



## Амперометрический биосенсор на D-сорбитол на основе модифицированного биокондитивным покрытием стеклоглеродного электрода

Е.А. Мазуренко<sup>1</sup>, О.В. Шевченко<sup>1</sup>, О.Ю. Тананайко<sup>1</sup>, М. Этьен<sup>2</sup>, А. Валькариус<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, 01601 Киев, Украина, e-mail: [nadzhafova@univ.kiev.ua](mailto:nadzhafova@univ.kiev.ua)

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564, CNRS - Institut Jean Barriol - Nancy University, 405 rue de Vandœuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

Поступила: 29 сентября 2012 г / Принята к публикации: 2 ноября 2012 г.

*Метод электрофоретического осаждения был использован для получения слоя углеродных нанотрубок (УНТ) на поверхности стеклоглеродного электрода. Электрод, модифицированный УНТ, продемонстрировал значительное уменьшение потенциала окисления кофактора НАДН ( $\Delta E = 0.25$  В) и высокую стабильность электрохимического сигнала по сравнению с немодифицированным. Фермент D-сорбитолдегидрогеназа был иммобилизован в пленку оксида кремния на поверхности электрода, модифицированного УНТ. Разработана амперометрическая методика определения сорбитола в пищевых продуктах и косметических средствах с помощью полученного биокондитивного электрода с пределом обнаружения 0.1 мМ сорбитола. Показана перспективность применения биокондитивного электрода в качестве чувствительного элемента амперометрического сенсора.*

**E.A. MAZURENKO, O.V. SHEVCHENKO, O.Yu. TANANAİKO, M. ETIENNE, A. WALCARIUS**  
**AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF D-SORBITOL BASED ON MODIFIED WITH BIOCOMPOSITE FILM GLASSY CARBON ELECTRODE.** *The method of electrophoretic deposition is used here for the obtaining a carbon nanotubes layer on the surface of glassy carbon electrode. The electrode modified with carbon nanotubes demonstrated significant shift of the oxidation potential of cofactor NADH ( $\Delta E = 0.25$  V) and enhanced stability of the electrochemical response compare to non-modified electrode. The D-sorbitol dehydrogenase enzyme was immobilized into the silica film on the surface of carbon nanotubes-modified electrode. The developed biocomposite electrode was applied for the D-sorbitol determination in foodstuffs and cosmetics with the limit of detection 0.1 mM. The prospects of application of developed electrode as a sensitive element of amperometric biosensor are discussed.*

**Ключевые слова:** амперометрический биосенсор, углеродные нанотрубки, фермент D-сорбитол-Одегидрогеназа, сорбитол, золь-гель метод, иммобилизация.

**Keywords:** Amperometric biosensor, carbon nanotubes, D-sorbitol, sol-gel method, dehydrogenase.

Одним из перспективных направлений аналитической химии является разработка амперометрических биосенсоров на основе электродов, модифицированных ферментами [1]. Среди преимуществ таких сенсоров следует отметить их высокую селективность, быстрый отклик, а также возможность работы в полевых условиях.

В то же время, биосенсорам присущи недостатки, лимитирующие их широкое использование в аналитической химии: дороговизна чистых препаратов ферментов и их невысокая стабильность. В связи с этим, усилия исследователей направлены на поиски подходящих способов иммобилизации биомолекул, которые могли бы обеспечивать увеличение стабильности ферментов и снижение предела обнаружения аналита. Одним из таких способов иммобилизации является золь-гель метод, позволяющий получать разнообразные по своим химическим и физическим свойствам материалы на основе оксида кремния [2]. Оксид кремния имеет отличную биосовместимость, а золь-гель метод позволяет по-

лучать биокондитивные материалы с заданными структурными характеристиками в мягких условиях синтеза [3]. Указанные преимущества обеспечивают стабильность, конформационную подвижность иммобилизованных ферментов и их доступность для молекул субстрата [4,5]. При разработке электрохимических биосенсоров особенно ценным видится применение таких материалов в виде пленочных покрытий на поверхности электродов [6,7].

Одним из классов ферментов, представители которого перспективны при разработке биосенсоров, являются дегидрогеназы. [8]. Биосенсоры на основе дегидрогеназ предложены для определения формальдегида [9], глицерина [10], лактата [11,12], этанола [13,14], а также различных ингибиторов [15]. Фермент D-сорбитолдегидрогеназа образуется в клетках печени человека и катализирует реакцию окисления D-сорбитола до D-фруктозы в присутствии кофактора никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>), либо обратную реакцию в присутствии НАДН [16]:

**D-сорбитол + НАД<sup>+</sup> ↔ D-фруктоза + НАДН**

Многоатомный спирт сорбитол содержится во фруктах, и широко используется в пищевой диабетической промышленности в качестве заменителя сахара [17], а также в косметической промышленности. В то же время большие дозы сорбитола (от 10 грамм в день на человека) опасны для здоровья человека [18]. Поэтому аналитический скрининг содержания сорбитола в диетических продуктах является важной аналитической задачей [19,20]. Актуальной задачей является измерение концентрации D-сорбитола в биологических жидкостях и тканях в целях предупреждения развития осложненного сахарного диабета [21,22]. Стандартный хроматографический метод определения сорбитола [23] является трудоемким и требует длительную пробоподготовку, остальные методы (титриметрические [24] и спектрофотометрические [25]) не обеспечивают достаточную селективность. Альтернативой химическим методам анализа является ферментативный метод с использованием D-сорбитолдегидрогеназы [26].

