Bioelectronics. – 2010. – T. 25, № 6. – C. 1254-1263.
32. Matharu Z., Bandodkar A. J., Gupta V., Malhotra B. D. Fundamentals and application of ordered molecular assemblies to affinity biosensing // Chemical Society Reviews. – 2012. – T. 41, № 3. – C. 1363-1402.
33. Katz E., Willner I., Wang J. Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles // Electroanalysis. – 2004. – T. 16, № 1-2. – C. 19-44.
34. Liu Y., Dong X., Chen P. Biological and chemical sensors based on graphene materials // Chemical Society Reviews. – 2012. – T. 41, № 6. – C. 2283-2307.
35. Welch C., Compton R. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2006. – T. 384, № 3. – C. 601-619.
36. Wang J. Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles // Microchimica Acta. – 2012. – T. 177, № 3-4. – C. 245-270.
37. Stozhko N. Y., Malakhova N. A., Byzov I. V., Brainina K. Z. Electrodes in stripping voltammetry: from a macro- to a micro- and nano-structured surface // Journal of Analytical Chemistry. – 2009. – T. 64, № 11. – C. 1148-1157.
38. Kahk J. M., Rees N. V., Pillay J., Tshikhudo R., Vilakazi S., Compton R. G. Electron transfer kinetics at single nanoparticles // Nano Today. – 2012. – T. 7, № 3. – C. 174-179.
39. Understanding Voltammetry: Simulation of Electrode Processes. / Compton R. G., Laborda E., Ward K. R.: Imperial College Press, 2013.
40. Arrigan D. W. M. Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications // Analyst. – 2004. – T. 129, № 12. – C. 1157-1165.
41. Campbell F., Compton R. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2010. – T. 396, № 1. – C. 241-259.

42. Streeter I., Compton R. G. Diffusion-Limited Currents to Nanoparticles of Various Shapes Supported on an Electrode; Spheres, Hemispheres, and Distorted Spheres and Hemispheres // The Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – Т. 111, № 49. – С. 18049-18054.
43. Campbell F. W., Belding S. R., Baron R., Xiao L., Compton R. G. Hydrogen Peroxide Electroreduction at a Silver-Nanoparticle Array: Investigating Nanoparticle Size and Coverage Effects // The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – Т. 113, № 21. – С. 9053-9062.
44. Ward Jones S. E., Campbell F. W., Baron R., Xiao L., Compton R. G. Particle Size and Surface Coverage Effects in the Stripping Voltammetry of Silver Nanoparticles: Theory and Experiment // The Journal of Physical Chemistry C. – 2008. – Т. 112, № 46. – С. 17820-17827.
45. Fan F.-R. F., Kwak J., Bard A. J. Single Molecule Electrochemistry // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Т. 118, № 40. – С. 9669-9675.
46. Fan F.-R. F., Bard A. J. Electrochemical Detection of Single Molecules // Science. – 1995. – Т. 267, № 5199. – С. 871-874.
47. Amatore C., Bouret Y., Maisonhaute E., Goldsmith J. I., Abruña H. D. Ultrafast Voltammetry of Adsorbed Redox Active Dendrimers with Nanometric Resolution: An Electrochemical Microtome // ChemPhysChem. – 2001. – Т. 2, № 2. – С. 130-134.
48. Amatore C., Grün F., Maisonhaute E. Electrochemistry within a Limited Number of Molecules: Delineating the Fringe Between Stochastic and Statistical Behavior // Angewandte Chemie International Edition. – 2003. – Т. 42, № 40. – С. 4944-4947.
49. Gokoglan T. C., Soylemez S., Kesik M., Toksabay S., Toppare L. Selenium containing conducting polymer based pyranose oxidase biosensor for glucose detection // Food Chemistry. – 2015. – Т. 172, № 0. – С. 219-224.
50. Attar A., Emilia Ghica M., Amine A., Brett C. M. A. Poly(neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements // Journal of Hazardous Materials. – 2014. – Т. 279, № 0. – С. 348-355.
51. Cabaj J., Sooducho J. Layered Biosensor Construction //. – 2013.10.5772/52568.

