

Микроконцентрирование в создании электрохимических сенсоров и биосенсоров для определения органических соединений

Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин

герман константинович будников — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: электрохимические методы анализа, химические и биохимические сенсоры. E-mail Herman.Budnikov@ksu.ru

геннадий артурович евтюгин — доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: биоэлектрохимические методы анализа. E-mail Gennady.Evtugyn@ksu.ru

420008 Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета, кафедра аналитической химии, тел. (8432)31-54-91.

Введение

Свойства химических и биохимических сенсоров во многом определяются процессами, протекающими на границе между преобразователем сигнала и анализируемой средой. Гетерогенный характер таких процессов традиционно считается недостатком химических сенсоров, поскольку диффузионное торможение сужает диапазон определяемых концентраций и завышает предел обнаружения по сравнению с аналогичными результатами, получаемыми в гомогенных процессах [1]. Тем не менее наличие границы раздела можно использовать для улучшения аналитических и операционных характеристик сенсоров, в том числе путем использования реакционной зоны вблизи активной поверхности датчика для избирательного накопления определяемого вещества.

Применительно к электрохимическим сенсорам микроконцентрирование как часть протокола измерения нашло наиболее полное выражение в инверсионно-вольтамперометрических методах определения металлов [2]. В них в качестве сорбента выступает сам электрод — ртуть или графит, покрытый электроосажденной ртутью. Накопление в амальгаме происходит в результате катодного восстановления ионов металлов, аналитическим сигналом служит анодный ток их растворения. Селективность накопления и растворения, задаваемая выбором соответствующих рабочих потенциалов, дает возможность определять некоторые металлы на уровне мкг/л, что превосходит характеристики спектральных методов анализа.

В случае органических соединений универсальных рецептов понижения предела обнаружения с использованием поверхностных эффектов нет вследствие многообразия их электрохимических реакций. Изменить положение может модификация поверхности сенсора с помощью рецепторов искусственного и естественного происхождения, обеспечивающих избирательное связывание и «узнавание» определяемого органического субстрата в последующем электрохимическом процессе. Данный прием используют в электрокатализе [3], когда на электрод наносят катализатор, облегчающий перенос электрона. Эффективен он и в других вариантах электрохимического окисления/восстановления определяемых органических соединений [4].

Описаны различные подходы к модификации сенсоров с использованием в явном и неявном виде концентрирования определяемого соединения: применение молекулярных сит [5], ионообменных смол [6], синтез полимеров с порами, соответствующими размеру молекул определяемого соединения (молекулярный импринтинг [7]). Их объединяет то, что концентрирование выступает в качестве вспомогательного приема и не затрагивает функций самого сенсора. Присутствие модификатора проявляется в понижении предела обнаружения (наклона градуировочного графика) и повышении селективности сигнала, регистрируемого и в отсутствие сорбента.

В то же время возможности избирательного накопления определяемых веществ на поверхности сенсора шире. Как классический пример высокоселективного концентрирования можно рассматривать гетерогенный иммуноанализ, в котором в качестве сорбента выступают антитела, закрепленные на нерастворимом носителе или прямо на электроде [8]. Генерирование сигнала связано с образованием комплекса антиген—антитело. В отсутствие иммунной реакции антиген, как правило, не определяется.

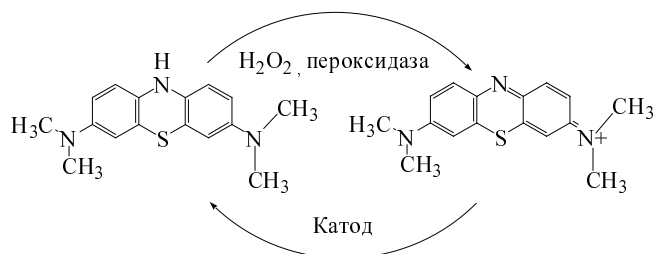
В данной работе приведены примеры использования других рецепторов, реализующих принципы избирательного концентрирования и формирования аналитического сигнала в отношении широкого круга органических соединений биологического значения.