Для получения чувствительного элемента амперометрического биосенсора на сорбитол перспективно иммобилизовать этот фермент на поверхности электрода. Фиксируя ток окисления кофермента НАДН, который образуется в результате ферментативного окисления D-сорбитола, возможно определять концентрацию сорбитола. Предложенные ранее амперометрические биосенсоры на основе ДСДГ, не применялись для анализа реальных объектов [27–30].

Электрохимическое детектирование НАДН на немодифицированных углеродных и металлических электродах сопряжено с высоким потенциалом его окисления [31]. Это приводит к мешающему влиянию большинства сильных восстановителей, присутствующих в образце. Окисление НАДН на немодифицированных электродах сопровождается загрязнением поверхности последних продуктами реакции, что приводит к снижению аналитического сигнала во времени [32]. Одним из возможных путей решения этой проблемы является использование электродов, модифицированных наноматериалами, а именно углеродными нанотрубками (УНТ).

Благодаря электрокаталитическим свойствам, УНТ способны значительно понижать потенциал окисления НАДН [33] и улучшать стабильность его сигнала [34], что делает их особо ценными при разработке биосенсоров на основе ферментов дегидрогеназ [35,36].

Таким образом, целью данной работы являлась разработка чувствительного элемента амперометрического биосенсора на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного углеродными нанотрубками и пленкой оксида кремния с иммобилизированной D-сорбитолдегидрогеназой, а также применение такого электрода для определения D-сорбитола в образцах пищевой и косметической промышленности.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ***Материалы и методики исследований*

В работе применялся тетраэтоксисилан (ТЕОС, 98%) фирмы Alfa Aesar. Углеродные нанотрубки, функционализированные карбоксильными группами (УНТ, >90%, 4-5нм × 0.5-1.5 мкм, 1-3 атом.% СООН-групп), были получены от "Sigma". D-сорбитолдегидрогеназа (ДСДГ, 10 мг/мл, 100 U/мг) была предоставлена химическим факультетом университета Саарланда (Германия). Окисленная и восстановленная формы кофермента β-никотинамидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>/НАДН) были получены от "Sigma". Для лучшего закрепления фермента в SiO<sub>2</sub>-пленке в золь вводился полиэлектролит полидиметилдиаллиламмоний хлорид (ПДМДА, низкая молекулярная масса, 20% раствор в воде) фирмы "Aldrich" [37]. Фосфатные буферные растворы были приготовлены из солей Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (99.5%, "Merck") и KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (99.9%, "Prolabo"). Буферный раствор Трис-НСl был приготовлен путем растворения трис(гидроксиметил)аминометана (98%, "Sigma") в воде и доведения до необходимого рН раствором НСl (36%, "Prolabo"). Все растворы реагентов готовили используя биодистиллированную воду. Все другие используемые реагенты были степени чистоты "х.ч."

Стеклоуглеродные электроды (СУ, Sigradur®, HTW Hochttemperatur-Werkstoffe, Германия) полировали перед применением с помощью влажной наждачной бумаги 4000 с порошком оксида алюминия (0.05 мкм, "Buehler").

Электрофоретическое осаждение углеродных нанотрубок проводили с помощью специальной установки, состоящей из стальной пластины-катода и стеклоуглеродного электрода-анода. Два электрода были размещены параллельно на расстоянии 6 мм. Площадь контакта каждого электрода с дисперсией углеродных нанотрубок составляла 1 см<sup>2</sup>. Необходимое напряжение (60 В) накладывалось с помощью источника постоянного тока. Стабильная дисперсия углеродных нанотрубок в воде была получена путем обработки ультразвуком на протяжении 5 часов. Длительность наложения напряжения варьировалась от 5 до 50 с. После осаждения УНТ стеклоуглеродный электрод промывался водой и подвергался тепловой обработке при температуре 200 °С на протяжении одного часа. Полученный модифицированный электрод в дальнейшем назывался СУ-УНТ.