52. Koposova E., Liu X., Kisner A., Ermolenko Y., Shumilova G., Offenhäusser A., Mourzina Y. Bioelectrochemical systems with oleylamine-stabilized gold nanostructures and horseradish peroxidase for hydrogen peroxide sensor // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – T. 57. – C. 54-58.
53. Koposova E., Shumilova G., Ermolenko Y., Kisner A., Offenhäusser A., Mourzina Y. Direct electrochemistry of cyt c and hydrogen peroxide biosensing on oleylamine- and citrate-stabilized gold nanostructures // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – T. 207, Part B. – C. 1045-1052.
54. Navolotskaya D. V., Toh H. S., Batchelor–McAuley C., Compton R. G. Voltammetric Study of the Influence of Various Phosphate Anions on Silver Nanoparticle Oxidation // ChemistryOpen. – 2015.10.1002/open.201500100. – C. n/a-n/a.
55. Nikolaev K., Ermakov S., Ermolenko Y., Averyaskina E., Offenhäusser A., Mourzina Y. A novel bioelectrochemical interface based on in situ synthesis of gold nanostructures on electrode surfaces and surface activation by Meerwein's salt. A bioelectrochemical sensor for glucose determination // Bioelectrochemistry. – 2015. – T. 105. – C. 34-43.
56. Nikolaev K. G., Ermakov S. S., Offenhäusser A., Mourzina Y. Activation of gold nanostructures with Meerwein's salt // Mendeleev Communications. – 2014. – T. 24, № 3. – C. 145-146.
57. Bracamonte M. V., Bollo S., Labbé P., Rivas G. A., Ferreyra N. F. Quaternized chitosan as support for the assembly of gold nanoparticles and glucose oxidase: Physicochemical characterization of the platform and evaluation of its biocatalytic activity // Electrochimica Acta. – 2011. – T. 56, № 3. – C. 1316-1322.
58. Crespilho F. N., Emilia Ghica M., Florescu M., Nart F. C., Oliveira O. N., Brett C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer–gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator // Electrochemistry Communications. – 2006. – T. 8, № 10. – C. 1665-1670.
59. Crespilho F. N., Nart F. C., Oliveira O. N., Brett C. M. A. Oxygen reduction and diffusion in electroactive nanostructured membranes (ENM) using a layer-by-layer

dendrimer-gold nanoparticle approach // Electrochimica Acta. – 2007. – Т. 52, № 14. – С. 4649-4653.
60. Crespilho F. N., Ghica M. E., Gouveia-Caridade C., Oliveira O. N., Jr., Brett C. M. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): optimised architectures for biosensing // Talanta. – 2008. – Т. 76, № 4. – С. 922-8.
61. Dondapati S. K., Lozano-Sanchez P., Katakis I. Controlled electrophoretic deposition of multifunctional nanomodules for bioelectrochemical applications // Biosens Bioelectron. – 2008. – Т. 24, № 1. – С. 55-9.
62. Si P., Kannan P., Guo L., Son H., Kim D. H. Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures // Biosens Bioelectron. – 2011.10.1016/j.bios.2011.02.044.
63. Sun J., Zhu Y., Yang X., Li C. Photoelectrochemical glucose biosensor incorporating CdS nanoparticles // Particuology. – 2009. – Т. 7, № 5. – С. 347-352.
64. Flexer V., Calvo E. J., Bartlett P. N. The application of the relaxation and simplex method to the analysis of data for glucose electrodes based on glucose oxidase immobilised in an osmium redox polymer // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2010. – Т. 646, № 1-2. – С. 24-32.
65. Li W., Yuan R., Chai Y., Zhong H., Wang Y. Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose // Electrochimica Acta. – 2011. – Т. 56, № 11. – С. 4203-4208.
66. Chen H., Xi F., Gao X., Chen Z., Lin X. Bienzyme bionanomultilayer electrode for glucose biosensing based on functional carbon nanotubes and sugar-lectin biospecific interaction // Anal Biochem. – 2010. – Т. 403, № 1-2. – С. 36-42.
67. Dalmasso P. R., Pedano M. L., Rivas G. A. Supramolecular architecture based on the self-assembling of multiwall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine and glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing // Biosens Bioelectron. – 2013. – Т. 39, № 1. – С. 76-81.

