



Специалисты радиозлектронного комплекса уже успели оценить серию книг «Мир радиозлектроники» за тщательный отбор научной и технической литературы по передовым направлениям развития науки и технологий радиозлектроники. Публикуемые в серии книги позволяют поддерживать современный уровень знаний, способствуя научно-техническому прогрессу в радиозлектронной промышленности, сокращению технологического отставания и подготовке необходимых кадров.

*Директор Департамента радиозлектронной промышленности
Минпромторга РФ
А.С. Якуник*



ТЕХНОСФЕРА
Рекламно - издательский центр

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ СЕРИИ КНИГ «МИР РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ»

Якунин Александр Сергеевич, директор Департамента радиоэлектронной промышленности Минпромторга РФ – председатель редсовета

Члены совета:

Авдонин Борис Николаевич, ген. директор ОАО ЦНИИ «Электроника», д.т.н., профессор, г. Москва

Акопян Иосиф Григорьевич, ОАО «МНИИ «Агат», д.т.н., профессор, г. Москва

Ананьев Алексей Николаевич, ген. директор ОАО «Системы управления», г. Москва

Анцев Георгий Владимирович, ген. директор ОАО «НПП «Радар ммс», г. Санкт-Петербург

Белый Юрий Иванович, ген. директор НИИП им. В.В. Тихомирова, МО, г. Жуковский

Беккиев Азрет Юсупович, ген. директор ОАО «Концерн «Созвездие», д.т.н., профессор, г. Воронеж

Боев Сергей Федотович, ген. директор ОАО «РТИ», д.э.н., профессор, г. Москва

Борисов Юрий Иванович, заместитель Министра обороны РФ, д.т.н., профессор, г. Москва

Букашкин Сергей Анатольевич, ген. директор ОАО «Концерн «Автоматика», д.т.н., профессор, г. Москва

Бушуев Николай Александрович, ген. директор ОАО «НПП «Алмаз», д.э.н., профессор, к.ф.-м.н., г. Саратов

Васильев Андрей Георгиевич, ген. директор ОАО «МРТИ РАН», д.ф.-м.н., профессор, г. Москва

Верба Владимир Степанович, ген. директор ОАО «Концерн радиостроения «Вега», д.т.н., профессор, г. Москва

Верник Петр Аркадьевич, ген. директор компании «Золотой Шар», г. Москва

Вилкова Надежда Николаевна, ген. директор ЗАО «МНИТИ», к.т.н., д.э.н., профессор, г. Москва

Гаршин Вадим Вениаминович, ген. директор ОАО «Мосэлектронпроект», г. Москва

Гуляев Юрий Васильевич, директор института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова, академик РАН, г. Москва

Зверев Андрей Владимирович, ген. директор ОАО «Российская электроника», к.э.н., г. Москва

Козлов Геннадий Викторович, советник ген. директора ОАО «Концерн ПВО «Алмаз-Антей», д.т.н., профессор, г. Москва

Комяков Алексей Владимирович, ген. директор ФНПЦ ОАО «НПП «Полет» г. Нижний Новгород

Красников Геннадий Яковлевич, ген. директор ОАО «НИИМЭ», академик РАН, г. Зеленоград

Критенко Михаил Иванович, руководитель службы по активам РЭК Департамента промышленных активов ГК «Ростехнологии», к.т.н., г. Москва

Мальцев Петр Павлович, директор ИСВЧПЭ РАН, д.т.н., профессор, г. Москва

Меньшиков Владислав Владимирович, ген. директор ОАО «Концерн ПВО «Алмаз-Антей», г. Москва

Минаев Владимир Николаевич, д.т.н., профессор, г. Москва

Муравьев Сергей Алексеевич, советник директора Департамента радиоэлектронной промышленности Минпромторга России, к.т.н., с.н.с., г. Москва

Немудров Владимир Георгиевич, ген. директор НИИМА «Прогресс», д.т.н., профессор, г. Москва

Попов Владимир Васильевич, ген. директор ОАО «Светлана», к.т.н., г. Санкт-Петербург