Для отбора небольших объемов аликвот использовали автоматическую микропипетку «Eppendorf» (Германия). Раствор золя SiO<sub>2</sub> готовили путем кислотного гидролиза ТЕОС согласно методике [5,37]. К аликвоте 100 мкл полученного золя добавляли 100 мкл ПДМДА и 100 мкл раствора ДСДГ. Аликвоту готовой смеси наносили на стеклоуглеродный электрод (из расчета 25 мкл/см<sup>2</sup>) и сушили при комнатной температуре до полного испарения воды.

Электрод, модифицированный ферментом, в дальнейшем назывался  $\text{CU-SiO}_2\text{-ДСДГ}$ , а модифицированный углеродными нанотрубками и ферментом –  $\text{CU-УНТ-SiO}_2\text{-ДСДГ}$ . Все электрохимические измерения проводились на потенциостате EmStat 2 ("PalmSens") с использованием трехэлектродной ячейки, включающую вспомогательный платиновый электрод, насыщенный хлорсеребряный электрод сравнения ( $\text{Ag/AgCl}$ ), и модифицированный стеклоуглеродный рабочий электрод. Амперометрические измерения проводились при потенциале + 0.5 В и постоянном перемешивании. Исследование морфологии поверхности  $\text{CU-УНТ}$  проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа ("Hitachi" FEG S4800).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

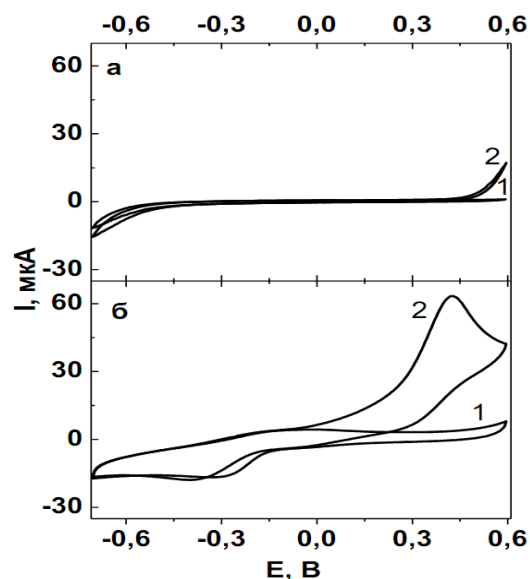
#### *Окисление НАДН на поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками.*

Были исследованы вольтамперометрические характеристики окисления кофермента НАДН на немодифицированном  $\text{CU}$  и на  $\text{CU-УНТ}$ -электродах. На циклической вольтамперограмме  $\text{CU-УНТ}$  электрода в присутствии НАДН можно заметить анодный пик окисления кофермента при потенциале  $\approx 0.42$  В, в то время как на немодифицированном электроде пик НАДН наблюдается при значительно более высоких потенциалах (0.7-0.8 В) (Рис.1). Полученные результаты свидетельствуют об электрокаталитических свойствах УНТ, способствующих уменьшению потенциала окисления кофермента НАДН более чем на 0.25 В.

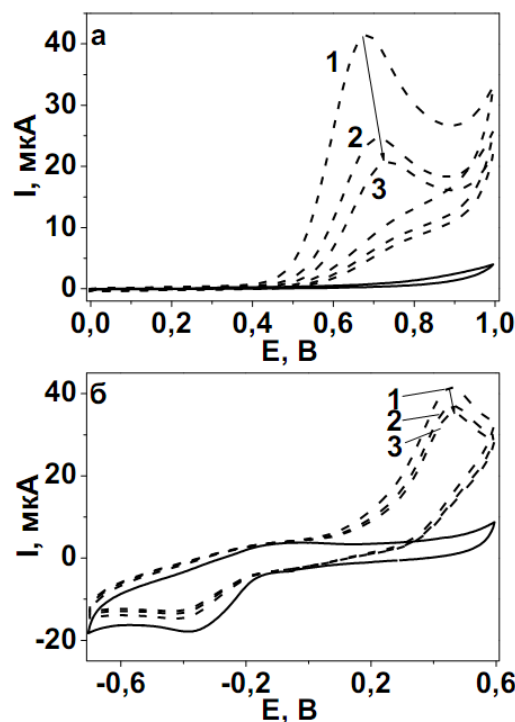
Ток окисления НАДН на немодифицированном  $\text{CU}$  электроде уменьшается более чем на 50 % уже после трех разверток потенциала (Рис.2а), что можно объяснить загрязнением поверхности электрода продуктами реакции [32]. В то же время,  $\text{CU-УНТ}$  электрод демонстрирует в этих же условиях значительно лучшую стабильность: уменьшение тока после трех разверток потенциала не превышает 15 % (Рис.2б).