68. Deng L., Shang L., Wang Y., Wang T., Chen H., Dong S. Multilayer structured carbon nanotubes/poly-l-lysine/laccase composite cathode for glucose/O2 biofuel cell // Electrochemistry Communications. – 2008. – Т. 10, № 7. – С. 1012-1015.
69. Deng C., Chen J., Nie Z., Si S. A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode // Biosens Bioelectron. – 2010. – Т. 26, № 1. – С. 213-9.
70. Gao Q., Guo Y., Liu J., Yuan X., Qi H., Zhang C. A biosensor prepared by co-entrapment of a glucose oxidase and a carbon nanotube within an electrochemically deposited redox polymer multilayer // Bioelectrochemistry. – 2011. – Т. 81, № 2. – С. 109-13.
71. Huang J., Yang Y., Shi H., Song Z., Zhao Z., Anzai J.-i., Osa T., Chen Q. Multi-walled carbon nanotubes-based glucose biosensor prepared by a layer-by-layer technique // Materials Science and Engineering: C. – 2006. – Т. 26, № 1. – С. 113-117.
72. Komathi S., Gopalan A. I., Lee K. P. Fabrication of a novel layer-by-layer film based glucose biosensor with compact arrangement of multi-components and glucose oxidase // Biosens Bioelectron. – 2009. – Т. 24, № 10. – С. 3131-4.
73. Liu G., Lin Y. Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes // Electrochemistry Communications. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 251-256.
74. Sun Y., Wang H., Sun C. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer covalent attachment of AMWNTs and IO(4)(-)-oxidized GOx // Biosens Bioelectron. – 2008. – Т. 24, № 1. – С. 22-8.
75. Wang Y., Wang X., Wu B., Zhao Z., Yin F., Li S., Qin X., Chen Q. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in poly(diallyldimethylammonium chloride) for preparation of a glucose biosensor // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2008. – Т. 130, № 2. – С. 809-815.
76. Moraes M. L., Petri L., Oliveira V., Olivati C. A., de Oliveira M. C. F., Paulovich F. V., Oliveira O. N., Ferreira M. Detection of glucose and triglycerides using information visualization methods to process impedance spectroscopy data // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2012. – Т. 166-167. – С. 231-238.

77. Salimi A., Noorbakhsh A. Layer by layer assembly of glucose oxidase and thiourea onto glassy carbon electrode: Fabrication of glucose biosensor // Electrochimica Acta. – 2011. – T. 56, № 17. – C. 6097-6105.
78. Sun Y., Yan F., Yang W., Sun C. Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment // Biomaterials. – 2006. – T. 27, № 21. – C. 4042-9.
79. Chen X., Yan X., Khor K. A., Tay B. K. Multilayer assembly of positively charged polyelectrolyte and negatively charged glucose oxidase on a 3D Nafion network for detecting glucose // Biosens Bioelectron. – 2007. – T. 22, № 12. – C. 3256-60.
80. Gonzalez-Macia L., Smyth M. R., Killard A. J. Evaluation of a silver-based electrocatalyst for the determination of hydrogen peroxide formed via enzymatic oxidation // Talanta. – 2012. – T. 99. – C. 989-96.
81. Wu B. Y., Hou S. H., Yin F., Li J., Zhao Z. X., Huang J. D., Chen Q. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode // Biosens Bioelectron. – 2007. – T. 22, № 6. – C. 838-44.
82. Zhai Y., Zhai S., Chen G., Zhang K., Yue Q., Wang L., Liu J., Jia J. Effects of morphology of nanostructured ZnO on direct electrochemistry and biosensing properties of glucose oxidase // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2011. – T. 656, № 1-2. – C. 198-205.
83. Zhang W., Huang Y., Dai H., Wang X., Fan C., Li G. Tuning the redox and enzymatic activity of glucose oxidase in layered organic films and its application in glucose biosensors // Anal Biochem. – 2004. – T. 329, № 1. – C. 85-90.
84. Zhao H., Ju H. Multilayer membranes for glucose biosensing via layer-by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes and glucose oxidase // Anal Biochem. – 2006. – T. 350, № 1. – C. 138-44.
85. Liu S., Ju H. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode // Biosensors and Bioelectronics. – 2003. – T. 19, № 3. – C. 177-183.