Сигов Александр Сергеевич, академик РАН, г. Москва

Турилов Валерий Александрович, ген. директор ОАО «КНИИТМУ», к.т.н., доцент, г. Калуга

Федоров Игорь Борисович, ректор, заведующий кафедрой «Радиоэлектронные системы и устройства» Московского государственного технического университета имени Н.Э. Баумана, академик РАН, д.т.н., профессор, г. Москва

Чаплыгин Юрий Александрович, ректор Московского государственного института электронной техники (ТУ МИЭТ), чл.-корр. РАН, г. Зеленоград

Шахнович Илья Владимирович, шеф-редактор РИЦ «Техносфера», г. Москва

Шубарев Валерий Антонович, ген. директор ОАО «Авангард», д.т.н., профессор, г. Санкт-Петербург



МИР радиоэлектроники

Ф.–Г. Баника

Химические
и биологические сенсоры:
основы и применения

Перевод с английского
к.т.н., доц. И.М. Лазера

под редакцией
д.т.н., проф. В.А. Шубарева

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2014



*Издание осуществлено при поддержке
ОАО «Авангард»*

УДК 577:54:53
ББК 28:24;22.36

Б 23 Баника Ф.-Г.

Химические и биологические сенсоры: основы и применения

Редактор-консультант проф. А. Дж. Фогт

Москва: Техносфера, 2014. – 880 с., ISBN 978-5-94836-380-6

В книге представлены теоретические основы и математические модели химических и биологических сенсоров различных типов: ферментативных, иммунных, термохимических, потенциометрических, полупроводниковых (химических), хемирезистивных, амперометрических, электрохимических (аффинных и нуклеино-кислотных), импедометрических, оптических (включая Рамановскую спектроскопию) и акустических. Особое внимание уделено практическому аспекту проектирования и производства химических и биологических сенсоров на основе современных наноматериалов. Большой объем книги посвящен методам преобразования параметров химических и биологических сред в электронный сигнал.

Поскольку химическая сенсорика представляет собой междисциплинарную область, книга будет полезна химикам, биохимикам, микробиологам и физикам, занимающимся исследованиями в области химических и биологических сенсоров, а также разработчикам микросистемотехнических устройств, преподавателям, аспирантам и студентам.

Издание на русском языке планировалось к выпуску в 2013 году, однако в процессе подготовки перевода поступило предложение автора опубликовать в России сразу новое, второе издание, которое должно выйти в издательстве John Wiley & Sons, Ltd на английском языке лишь в 2016 году. Таким образом, по согласованию с правообладателем, вниманию русского читателя представлено 2-е издание монографии, исправленное и дополненное.



УДК 577:54:53
ББК 28:24;22.36

Все права защищены. Авторизованный перевод с английского издания «Джон Вайли энд Санс Лимитед». ЗАО РИЦ «Техносфера» несет полную ответственность за правильность перевода. «Джон Вайли энд Санс Лимитед» освобождается от этой ответственности. Ни одна часть книги не может быть произведена в какой-либо форме без письменного разрешения оригинального правообладателя авторского права «Джон Вайли энд Санс Лимитед»

© 2012 John Wiley & Sons, Ltd

© 2014, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-380-6
ISBN 978-0-470-71066-1 (англ.)