Таким образом, электрофоретическое осаждение углеродных нанотрубок на поверхности стеклоуглеродного электрода приводит к значительному улучшению электрохимических характеристик последнего, а именно, способствует уменьшению потенциала окисления кофермента НАДН и улучшению стабильности аналитического сигнала. Известно, что увеличение длительности наложения напряжения при электрофоретическом осаждении ведет к большему количеству осажденных частичек, а значит – к увеличению толщины слоя углеродных нанотрубок [38]. Электрохимические характеристики модифицированного электрода при этом могут изменяться, поэтому нами были исследованы зависимости потенциала и величины пика окисления НАДН от

времени электрофоретического осаждения углеродных нанотрубок на  $\text{CU}$  электроде (Рис. 3).



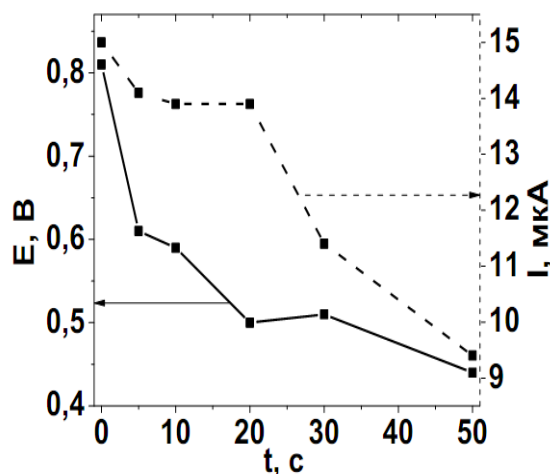
**Рис.1.** Циклические вольтамперограммы немодифицированного  $\text{CU}$  (а) и модифицированного  $\text{CU-УНТ}$  (б) электродов в фосфатном буферном растворе pH 7.5 (1) и в присутствии 5 мМ НАДН (2). Скорость развертки потенциала 20 мВ/с.



**Рис.2.** Циклические вольтамперограммы немодифицированного  $\text{CU}$  (а) и модифицированного  $\text{CU-УНТ}$  (б) электродов в растворе НАДН (5 мМ): (1) – 1-й цикл развертки потенциала, (2) – 2-й цикл, (3) – третий цикл. Вспомогательный электролит: 0.067 М фосфатный буферный раствор (pH 7.5)

При увеличении длительности осаждения УНТ на СУ, пик НАДН смещается в область меньших потенциалов, однако его абсолютная величина при этом тоже уменьшается. Такое уменьшение величины тока можно объяснить образованием более плотного слоя УНТ, в результате чего уменьшается пористость покрытия и затрудняется диффузия НАДН внутрь пленки.

В связи с этим, для дальнейшей работы было выбрано время осаждения 20 с., при котором пик окисления НАДН на модифицированном электроде характеризуется значительным сдвигом потенциала, величина тока при этом остается достаточно высокой.

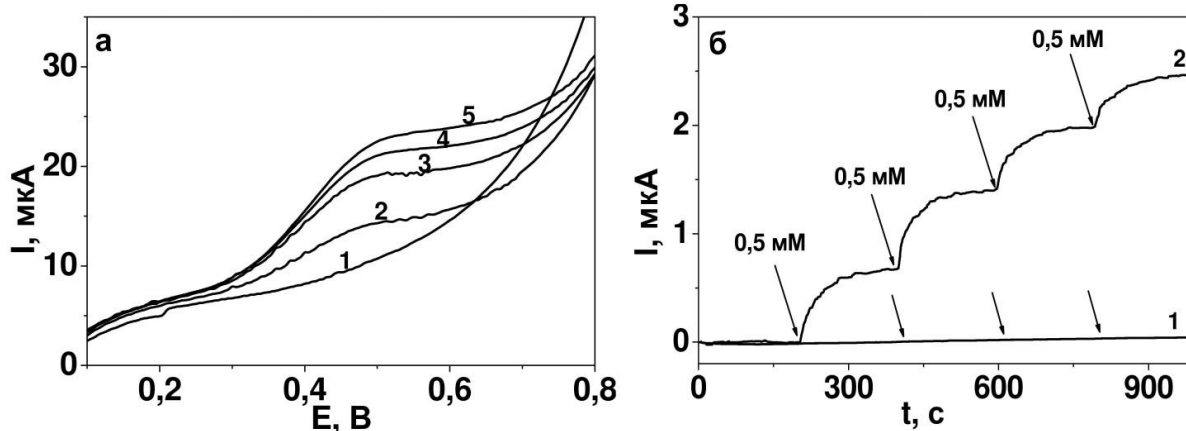


**Рис.3.** Зависимость потенциала и величины вольтамперометрического пика окисления 1 мМ НАДН на СУ-УНТ электроде от длительности электрофоретического осаждения УНТ. Вспомогательный электролит: 0.067 М фосфатный буферный раствор (рН 7.5).