86. Ivnitski D., Branch B., Atanassov P., Apblett C. Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer // Electrochemistry Communications. – 2006. – T. 8, № 8. – C. 1204-1210.
87. Si P., Kannan P., Guo L., Son H., Kim D.-H. Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – T. 26, № 9. – C. 3845-3851.
88. Lu Y., Yang M., Qu F., Shen G., Yu R. Enzyme-functionalized gold nanowires for the fabrication of biosensors // Bioelectrochemistry. – 2007. – T. 71, № 2. – C. 211-216.
89. Wu B.-Y., Hou S.-H., Yin F., Li J., Zhao Z.-X., Huang J.-D., Chen Q. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode // Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – T. 22, № 6. – C. 838-844.
90. Ozoemena K. I., Nyokong T. Comparative electrochemistry and electrocatalytic activities of cobalt, iron and manganese phthalocyanine complexes axially co-ordinated to mercaptopyridine self-assembled monolayer at gold electrodes // Electrochimica Acta. – 2006. – T. 51, № 13. – C. 2669-2677.
91. Sampath S., Lev O. Inert Metal-Modified, Composite Ceramic−Carbon, Amperometric Biosensors: Renewable, Controlled Reactive Layer // Analytical Chemistry. – 1996. – T. 68, № 13. – C. 2015-2021.
92. Lynn M. Inorganic support intermediates: covalent coupling of enzymes on inorganic supports // Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides. – 1975. – C. 1-48.
93. Schröper F., Brüggemann D., Mourzina Y., Wolfrum B., Offenhäusser A., Mayer D. Analyzing the electroactive surface of gold nanopillars by electrochemical methods for electrode miniaturization // Electrochimica Acta. – 2008. – T. 53, № 21. – C. 6265-6272.
94. Kisner A., Lenk S., Mayer D., Mourzina Y., Offenhäusser A. Determination of the Stability Constant of the Intermediate Complex during the Synthesis of Au Nanoparticles Using Aurous Halide // The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – T. 113, № 47. – C. 20143-20147.

95. Halder A., Ravishankar N. Gold Nanostructures from Cube-Shaped Crystalline Intermediates // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – Т. 110, № 13. – С. 6595-6600.
96. Halder A., Ravishankar N. Ultrafine Single-Crystalline Gold Nanowire Arrays by Oriented Attachment // Advanced Materials. – 2007. – Т. 19, № 14. – С. 1854-1858.
97. Love J. C., Estroff L. A., Kriebel J. K., Nuzzo R. G., Whitesides G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology // Chemical Reviews. – 2005. – Т. 105, № 4. – С. 1103-1170.
98. Dhara K., Ramachandran T., Nair B. G., Babu T. G. S. Au nanoparticles decorated reduced graphene oxide for the fabrication of disposable nonenzymatic hydrogen peroxide sensor // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2016. – Т. 764. – С. 64-70.
99. Mei H., Wu W. Q., Yu B. B., Wu H. M., Wang S. F., Xia Q. H. Nonenzymatic electrochemical sensor based on Fe@Pt core-shell nanoparticles for hydrogen peroxide, glucose and formaldehyde // Sensors and Actuators B-Chemical. – 2016. – Т. 223. – С. 68-75.
100. Wu Q., Sheng Q. L., Zheng J. B. Nonenzymatic sensing of glucose using a glassy carbon electrode modified with halloysite nanotubes heavily loaded with palladium nanoparticles // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2016. – Т. 762. – С. 51-58.
101. Chen S. H., Yuan R., Chai Y. Q., Hu F. X. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: a review // Microchimica Acta. – 2013. – Т. 180, № 1-2. – С. 15-32.
102. Chen X. M., Wu G. H., Cai Z. X., Oyama M., Chen X. Advances in enzyme-free electrochemical sensors for hydrogen peroxide, glucose, and uric acid // Microchimica Acta. – 2014. – Т. 181, № 7-8. – С. 689-705.
103. Moozarm Nia P., Lorestani F., Meng W. P., Alias Y. A novel non-enzymatic H2O2 sensor based on polypyrrole nanofibers–silver nanoparticles decorated reduced graphene oxide nano composites // Applied Surface Science. – 2015. – Т. 332. – С. 648-656.
104. Anwar N., McCormac T., Compain J. D., Mialane P., Dolbecq A., Laffir F. Surface immobilisation of the sandwich type