Гибридные ДНК-пероксидазные сенсоры

Нуклеиновые кислоты представляют собой уникальный «инструмент» для создания сенсоров вследствие многообразия механизмов связывания белков и низкомолекулярных соединений. К ним относятся электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженным фосфатным остовом, специфическое связывание с нуклеотидами вблизи поверхности спирали ДНК, включение низкомолекулярных соединений внутрь дуплекса между парами комплементарных оснований (интеркалирование) [8, 9]. Основное внимание при создании ДНК-сенсоров уделяется обнаружению характеристических олигонуклеотидов, взаимодействующих с комплементарными нуклеотидными последовательностями (так называемым ДНК-зондом) на поверхности преобразователя сигнала. Такие гибридные сенсоры в перспективе найдут применение

для диагностики заболеваний, врожденных генетических дефектов, обнаружения генетически модифицированных компонентов в продуктах питания и т.д. [10]. Низкомолекулярные соединения (противораковые препараты, экотоксиканты и др.) не столь радикально меняют характеристики поверхности сенсора с сорбированными нуклеиновыми кислотами, поэтому регистрировать их присутствие сложнее.

Нами предложено применять с этой целью гибридные сенсоры, содержащие в поверхностном слое фермент пероксидазу и нуклеиновые кислоты [8]. В них используется маркер — производное феноптиазина (метиленовый синий, метиленовый зеленый), который способен взаимодействовать и с ДНК, и с пероксидазой. При добавлении маркера в раствор совместно с пероксидом водорода генерируется биокаталитический ток, связанный с циклическим превращением маркера, как показано на примере метиленового синего ниже:



Маркеры также способны связываться с дуплексом ДНК либо за счет электростатических взаимодействий, либо путем интеркалирования (включения между парами нуклеиновых оснований). В зависимости от характера взаимодействия меняется реакционная способность маркера в пероксидазном и электрохимическом превращении.

Вещества, реагирующие с ДНК, меняют характер ее взаимодействия с маркером, что влияет на скорость его пероксидазного окисления и генерируемый биокаталитический ток. Так, сульфонамидные препараты (сульфаметоксазол, сульфатиазол и др.) вытесняют феноптиазины с поверхности спирали ДНК, что приводит к снижению поверхностной концентрации маркеров. В результате уменьшается сигнал биосенсора пропорционально концентрации сульфонамида. В случае метиленового зеленого это наблюдается в микромолярном диапазоне содержаний сульфонамидов, а в случае метиленового синего, типичного интеркаля-

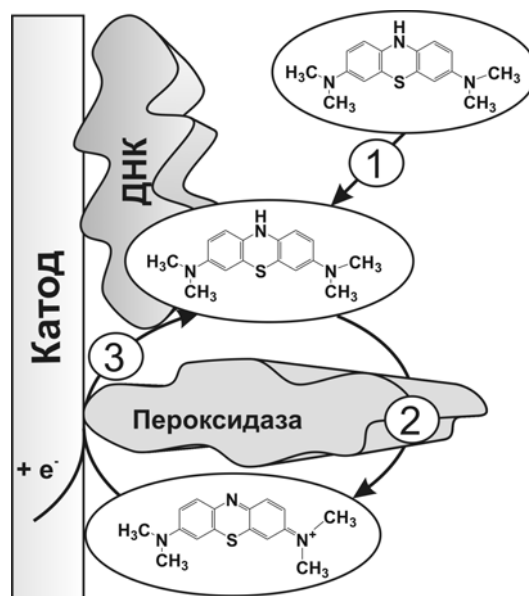


Рис. 1. Сигнал ДНК-пероксидазного сенсора в присутствии маркера — метиленового синего:

1 — перенос маркера из раствора и его концентрирование на поверхности электрода в реакции с ДНК; 2 — пероксидазное окисление маркера; 3 — регенерация маркера на катоде, сопровождающаяся генерированием катодного биокаталитического тока

тора, — при наномолярных их концентрациях. Это можно использовать для группового определения остаточных количеств сульфонамидов в биологических жидкостях [11]. Общая схема формирования сигнала ДНК-пероксидазного сенсора представлена на рис. 1.

Антрациклиновые препараты (доксорубицин, рубомицин) сами являются интеркаляторами, они вытесняют из спирали ДНК интеркалированную форму маркера, недоступную для фермента. В результате увеличивается концентрация свободной активной формы метиленового синего, и сигнал ДНК-пероксидазного сенсора увеличивается. Аналитические характеристики лекарственных препаратов, полученные с помощью ДНК-пероксидазного сенсора, приведены в таблице. Реакцию пероксидазного окисления феноптиазинов можно также использовать для количественного определения содержания нативной ДНК (после сорбционного переноса на поверхность электрода), количественной характеристики генотоксических факторов

Таблица

Аналитические характеристики лекарственных препаратов, полученные с помощью ДНК-пероксидазного сенсора

Препарат	Метиленовый синий		Метиленовый зеленый	
	Предел обнаружения, нМ	Диапазон определяемых концентраций, нМ	Предел обнаружения, мкМ	Диапазон определяемых концентраций, мкМ
Сульфаметоксазол	0,002	0,005—0,2	0,02	0,2—10
Сульфадiazин	0,1	0,1—1,0	0,01	0,2—8
Сульфаметазин	0,01	0,02—2	0,02	0,2—8
Сульфатуанидин	0,1	0,1—10	0,1	0,5—7
Доксорубицин	80	100—1500	—	—
Рубомицин	50	100—1350	—	—

(температурная денатурация, действие экстремальных рН и мутагенов) и антиоксидантной активности.