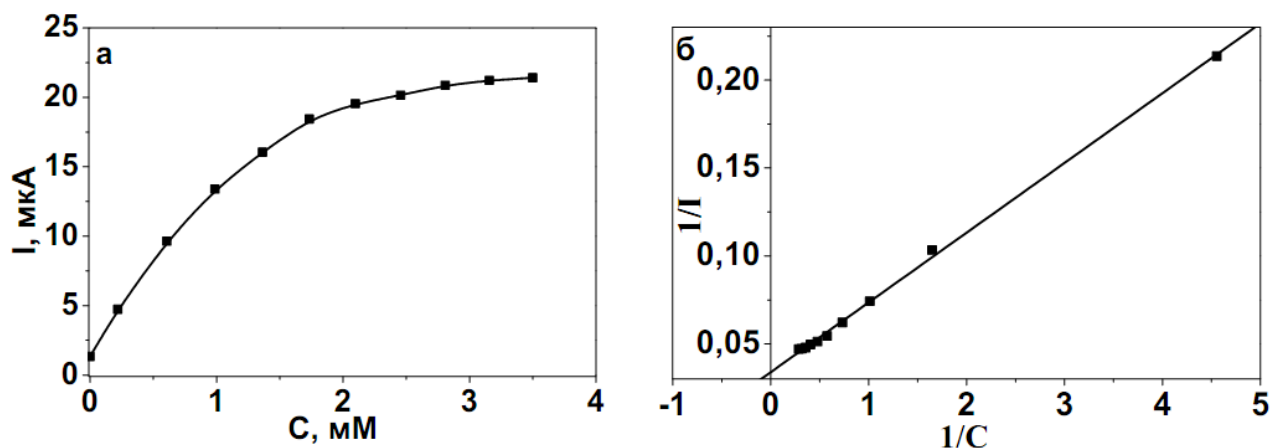
*Иммобилизация D-сорбитолдегидрогеназы в пленке SiO<sub>2</sub> на поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками.*

С целью получения чувствительного элемента амперометрического биосенсора для определения сорбитола нами была проведена иммобилизация фермента ДСДГ в пленку SiO<sub>2</sub> на поверхности СУ-УНТ электрода.

В присутствии D-сорбитола в растворе на вольтамперограмме СУ-УНТ электрода, модифицированного пленкой SiO<sub>2</sub>-ДСДГ, заметно повышение тока при потенциале + 0.5 В (Рис. 4а). Этот сигнал можно отнести к окислению НАДН, образующегося при окислении сорбитола ДСДГ, что свидетельствует о сохранении каталитической активности ДСДГ, инкапсулированной в пленку SiO<sub>2</sub>. Наибольшая величина тока наблюдается при рН 9.0 (трис-буфер), что коррелирует с рН максимальной активности D-сорбитолдегидрогеназы в растворе [39]. Интенсивность сигнала возрастает пропорционально увеличению концентрации сорбитола в растворе. Модифицированный СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрод демонстрирует четкий стабильный амперометрический отклик при потенциале + 0.5 В в присутствии добавок D-сорбитола в растворе (Рис. 4б). СУ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрод без слоя УНТ, при данном потенциале демонстрирует лишь незначительный сигнал. Это подтверждает каталитическое действие УНТ при окислении НАДН. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования биокомпозитного электрода СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ для разработки амперометрического биосенсора на сорбитол. Зависимость величины тока от концентрации D-сорбитола имеет характерный вид, присущий ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен (Рис. 5а) [40]. Значение константы Михаэлиса, рассчитанное с помощью графика Лайнуивера-Бэрка [40], составляет 1.2 мМ (Рис. 5б).



**Рис.4.** (а) Линейные вольтамперограммы СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ в присутствии возрастающих концентраций D-сорбитола: 0 мМ (1), 0.5 мМ (2), 1.0 мМ (3), 1.5 мМ (4), 2.0 мМ (5). (б) Амперометрический отклик (1) СУ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ и (2) СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ к добавкам D-сорбитола, E = + 0,5 В. Вспомогательный электролит: 0.1 М Трис-НСl (рН 9.0), 1 мМ НАД<sup>+</sup>.



**Рис.5.** (а) Зависимость амперометрического сигнала СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ от концентрации D-сорбитола в растворе,  $E = +0,5$  В. Фоновый раствор: 0.1 М Трис-НСl pH 9.0, 1 мМ НАД<sup>+</sup>. (б) График Лайнуивера-Бэрка для определения константы Михаэлиса.

Это меньше, чем для электрода, модифицированного ДСДГ в пленке нафион-хитозан ( $\approx 1.6$  мМ) [27], и значительно меньше, чем для данного фермента в растворе (6.2 мМ). Полученные результаты свидетельствуют о высоком сродстве фермента, иммобилизованного в пленке SiO<sub>2</sub>, к субстрату – D-сорбитолу.