Содержание

Введение научного редактора перевода.....	21
Введение к русскому изданию	24
Благодарности	27
Введение	27
Глава 1	
Что такое химические сенсоры?	30
1.1. Химические сенсоры: определение и компоненты.....	30
1.2. Методы распознавания.....	32
1.2.1. Общие аспекты	32
1.2.2. Ионное распознавание.....	33
1.2.3. Распознавание аффинным взаимодействием.....	33
1.2.4. Распознавание нуклеиновых кислот	34
1.2.5. Распознавание ферментами.....	35
1.2.6. Распознавание клетками и тканями биологического происхождения	36
1.2.7. Газовая и паровая сорбция	36
1.3. Методы преобразования	36
1.3.1. Общие аспекты	36
1.3.2. Термометрическое преобразование.....	37
1.3.3. Преобразование, основанное на механических эффектах	37
1.3.4. Резистивное и емкостное преобразование	37
1.3.5. Электрохимическое преобразование	38
1.3.6. Оптическое преобразование	39
1.4. Структура сенсоров и их производство.....	40
1.5. Калибровка сенсора	41
1.6. Показатели качества сенсора.....	43
1.6.1. Надежность измерений	44
1.6.2. Селективность и специфика	45
1.6.3. Способности обнаружения и определения количества	45
1.6.4. Время формирования ответного сигнала	47
1.7. Сенсорные матрицы.....	47
1.7.1. Количественный анализ сенсорными матрицами с перекрестной чувствительностью	47
1.7.2. Качественный анализ сенсорными матрицами с перекрестной чувствительностью	49
1.7.3. Применения искусственной нервной сети в устройстве «искусственный нос/язык»	51
1.7.4. Перспективный обзор.....	51



1.8.	Сенсоры в проточно-аналитических системах	52
1.9.	Применение химических сенсоров	53
1.9.1.	Применение химических сенсоров в экологии	53
1.9.2.	Применение химических сенсоров в здравоохранении	55
1.9.3.	Применение химических сенсоров в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и биотехнологии	55
1.9.4.	Химические сенсоры в оборонных применениях	56
1.10.	Литература по химическим и биологическим сенсорам	57
1.10.1.	Организация текста книги	58
	Литература	60

Глава 2

Структура и свойства протеинов

2.1.	Аминокислоты	64
2.2.	Химическая структура протеинов	65
2.3.	Структура макромолекул протеина	66
2.4.	Нековалентные химические связи в молекулах протеина	69
2.5.	Протеины в процессах распознавания	70
2.6.	Перспективный обзор	71
	Литература	73

Глава 3

Ферменты и ферментативные сенсоры

3.1.	Общие положения	74
3.2.	Номенклатура и классификация ферментов	75
3.3.	Компоненты и кофакторы ферментов	77
3.4.	Некоторые ферменты, имеющие отношение к биосенсорам	79
3.4.1.	Оксидазы	79
3.4.2.	Дегидрогеназы	82
3.4.3.	Гидролазы	83
3.4.4.	Лиазы	85
3.4.5.	Перспективный обзор	85
3.5.	Методы преобразования в ферментативных биосенсорах	86
3.5.1.	Методы преобразования	86
3.5.2.	Многоферментативные сенсоры	88
3.6.	Кинетика ферментативных реакций	89
3.6.1.	Механизм Михаэлиса–Ментена	89
3.6.2.	Другие механизмы	92
3.6.3.	Количественное определение ферментативной активности	93
3.6.4.	Влияние pH-фактора на ферментативные реакции	95
3.6.5.	Влияние температуры на ферментативные реакции	95
3.6.6.	Перспективный обзор	96
3.7.	Ингибирование ферментов	97
3.7.1.	Обратимое ингибирование	97
3.7.2.	Необратимое ингибирование	99

3.7.3. Ферментативные сенсоры ингибиторов: разработка и принцип действия	99
3.7.4. Применение ферментно-ингибированных сенсоров	101
3.8. Заключительные замечания	102
Литература	103

Глава 4

Математическое моделирование ферментативных сенсоров 106

4.1. Введение	106
4.2. Ферментативный сенсор при условиях внешней диффузии	107
4.2.1. Физическая модель	107
4.2.2. Математическая модель	108
4.2.3. Кинетический случай нулевого порядка	109
4.2.4. Кинетический случай первого порядка	110
4.2.5. Динамический диапазон и предел обнаружения при условиях внешней диффузии	111
4.3. Ферментативный сенсор при управлении внутренней диффузией	114
4.3.1. Ответный сигнал в установившемся режиме	114
4.3.2. Переходный режим и время отклика при условиях внутренней диффузии	117
4.4. Общий случай	120
4.4.1. Модель	120
4.4.2. Эффект числа Био	122
4.4.3. Воздействие констант разделения и коэффициентов диффузии	124
4.4.4. Экспериментальные тесты для кинетического режима ферментативного датчика	125
4.5. Перспективный обзор	126
Литература	127