Na14[Fe4(Ox)4(H2O)2(SbW9O33)2]·60H2O polyoxometalate // Electrochimica Acta. – 2012. – Т. 59. – С. 1-7.
105. Kong X., Zhao J., Han J., Zhang D., Wei M., Duan X. Fabrication of Naphthol green B/layered double hydroxide nanosheets ultrathin film and its application in electrocatalysis // Electrochimica Acta. – 2011. – Т. 56, № 3. – С. 1123-1129.
106. Shao M., Han J., Shi W., Wei M., Duan X. Layer-by-layer assembly of porphyrin/layered double hydroxide ultrathin film and its electrocatalytic behavior for H2O2 // Electrochemistry Communications. – 2010. – Т. 12, № 8. – С. 1077-1080.
107. Sun Y., Bai Y., Yang W., Sun C. Controlled multilayer films of sulfonate-capped gold nanoparticles/thionine used for construction of a reagentless bienzymatic glucose biosensor // Electrochimica Acta. – 2007. – Т. 52, № 25. – С. 7352-7361.
108. Baioni A. P., Vidotti M., Fiorito P. A., Córdoba de Torresi S. I. Copper hexacyanoferrate nanoparticles modified electrodes: A versatile tool for biosensors // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2008. – Т. 622, № 2. – С. 219-224.
109. Miao Y., Wang H., Shao Y., Tang Z., Wang J., Lin Y. Layer-by-layer assembled hybrid film of carbon nanotubes/iron oxide nanocrystals for reagentless electrochemical detection of H2O2 // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2009. – Т. 138, № 1. – С. 182-188.
110. Koodlur L. S. Layer-by-layer self assembly of a water-soluble phthalocyanine on gold. Application to the electrochemical determination of hydrogen peroxide // Bioelectrochemistry. – 2013. – Т. 91. – С. 21-7.
111. Pillay J., Ozoemena K. I. Layer-by-layer self-assembled nanostructured phthalocyaninatoiron(II)/SWCNT-poly(m-aminobenzenesulfonic acid) hybrid system on gold surface: Electron transfer dynamics and amplification of H2O2 response // Electrochimica Acta. – 2009. – Т. 54, № 22. – С. 5053-5059.
112. Dontsova E. A., Zeifman Y. S., Budashov I. A., Eremenko A. V., Kalnov S. L., Kurochkin I. N. Screen-printed carbon electrode for choline based on MnO2 nanoparticles and choline oxidase/polyelectrolyte layers // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2011. – Т. 159, № 1. – С. 261-270.