Был получен градуировочный график для амперометрического определения D-сорбитола с помощью биоконструктивного электрода СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ. Уравнение прямой имеет вид:  $I(\mu\text{A}) = (1.8 \pm 0.5) + (12.2 \pm 0.8) \times C(\text{mM})$  ( $R^2 = 0.99$ ). Диапазон линейности составляет 0.2 – 1.2 мМ, а предел обнаружения, рассчитанный по 3S-критерию, – 0.1 мМ сорбитола. Такой предел обнаружения сопоставим с описанными в литературе амперометрическими биосенсорами для определения сорбитола на основе иммобилизованной ДСДГ [20,28,29]. В то же время разработанная методика дает возможность детектировать сорбитол в более широком концентрационном диапазоне, чем описанные ранее методики [20,27,30]. Учитывая то, что чаще всего сорбитол входит в состав объектов в качестве макрокомпонента, именно широкий диапазон концентраций, а не предел обнаружения, играет решающую роль при выборе методики его анализа.

Время амперометрического отклика электрода составляет 100 с, что свидетельствует об экспрессности анализа. Воспроизводимость аналитического сигнала при определении 0.5 мМ D-сорбитола с использованием трех различных электродов характеризовалась относительным стандартным отклонением не превышающим 9 % ( $n=3$ ,  $P = 0.95$ ).

Стабильность биосенсора достаточная для его использования на протяжении одного месяца при условии хранения при 4 °С. Таким образом, разработанный биоконструктивный электрод СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ является перспективным элементом амперометрического биосенсора для определения сорбитола.

#### Определение сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрода

Так как D-сорбитол находит широкое применение в диетических пищевых продуктах, а также продуктах косметической промышленности, нами была проверена возможность использования разработанного чувствительного элемента биосенсора для анализа содержания D-сорбитола в этих объектах.

Исследовано мешающее влияние веществ, которые могут входить в состав объектов пищевой и косметической промышленности, на результаты определения D-сорбитола с помощью модифицированного СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрода. Показано, что определению 1 мМ сорбитола не мешают эквимолярные концентрации углеводов и многоатомных спиртов (Табл. 1), в том числе стереоизомер сорбитола – маннитол, что свидетельствует о высокой селективности разработанной методики. Мешающее влияние оказывает аскорбиновая кислота, которая окисляется на электроде при рабочем потенциале + 0,5 В, что приводит к завышению аналитического сигнала. Влияние аскорбиновой кислоты устраняли путем введения в раствор пятикратного избытка Fe(III). (Табл. 1). Присутствие анионных ПАВ (ДДСН) приводит к снижению стабильности сигнала и занижению результатов анализа (Табл. 1).

Методика определения D-сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрода была испытана при анализе реальных образцов. Определения проводили по методу стандартных добавок [41]. На аналитических весах отбирали навески соответствующих образцов пищевой и косметической промышленности (Зубная паста для детей "Oral B Stages berry bubble", Германия; жевательная резинка "Орбит", Россия; печенье "Диабетическое", Украина), с таким расчетом, чтобы концентрация сорбитола в растворе после соответствующей пробоподготовки находилась в диапазоне 20-50 мМ. Навески измельчали в ступке вручную, переносили в стакан на 100 мл, добав-

ляли 50 мл бидистиллированной воды (в случае печенья использовали 200 мл воды и стакан на 250 мл) и перемешивали в течение одного часа на магнитной мешалке. В аликвоты суспензий вводили добавки стандартного раствора сорбитола. Суспензии без добавок и с добавками стандартного раствора сорбитола фильтровали через бумажный фильтр (красная лента).

Аликвоты фильтратов (50 мкл) отбирали микропипеткой с дозатором и вводили в электрохимическую ячейку содержащую 5 мл Трис буферного раствора (pH 9,0), погружали в нее СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрод, вспомогательный и электрод сравнения, затем измеряли значения тока при потенциале +0.5 В.

Результаты анализа представлены в Табл. 2.

**Таблица 1.** Мешающее влияние изученных веществ на результаты амперометрического определения D-сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрода. C<sub>сорб</sub> = 1 мМ

Вещество (X)	Молярное соотношение концентраций (C <sub>X</sub> :C <sub>сорб</sub> )	Мешающее влияние
Сахароза	1:1	+ (10% уменьшение сигнала)
Глюкоза	1:1	не мешает
Мочевина	1:1	не мешает
Маннитол	1:1	не мешает
Глицерин	1:1	не мешает
Аскорбиновая к-та	1:10	+ (10% увеличение сигнала)
	1:1	+ (60 % увеличение сигнала)
Fe(III)	5:1	не мешает
Аскорбиновая к-та + Fe(III) (1:5)	1:10	не мешает
ДДСН	1:10	+ (уменьшение сигнала)

**Таблица 2.** Результаты амперометрического определения D-сорбитола в образцах пищевой и косметической промышленности с помощью СУ-УНТ-SiO<sub>2</sub>-ДСДГ электрода. (n = 3, P = 0.95)