Глава 5

Материалы и методы производства химических сенсоров .. 128

5.1. Введение	128
5.2. Нековалентная иммобилизация на твердых поверхностях	129
5.3. Ковалентное сопряжение	131
5.3.1. Сшиватели нулевой длины	131
5.3.2. Бифункциональные сшиватели	132
5.3.3. Иммобилизация протеиновым сшиванием	134
5.4. Подложки и их модификации	135
5.4.1. Основные аспекты	135
5.4.2. Естественные полимеры	135
5.4.3. Синтетические полимеры	137
5.4.4. Связывание с активными полимерами	138
5.4.5. Связывание с неактивными полимерами	139
5.4.6. Неорганические подложки	141
5.4.7. Углеродные материалы подложек	141
5.4.8. Металлические подложки	142
5.4.9. Полупроводниковые подложки	144

5.5.	Связывание посредством аффинных реакций	145
5.6.	Тонкие молекулярные слои	147
5.6.1.	Самоорганизация амфифильных соединений	147
5.6.2.	Двухслойные липидные мембраны	149
5.6.3.	Альтернативная сборка слоя за слоем	150
5.7.	Методы золь-гелевой химии	152
5.8.	Гидрогели	155
5.8.1.	Физически сшитые гидрогели	155
5.8.2.	Химически сшитые гидрогели	156
5.8.3.	Окислительно-восстановительные гидрогели	157
5.8.4.	Чувствительные гидрогели	157
5.9.	Электропроводящие полимеры	159
5.10.	Инкапсуляция	163
5.11.	Захват в мезопористых материалах	164
5.12.	Полимерные мембраны	166
5.12.1.	Размещение полимеров на твердых поверхностях	166
5.12.2.	Проницаемо-селективные мембраны	167
5.13.	Методы микрообработки в технологии химических сенсоров	169
5.13.1.	Капельные матрицы	170
5.13.2.	Толсто пленочная технология	171
5.13.3.	Тонкопленочная технология	172
5.13.4.	Мягкая литография	174
5.13.5.	Микроконтактная печать биосоединений	175
5.14.	Заключительные замечания	177
	Литература	178

Глава 6

Аффинное распознавание	185
6.1. Общие принципы	185
6.2. Иммуносенсоры	186
6.2.1. Антитела: структура и функция	186
6.2.2. Аффинность и авидность комплекса антитело-антиген.....	188
6.2.3. Аналитические применения	189
6.2.4. Методы преобразования без меток в иммуносенсорах	191
6.2.5. Методы преобразования с метками в иммуносенсорах	191
6.2.6. Метки фермента в иммунологическом исследовании.....	192
6.3. Методы иммобилизации в иммуносенсорах	194
6.4. Форматы иммуноанализа	195
6.5. Протеиновые и пептидные матрицы	198
6.6. Биологические рецепторы.....	201
6.7. Искусственные рецепторы	203
6.7.1. Циклодекстрины и супрамолекулярная химия	203
6.7.2. Каликсарены	205
6.7.3. Молекулярные импринтированные полимеры (МИП)	206
6.8. Перспективный обзор.....	208
Литература	210

Глава 7

Нуклеиновые кислоты в химических сенсорах	213
7.1. Структура и свойства нуклеиновых кислот	213
7.2. Аналоги нуклеиновых кислот	218
7.3. Нуклеиновые кислоты как рецепторы в процессах распознавания	219
7.3.1. Гибридизация: полинуклеотидное распознавание	219
7.3.2. Распознавание ненуклеотидных соединений	221
7.3.3. Распознавание аптамерами нуклеиновых кислот	223
7.4. Иммобилизация нуклеиновых кислот	225
7.4.1. Адсорбция	225
7.4.2. Иммобилизация самосборкой	226
7.4.3. Иммобилизация полимеризацией	227
7.4.4. Ковалентная иммобилизация на функционализированных поверхностях	227
7.4.5. Связывание аффинными реакциями	229
7.4.6. Гибриды полинуклеотидов и наночастиц	229
7.5. Методы преобразования в сенсорах нуклеиновых кислот	230
7.5.1. Методы преобразования без меток	230
7.5.2. Преобразование на основе меток	230
7.5.3. Усиление ДНК	232
7.6. Микроматрицы ДНК	234
7.7. Перспективный обзор	235
Литература	237