113. Hornok V., Dekany I. Synthesis and stabilization of Prussian blue nanoparticles and application for sensors // J Colloid Interface Sci. – 2007. – T. 309, № 1. – C. 176-82.
114. Miao X., Hu N. pH-tunable bioelectrocatalysis based on layer-by-layer films assembled with TiO2 nanoparticles and poly(allylamine hydrochloride) // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2011. – T. 660, № 1. – C. 114-120.
115. Saadati S., Salimi A., Hallaj R., Rostami A. Layer by layer assembly of catalase and amine-terminated ionic liquid onto titanium nitride nanoparticles modified glassy carbon electrode: study of direct voltammetry and bioelectrocatalytic activity // Anal Chim Acta. – 2012. – T. 753. – C. 32-41.
116. Feng J. J., Xu J. J., Chen H. Y. Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin adsorbed on mesoporous carbon through layer-by-layer assembly // Biosens Bioelectron. – 2007. – T. 22, № 8. – C. 1618-24.
117. Li F., Shan C., Bu X., Shen Y., Yang G., Niu L. Fabrication and electrochemical characterization of electrostatic assembly of polyelectrolyte-functionalized ionic liquid and Prussian blue ultrathin films // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2008. – T. 616, № 1-2. – C. 1-6.
118. Chang H., Wang X., Shiu K. K., Zhu Y., Wang J., Li Q., Chen B., Jiang H. Layer-by-layer assembly of graphene, Au and poly(toluidine blue O) films sensor for evaluation of oxidative stress of tumor cells elicited by hydrogen peroxide // Biosens Bioelectron. – 2013. – T. 41. – C. 789-94.
119. Xiang C., Zou Y., Sun L. X., Xu F. Direct electrochemistry and electrocatalysis of cytochrome c immobilized on gold nanoparticles-chitosan-carbon nanotubes-modified electrode // Talanta. – 2007. – T. 74, № 2. – C. 206-11.
120. Ozturk B., Talukdar I., Flanders B. N. The directed-assembly of CdS interconnects between targeted points in a circuit // Applied Physics Letters. – 2005. – T. 86, № 18. – C. 183105.
121. Ji J., Li P., Sang S., Zhang W., Zhou Z., Yang X., Dong H., Li G., Hu J. Electrodeposition of Au/Ag bimetallic dendrites assisted by Faradaic AC-electroosmosis flow // AIP Advances. – 2014. – T. 4, № 3. – C. 031329.

122. Birol O., Bret N. F., Daniel R. G., Tetsuya D. M. Single-step growth and low resistance interconnecting of gold nanowires // Nanotechnology. – 2007. – Т. 18, № 17. – С. 175707.
123. Birol O., Ishan T., Bret N. F. Directed growth of diameter-tunable nanowires // Nanotechnology. – 2007. – Т. 18, № 36. – С. 365302.
124. Nerowski A., Poetschke M., Bobeth M., Opitz J., Cuniberti G. Dielectrophoretic Growth of Platinum Nanowires: Concentration and Temperature Dependence of the Growth Velocity // Langmuir. – 2012. – Т. 28, № 19. – С. 7498-7504.
125. Zhang M., Yang X., Zhou Z., Ye X. Controllable growth of gold nanowires and nanoactuators via high-frequency AC electrodeposition // Electrochemistry Communications. – 2013. – Т. 27. – С. 133-136.
126. Talukdar I., Ozturk B., Flanders B. N., Mishima T. D. Directed growth of single-crystal indium wires // Applied Physics Letters. – 2006. – Т. 88, № 22. – С. 221907.
127. Ranjan N., Vinzelberg H., Mertig M. Growing One-Dimensional Metallic Nanowires by Dielectrophoresis // Small. – 2006. – Т. 2, № 12. – С. 1490-1496.
128. Bangar M. A., Ramanathan K., Yun M., Lee C., Hangarter C., Myung N. V. Controlled Growth of a Single Palladium Nanowire between Microfabricated Electrodes // Chemistry of Materials. – 2004. – Т. 16, № 24. – С. 4955-4959.
129. Cheng C., Gonela R. K., Gu Q., Haynie D. T. Self-Assembly of Metallic Nanowires from Aqueous Solution // Nano Letters. – 2005. – Т. 5, № 1. – С. 175-178.
130. Ranjan N., Mertig M., Cuniberti G., Pompe W. Dielectrophoretic Growth of Metallic Nanowires and Microwires: Theory and Experiments // Langmuir. – 2010. – Т. 26, № 1. – С. 552-559.
131. Cheng Y., Yu G., Tang L., Zhou Y., Zhang G. Self-assembled dendritic nanowires of Au–Pt alloy through electrodeposition from solution under AC fields // Journal of Crystal Growth. – 2011. – Т. 334, № 1. – С. 181-188.
132. Tang L., Yu G., Li X., Chang F., Zhong C.-J. Palladium–Gold Alloy Nanowire-Structured Interface for Hydrogen Sensing // ChemPlusChem. – 2015. – Т. 80, № 4. – С. 722-730.

133. Kawasaki J. K., Arnold C. B. Synthesis of Platinum Dendrites and Nanowires Via Directed Electrochemical Nanowire Assembly // Nano Letters. – 2011. – T. 11, № 2. – C. 781-785.