Объект	Содержание D-сорбитола, мг/мл		
	Введено	Найдено	S <sub>r</sub>
Зубная паста для детей "Oral B Stages"	0	3,6 ± 0,6	0,06
	9,1	12,6 ± 1,0	0,04
Жевательная резинка "Orbit"	0	7,2 ± 0,6	0,03
	9,1	16,4 ± 1,6	0,04
Диабетическое печенье "Харьковская бисквитная фабрика"	0	4,4 ± 0,4	0,04
	9,1	13,5 ± 0,4	0,01

Разработанная методика характеризуется удовлетворительной воспроизводимостью и правильностью. Полученные значения коррелируют с описанным в литературе содержанием сорбитола в исследуемых объектах [42,43]. Преимуществами разработанной методики по сравнению со стандартными титриметрическими [24], хроматографическими [19,21,44] и спектрофотометрическими [25] методиками определения сорбитола являются простота пробоподготовки, высокая экспрессность, селективность и экономичность анализа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрирована перспективность использования электрофоретически-

осажденных углеродных нанотрубок на поверхности СУ электрода для получения биосенсоров на основе НАД<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ.

Разработан чувствительный элемент амперометрического биосенсора для определения сорбитола на основе СУ, модифицированного углеродными нанотрубками и пленкой оксида кремния с иммобилизированной D-сорбитол-дегидрогеназой.

Методика определения сорбитола выгодно отличается простотой пробоподготовки, экспрессностью и может использоваться для скрининга содержания сорбитола в объектах пищевой и косметической промышленности.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Эггинс Б.Р. Химические и биологические сенсоры, Москва: Техносфера, 2005. С. 336.
2. Brinker C.J., Scherer G.W. Sol-Gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing, San Diego: Academic Press, 1990. С. 912.
3. Gupta R., Chaudhury N.K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosens Bioelectron.* 2007, 22(11), 2387–2399.
4. Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem Mater.* 1994, 6(10), 1605–1614.
5. Nadzhafova O., Etienne M., Walcarius A. Direct electrochemistry of hemoglobin and glucose oxidase in electrodeposited sol-gel silica thin films on glassy carbon. *Electrochem Commun.* 2007, 9(5), 1189–1195.
6. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials. *J Mater Chem.* 2006, 16(11), 1013–1030.
7. Рожанчук Т.С., Тананайко О.Ю., Мазуренко Е.А., Егоров О.А. Углеситалловый электрод, модифицированный пленкой SiO<sub>2</sub>-Гемоглобин-Золото, как перспективный чувствительный элемент биосенсора. *Журн Аналит Химии.* 2012, 67(2), 191.
8. Bartlett P.N. *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications*, Chippingham: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. С. 494.
9. Солдаткин О.О., Сосовська О.Ф., Бенілова І.В., Гончар М.В., Корпан Я.І. Ензимний кондуктометричний сенсор для визначення концентрації формальдегіду у модельних зразках. *Біополім і Кліт.* 2005, 21(5), 425–432.
10. Иванова Е.В., Шуман В., Рябов А.Д. Безреагентные ферментные сенсоры для on-line определения глицерина на основе электродов из углеродной пасты, содержащих рутениевые медиаторы. *Журн. Аналит. Химии.* 2009, 64(4), 421–427.
11. Agüí L., Eguílaz M., Peña-Farfal C., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on an Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode. *Electroanal.* 2009, 21(3-5), 386–391.
12. Di J., Cheng J., Xu Q., Zheng H., Zhuang J., Sun Y., et al. Direct electrochemistry of lactate dehydrogenase immobilized on silica sol-gel modified gold electrode and its application. *Biosens Bioelectron.* 2007, 23(5), 682–7.
13. Liu S., Cai C. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. *J Electroanal Chem.* 2007, 602(1), 103–114.
14. Shkotova L., Soldatkin a, Gonchar M., Schuhmann W., Dzyadevych S.V. Amperometric biosensor for ethanol detection based on alcohol oxidase immobilised within electrochemically deposited Resydrol film. *Mater Sci Eng C.* 2006, 26(2-3), 411–414.
15. Жмаева Е.В., Шеховцова Т.Н. Ферментативный метод определения неорганических и органических ингибиторов алкогольдегидрогеназы. *Журн Аналит Химии.* 2000, 55(8), 869–879.
16. Schauder S., Schneider K.H., Giffhorn F. Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology.* 1995, 141(8), 1857–1863.
17. Feng L., Liu Y., Tan Y., Hu J. Biosensor for the determination of sorbitol based on molecularly imprinted electrosynthesized polymers. *Biosens Bioelectron.* 2004, 19(11), 1513–1519.
18. Islam M.S., Sakaguchi E. Sorbitol-based osmotic diarrhea: possible causes and mechanism of prevention investigated in rats. *World J Gastroenterol.* 2006, 12(47), 7635–7641.
19. Yamamoto A., Ohmi H., Matsunaga A., Ando K., Hayakawa K., Nishimura M. Selective determination of D-sorbitol and D-mannitol in foodstuffs by ion chromatography with polarized photometric detection. *J Chromatogr A.* 1998, 804(1-2), 305–309.
20. Saidman S.B., Lobo-Castañón M.J., Miranda- A., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco P. Amperometric detection of D-sorbitol with NAD<sup>+</sup>-D-sorbitol dehydrogenase modified carbon paste electrode. *Anal Chim Acta.* 2000, 424(1), 45–50.
21. Miwa I., Kanbara M., Wakazono H., Okuda J. Analysis of sorbitol, galactitol, and myo-inositol in lens and sciatic nerve by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1988, 173(1), 39–44.
22. Sim H.-J., Jeong J.-S., Kwon H.-J., Kang T.H., Park H.M., Lee Y.-M., et al. HPLC with pulsed amperometric detection for sorbitol as a biomarker for diabetic neuropathy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009, 877(14-15), 1607–11.
23. Horwitz W. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 18th ed., Aoac International, 2005. .
24. Девятин В.А. Методы химического анализа в производстве витаминов, Москва: Медицина, 1964. С. 360.
25. ГОСТ 25268-82. Изделия кондитерские. Методы определения ксилита и сорбита. 2004.
26. Bergmeyer H.U., Gruber W., Gutmann I. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, Verlag Chemie, 1974. .