Глава 8

Применение наноматериалов в химических сенсорах	241
8.1. Общие аспекты	241
8.2. Металлические наноматериалы	243
8.2.1. Синтез металлических наночастиц	244
8.2.2. Функционализация золотых наночастиц	245
8.2.3. Применение металлических наночастиц в химических сенсорах	246
8.3. Углеродные наноматериалы	247
8.3.1. Структура углеродных нанотрубок	248
8.3.2. Синтез кремниевых нанотрубок	249
8.3.3. Химическая реактивность и функционализация	250
8.3.4. Применение углеродных нанотрубок в химических сенсорах	252
8.3.5. Углеродные нановолокна	253
8.4. Полимерные и неорганические нановолокна	255
8.5. Магнитные микро- и наночастицы	257
8.5.1. Магнетизм и магнитные материалы	258
8.5.2. Магнитные наночастицы	259
8.5.3. Магнитные биосенсоры и биокристаллы	260
8.5.4. Магнитные наночастицы как вспомогательные компоненты в биосенсорах	262
8.5.5. Перспективный обзор	263
8.6. Полупроводниковые наноматериалы	264
8.6.1. Синтез и функционализация квантовых точек	264

8.6.2. Применение квантовых точек.....	266
8.7. Кремниевые наночастицы.....	267
8.7.1. Синтез, свойства и применения	267
8.8. Дендримеры	268
8.8.1. Свойства и применения	268
8.8.2. Краткое изложение.....	270
Литература	271

Глава 9

Термохимические сенсоры

278

9.1. Температурные преобразователи	278
9.1.1. Резистивные температурные преобразователи	278
9.1.2. Термoeлементы	279
9.2. Ферментативные термические сенсоры	280
9.2.1. Принципы термического преобразования в ферментативных сенсорах.....	280
9.2.2. Ферментативные сенсоры на основе термисторов	281
9.2.3. Ферментативные сенсоры на основе термоэлементов.....	283
9.2.4. Мультиферментативные термические сенсоры	283
9.2.5. Перспективный обзор.....	284
9.3. Термокаталитические сенсоры горючих газов	285
9.3.1. Структура и принципы функционирования.....	285
Литература	288

Глава 10

Потенциометрические сенсоры

290

10.1. Введение	290
10.2. Гальванический элемент в равновесном состоянии	291
10.2.1. Термодинамика растворов электролитов	291
10.2.2. Термодинамика гальванического элемента.....	294
10.3. Распределение ионов на границе растворов двух электролитов	298
10.3.1. Распределение заряда на переходе двух растворов электролитов. Диффузионный потенциал	298
10.3.2. Распределение ионов на границе вода / полупроницаемая мембрана	300
10.4. Потенциометрические ионные сенсоры — обобщение	302
10.4.1. Конфигурация сенсора и функция отклика.....	302
10.4.2. Селективность потенциометрических ионных сенсоров	305
10.4.3. Диапазон ответного сигнала потенциометрического ионного сенсора	307
10.4.4. Помехи от химических реакций, протекающих в выборке.....	308
10.4.5. Время отклика потенциометрических ионных сенсоров.....	308
10.4.6. Перспективный обзор.....	309
10.5. Слаборастворимые твердые соли как мембранные материалы.....	310
10.5.1. Мембранные композиции.....	310
10.5.2. Функция ответного сигнала и селективность	310
10.6. Ионные сенсоры со стеклянными мембранами	313
10.6.1. Структура и свойства мембраны	313