134. Yi X., Yu G., Chang F., Xie Z. H., Tran T. N., Hu B. N., Zhong C.-J. Electrochemically Controlled Growth of Au□Pt Alloy Nanowires and Nanodendrites // Chemistry – An Asian Journal. – 2014. – T. 9, № 9. – C. 2612-2620.

135. Lu Y., Ji H.-F. Electric field-directed assembly of gold and platinum nanowires from an electrolysis process // Electrochemistry Communications. – 2008. – T. 10, № 2. – C. 222-224.

136. Hermanson K. D., Lumsdon S. O., Williams J. P., Kaler E. W., Velev O. D. Dielectrophoretic Assembly of Electrically Functional Microwires from Nanoparticle Suspensions // Science. – 2001. – T. 294, № 5544. – C. 1082-1086.

137. Liu X., Zhao H., Yang X., Li X., Wang N. Trailing mobile sinks: A proactive data reporting protocol for Wireless Sensor Networks // The 7th IEEE International Conference on Mobile Ad-hoc and Sensor Systems (IEEE MASS 2010) 10.1109/MASS.2010.5663998 –, 2010. – C. 214-223.

138. Nerowski A., Opitz J., Baraban L., Cuniberti G. Bottom-up synthesis of ultrathin straight platinum nanowires: Electric field impact // Nano Research. – 2013. – T. 6, № 5. – C. 303-311.

139. Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling // Molecular Cell. – 2007. – T. 26, № 1. – C. 1-14.

140. Calas-Blanchard C., Catanante G., Noguer T. Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems // Electroanalysis. – 2014. – T. 26, № 6. – C. 1277-1286.

141. Bachi A., Dalle-Donne I., Scaloni A. Redox Proteomics: Chemical Principles, Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises // Chemical Reviews. – 2013. – T. 113, № 1. – C. 596-698.

142. Merksamer P. I., Liu Y., He W., Hirschey M. D., Chen D., Verdin E. The sirtuins, oxidative stress and aging: An emerging link // Aging. – 2013. – T. 5, № 3. – C. 144-150.

143. Finkel T., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. – 2000. – Т. 408, № 6809. – С. 239-247.
144. Gulina L. B., Pchelkina A. A., Nikolaev K. G., Navolotskaya D. V., Ermakov S. S., Tolstoy V. P. A BRIEF REVIEW ON IMMOBILIZATION OF GOLD NANOPARTICLES ON INORGANIC SURFACES AND SUCCESSIVE IONIC LAYER DEPOSITION // Reviews on Advanced Materials Science. – 2016. – Т. 44, № 1. – С. 46-53.
145. Ermakov S. S., Nikolaev K. G., Tolstoi V. P. Analytical possibilities of Layer-by-Layer sensors // RUSS CHEM REV. – 2016. – Т. 85, № in press.
146. Determination of Aspect-Ratio Distribution in Gold Nanowires Using Absorption Spectra and Transmission Electron Microscopy Techniques. / Omi H.: INTECH Open Access Publisher, 2012.
147. Dong A., Ye X., Chen J., Kang Y., Gordon T., Kikkawa J. M., Murray C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Т. 133, № 4. – С. 998-1006.
148. Rosen E. L., Buonsanti R., Llordes A., Sawvel A. M., Milliron D. J., Helms B. A. Exceptionally Mild Reactive Stripping of Native Ligands from Nanocrystal Surfaces by Using Meerwein’s Salt // Angewandte Chemie International Edition. – 2012. – Т. 51, № 3. – С. 684-689.
149. Vartak A. P., Crooks P. A. A Scalable, Enantioselective Synthesis of the α2-Adrenergic Agonist, Lofexidine // Organic Process Research & Development. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 415-419.
150. Hoogvliet J. C., Dijksma M., Kamp B., van Bennekom W. P. Electrochemical Pretreatment of Polycrystalline Gold Electrodes To Produce a Reproducible Surface Roughness for Self-Assembly: A Study in Phosphate Buffer pH 7.4 // Analytical Chemistry. – 2000. – Т. 72, № 9. – С. 2016-2021.
151. Периодическая система химических элементов Д. И. Менделеева. / Семишин В. И. – Москва: Химия, 1972. – 188 с.