Каликсарены как модификаторы графитовых электродов

Каликсарены и их тиоаналоги образуют комплексы «гость—хозяин» с катионами металлов, а в случае функционализации — и с органическими соединениями, взаимодействующими с функциональными группами заместителей верхнего и нижнего обода [12]. Поэтому каликсареновую платформу часто используют в составе искусственных рецепторов.

Удобной матрицей для включения каликсаренов в состав химических сенсоров служит полианилин, способный за счет электростатических и донорно-акцепторных взаимодействий удерживать каликсарены с сульфонатными, карбоксилатными, amino- и пиридиновыми группами, обеспечивая при этом регулярность строения поверхностного слоя и воспроизводимость характеристик распознавания. Так, графитовые электроды, покрытые полианилином и тетрасульфонатным производным каликс[4]резорцинарена*, позволяют селективно определять промазин и хлорпромазин. Как и в случае ДНК-пероксидазного сенсора, сигналом сенсора служил ток восстановления окисленной формы лекарственного препарата, который накапливается в слое каликсарена и далее окисляется в пероксидазной реакции (рис. 2). Важно, что образование комплекса «гость—хозяин» не мешает биохимическому превращению фенотиазинового фрагмента, отделенного от катионного центра тремя метиленовыми группами. В присутствии комплексообразователей наблюдается закономерное увеличение сигнала восстановления окисленной формы лекарственных препаратов по сравнению с сигналом, получаемым с использованием немодифицированного сенсора. Также наблюдается снижение мешающего влияния электрохимически активных примесей, присутствующих в биологических жидкостях и лекарственных формах — аскорбиновой и мочевиной (2,6,8-триоксипуридин) кислотами и др.

По сравнению с ДНК как сорбционной матрицей слой полианилина обладает электропроводностью, что снижает перенапряжение окисления определяемых соединений и увеличивает биокаталитический ток по сравнению с током, регистрируемым при прямом окислении промазина или хлорпромазина на немодифицированном электроде. Кроме того, промазин и хлорпромазин, сорбированные в полианилине в присутствии каликсрезорцинаренов, могут включаться в электронный перенос электрона с электрода на активный центр пероксидазы, что приводит при добавлении пероксида водорода к генерированию биокаталитического тока.

Включение в состав 1,3-дизамещенных по нижнему ободу каликс[4]аренов amino-, амидо-, карбоксилатных групп позволяет получить синтетические рецепторы, с высокой эффективностью связывающие

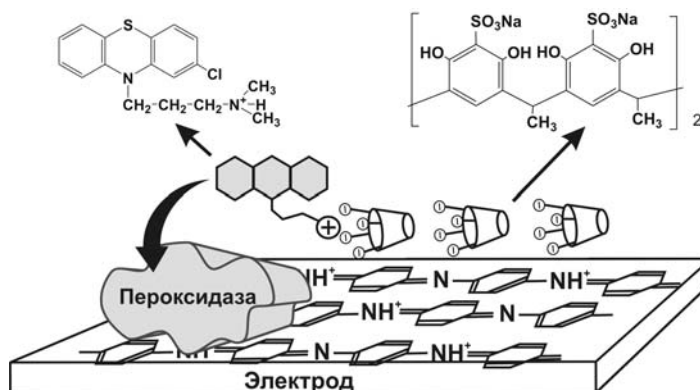
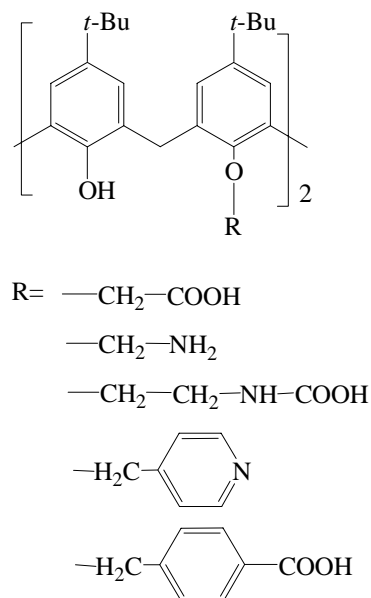