27. Šeřčovičová J., Filip J., Tomčík P., Gemeiner P., Bučko M., Magdolen P., et al. A biopolymer-based carbon nanotube interface integrated with a redox shuttle and a D-sorbitol dehydrogenase for robust monitoring of D-sorbitol. *Microchim Acta*. 2011, 175(1-2), 21–30.
28. Filip J., Šeřčovičová J., Tomčík P., Gemeiner P., Tkac J., Šeřčovičová J. A hyaluronic acid dispersed carbon nanotube electrode used for a mediatorless NADH sensing and biosensing. *Talanta*. 2011, 84(2), 355–361.
29. Hassler B.L., Kohli N., Zeikus J.G., Lee I., Worden R.M. Renewable dehydrogenase-based interfaces for bioelectronic applications. *Langmuir*. 2007, 23(13), 7127–7133.
30. Campbell C.E., Rishpon J. NADH Oxidation at the Honey-Comb Like Structure of Active Carbon: Coupled to Formaldehyde and Sorbitol Dehydrogenases. *Electroanal*. 2001, 13(1), 17–20.
31. Blaedel W.J., Jenkins R.A. Electrochemical oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Chem*. 1975, 47(8), 1337–1343.
32. Wang J., Angnes L., Martinez T. Scanning tunneling microscopic probing of surface fouling during the oxidation of nicotinamide coenzymes. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1992, 29(2), 215–221.
33. Lin Y., Yantasee W., Wang J. Carbon nanotubes (CNTs) for the development of electrochemical biosensors. *Front Biosci*. 2005, 10(1-3), 492–505.
34. Rubianes M.D., Rivas G.A. Enzymatic Biosensors Based on Carbon Nanotubes Paste Electrodes. *Electroanal*. 2005, 17(1), 73–78.
35. Wang J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanal*. 2005, 17(1), 7–14.
36. Zhang M., Smith A., Gorski W. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. *Anal Chem*. 2004, 76(17), 5045–5050.
37. Wang Z., Etienne M., Kohring G.W., Walcarius A. Critical Effect of Polyelectrolytes on the Electrochemical Response of Dehydrogenases Entrapped in Sol-Gel Thin Films. *Electroanal*. 2010, 22(17-18), 2092–2100.
38. Cho J., Konopka K., Rozniatowski K., Garcialecina E., Shaffer M., Boccaccini A.R. Characterisation of carbon nanotube films deposited by electrophoretic deposition. *Carbon*. 2009, 47(1), 58–67.
39. Wang Z., Etienne M., Kohring G.-W., Bon-Saint-Côme Y., Kuhn A., Walcarius A. Electrochemically assisted deposition of sol-gel bio-composite with co-immobilized dehydrogenase and diaphorase. *Electrochim Acta*. 2011, 56(25), 9032–9040.
40. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии, Москва: Мир, 1981. С. 534.
41. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии, Москва: Высшая школа, 2002. С. 351.
42. Reynolds E.C. Contents of toothpaste - safety implications. *Aust Prescr*. 1994, 14(2), 49–51.
43. Birkhed D., Edwardsson S., Wikesjö U., Ahldén M.-L., Ainamo J. Effect of 4 Days Consumption of Chewing Gum Containing Sorbitol or a Mixture of Sorbitol and Xylitol on Dental Plaque and Saliva. *Caries Res*. 1983, 17(1), 76–88.
44. ГОСТ Р 53766-2009. Продукция соковая. Определение сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. 2009.