152. Scanlon M. D., Salaj-Kosla U., Belochapkine S., MacAodha D., Leech D., Ding Y., Magner E. Characterization of Nanoporous Gold Electrodes for Bioelectrochemical Applications // Langmuir. – 2011. – T. 28, № 4. – C. 2251-2261.
153. Cho E. C., Au L., Zhang Q., Xia Y. The Effects of Size, Shape, and Surface Functional Group of Gold Nanostructures on Their Adsorption and Internalization by Cells // Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). – 2010. – T. 6, № 4. – C. 517-522.
154. Zhang S., Wang N., Yu H., Niu Y., Sun C. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor // Bioelectrochemistry. – 2005. – T. 67, № 1. – C. 15-22.
155. Yang W., Wang J., Zhao S., Sun Y., Sun C. Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment // Electrochemistry Communications. – 2006. – T. 8, № 4. – C. 665-672.
156. Barsan M. M., David M., Florescu M., Ţugulea L., Brett C. M. A. A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene // Bioelectrochemistry. – 2014. – T. 99, № 0. – C. 46-52.
157. Swoboda B. E. P., Massey V. Purification and Properties of the Glucose Oxidase from Aspergillus niger // Journal of Biological Chemistry. – 1965. – T. 240, № 5. – C. 2209-2215.
158. Gibson Q. H. Mechanisms of Reaction of Some Flavoprotein Enzymes with Oxygen // The Journal of General Physiology. – 1965. – T. 49, № 1. – C. 201-211.
159. Shiraishi F. Experimental evaluation of the usefulness of equations describing the apparent maximum reaction rate and apparent Michaelis constant of an immobilized enzyme reaction // Enzyme and Microbial Technology. – 1993. – T. 15, № 2. – C. 150-154.
160. du Toit H., Di Lorenzo M. Glucose Oxidase Directly Immobilized onto Highly Porous Gold Electrodes for Sensing and Fuel Cell applications // Electrochimica Acta. – 2014. – T. 138, № 0. – C. 86-92.

161. Ustinova E., Gorchakov E., Kolpakova N. Anodic stripping determination of Pt(IV) based on the anodic oxidation of In from electrochemically deposited Pt–In alloy phases // Journal of Solid State Electrochemistry. – 2012. – Т. 16, № 7. – С. 2455-2458.
162. Manivannan S., Ramaraj R. Core-shell Au/Ag nanoparticles embedded in silicate sol-gel network for sensor application towards hydrogen peroxide // Journal of Chemical Sciences. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 735-743.
163. Han M., Liu S., Bao J., Dai Z. Pd nanoparticle assemblies—As the substitute of HRP, in their biosensing applications for H2O2 and glucose // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – Т. 31, № 1. – С. 151-156.
164. Zhong H., Yuan R., Chai Y., Zhang Y., Wang C., Jia F. Non-enzymatic hydrogen peroxide amperometric sensor based on a glassy carbon electrode modified with an MWCNT/polyaniline composite film and platinum nanoparticles // Microchimica Acta. – 2012. – Т. 176, № 3. – С. 389-395.
165. Wang L., Zhu H., Hou H., Zhang Z., Xiao X., Song Y. A novel hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles electrodeposited on chitosan-graphene oxide/cysteamine-modified gold electrode // Journal of Solid State Electrochemistry. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 1693-1700.
166. Huang Y., Ferhan A. R., Dandapat A., Yoon C. S., Song J. E., Cho E. C., Kim D.-H. A Strategy for the Formation of Gold–Palladium Supra-Nanoparticles from Gold Nanoparticles of Various Shapes and Their Application to High-Performance H2O2 Sensing // The Journal of Physical Chemistry C. – 2015. – Т. 119, № 46. – С. 26164-26170.
167. Cicconi S., Ventura N., Pastore D., Bonini P., Nardo P. D., Lauro R., Marlier L. N. J. L. Characterization of apoptosis signal transduction pathways in HL-5 cardiomyocytes exposed to ischemia/reperfusion oxidative stress model // Journal of Cellular Physiology. – 2003. – Т. 195, № 1. – С. 27-37.