Рис. 2. Схема пероксидазного сенсора с тетрасульфонатным производным метилкаликс[4]резорцинарена, включенным в состав полианилинового покрытия, для определения хлорпромазина

карбоновые и дикарбоновые кислоты, окси- и аминокислоты [13]**:



Их включение в состав полианилинового покрытия позволило создать химический сенсор с потенциометрическим откликом на органические кислоты. В щелочной среде пиридинсодержащий каликс[4]арен образует нейтральный комплекс с оксалат-ионом. Реакция сопровождается переносом ионов водорода от полианилина, что приводит к изменению заряда поверхностного слоя и потенциала сенсора. Варьируя природу заместителей, можно получить селективные сигналы на глицин, глутаминовую и бензойную кислоты. Потенциометрические сенсоры на основе графитовых электродов, модифицированных полианилином и каликс[4]аренами, позволяют проводить определение 0,1—10 мМ органических кислот, определению не мешают 100 и 1000-кратные избытки неорга-

* Каликсрезорцинарены синтезированы в Институте органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КНЦ РАН и предоставлены для исследования д.х.н. Э. Х. Казаковой.

** 1,3-Дизамещенные каликсарены синтезированы на кафедре органической химии Казанского государственного университета под рук. чл.-корр. РАН И. С. Антипина и акад. РАН А. И. Коновалова.

нических анионов, а также ацетатов и формиатов. Помимо пленочных электродов, сходные показатели селективности и пределы обнаружения показывают угольно-пастовые электроды с каликсаренами и комплексами «гость—хозяин», включенными в состав материала электрода.

Заключение

Включение синтетических (каликсарены) и природных (нуклеиновые кислоты) рецепторов в состав электрохимических сенсоров на основе графитовых материалов позволяют значительно разнообразить их свойства. Повышение поверхностной концентрации определяемых соединений и их вовлечение в сопряженные химические и биохимические реакции расширяют спектр определяемых соединений и задают характер регистрируемого сигнала. Способ модификации и влияние электрохимического концентрирования достаточно гибко регулируются путем подбора режима нанесения покрытия (электрополимеризация, сорбционное осаждение) и структуры самого рецептора. Это подразумевает общий протокол изготовления чувствительных поверхностных слоев и измерения сигнала. В перспективе открывается возможность создания гибкой системы контроля состава сложных матриц с использованием химических и электрохимических сенсоров сходного дизайна и управления. Развитие подходов к направленной регуляции характеристик подобных сенсоров несомненно будет способствовать их использованию в решении конкретных аналитических задач.

Исследования проводили при поддержке РФФИ (проекты 03-03-32492-а и 04-03-97511-р_офи) и CRDF (REC-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Coulet P.R. Scientific Computing Automation Ed. E.J. Karjalainen. (Europe), Elsevier, 1991, Chapter 19, p. 221–236.
2. Brainina Kh. Z., Malakhova N.A., Stojko N. Yu. Fresenius J. Anal. Chem., 2000, v. 368, p. 307–325.
3. Golabi S.M., Zare H.R., Hamehloo M. Microchem. J., 2001, v. 69, p. 111–121.
4. Lawrence N., Beckett E.L., Davis J., Compton R.G. Anal. Biochem., 2002, v. 303, p. 1–16.
5. Martinelli G., Carotta M.C., Ferroni M., Sadaoka Y., Traversa E. Sensors Actuators B, 1999, v. 55, p. 99–110.
6. Lu T.-H., Sun I.-W. Talanta, 2000, v. 53, p. 443–451.
7. Martin-Esteban A. Fresenius J. Anal. Chem., 2001, v. 370, p. 795–802.
8. Methods in Molecular Biology. DNA-Protein Interactions. Tatowa, New Jersey: Humana Press, 2001, 636 p.
9. Mascini M., Palchetti I., Marrazza G. Fresenius J. Anal. Chem., 2001, v. 369, p. 15–22.
10. Yang M., McGovern M.E., Tompson M. Anal. Chim. Acta, 1997, v. 346, p. 259–275.
11. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Гольдфарб О.Э. Научные технологии, 2004, т. 56, с. 30–37.
12. Asfani Z., Bohmer V., Harrowfield J., Vicens J., Saadioui M. Calixarenes 2001, Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2001, 683 p.
13. Stoikova E.E., Evtugyn G.A., Beljakova S.V. e. a. J. Inclusion Phenomena, 2001, v. 39, p. 339–346.