10.6.2. Функция отклика и селективность	315
10.6.3. Халькогенидные стеклянные мембраны	316
10.7. Ионные сенсоры на молекулярных рецепторах. Общие аспекты	318
10.8. Жидкие ионные обменники как ионные рецепторы	319
10.8.1. Ионное распознавание жидкими ионными обменниками	319
10.8.2. Заряженные рецепторные мембраны	320
10.8.3. Функция отклика и селективность	320
10.8.4. Перспективный обзор	322
10.9. Нейтральные ионные рецепторы (ионофоры)	323
10.9.1. Общие принципы	323
10.9.2. Химия ионного распознавания нейтральными рецепторами	324
10.9.3. Воздействие факторов множественности связей, стеричности и возможностей приспособления	326
10.9.4. Нейтральные рецепторные ионоселективные мембраны: структура, селективность и функция отклика	327
10.9.5. Нейтральные нециклические ионные рецепторы	329
10.9.6. Макроциклические катионные рецепторы	331
10.9.7. Макроциклические анионные рецепторы	333
10.9.8. Нейтральные рецепторы для органических ионов	334
10.9.9. Порфирины и фталоцианины в качестве анионного рецептора	335
10.9.10. Перспективный обзор	336
10.10. Молекулярные печатные полимеры как ионно-чувствительные материалы	337
10.11. Проводящие полимеры как ионно-чувствительные материалы	339
10.12. Твердые контакты потенциометрических ионных сенсоров	340
10.13. Миниатюризация потенциометрических ионных сенсоров	341
10.14. Анализ с помощью потенциометрических ионных сенсоров	343
10.15. Последние достижения в области потенциометрических ионных сенсоров	345
10.16. Потенциометрические газовые сенсоры	347
10.17. Потенциометрические газовые сенсоры с твердым электролитом	349
10.17.1. Общие принципы	349
10.17.2. Потенциометрические кислородные сенсоры с твердым электролитом	350
10.17.3. Применение потенциометрических кислородных сенсоров	352
10.17.4. Виды потенциометрических газовых сенсоров с твердым электролитом	353
10.17.5. Потенциометрические газовые сенсоры со смешанными потенциалами	355
10.17.6. Перспективный обзор	356
10.18. Потенциометрические биокаталитические сенсоры	357
10.19. Потенциометрические аффинные сенсоры	360
10.20. Краткое изложение	361
Литература	363

Глава 11

Химические сенсоры на полупроводниковых электронных приборах

11.1. Электронные полупроводниковые устройства	372
--	-----

11.1.1. Полупроводниковые материалы.....	372
11.1.2. Зонная теория полупроводников.....	373
11.1.3. Конденсаторы со структурой металл – диэлектрик – полупроводник (МДП).....	374
11.1.4. Полевые транзисторы со структурой МДП.....	378
11.1.5. Перспективный обзор.....	382
11.2. Ионные сенсоры на полевых приборах и их применение.....	383
11.2.1. Приборы со структурой электролит – диэлектрик – полупроводник...	383
11.2.2. Полевые рН-сенсоры.....	385
11.2.3. Газовые зонды на основе рН ИЧПТ.....	388
11.2.4. ИЧПТ с мембранным покрытием.....	389
11.2.5. Свето-адресуемые потенциометрические сенсоры (САПС).....	392
11.2.6. Эталонные электроды для ИЧПТ-сенсоров.....	393
11.2.7. Ферментативные сенсоры на основе ПТ (ФПТ).....	394
11.2.8. Перспективный обзор.....	395
11.3. Газовые сенсоры на ПТ.....	397
11.3.1. Водородные сенсоры на ПТ.....	397
11.3.2. Сенсоры для других газов на ПТ с металлическим затвором.....	400
11.3.3. Органические полупроводники как газочувствительные материалы.....	402
11.3.4. Органические полупроводниковые газовые сенсоры на ПТ.....	403
11.3.5. Механизм ответа газовых сенсоров на ПТ.....	405
11.3.6. Перспективный обзор.....	406
11.4. Газовые сенсоры на диодах Шоттки.....	408
11.5. Полевые транзисторы на углеродных нанотрубках.....	410
11.6. Заключительные замечания.....	412
Литература.....	413

Глава 12

Резистивные газовые сенсоры (хемирезисторы).....	418
12.1. Полупроводниковые металлооксидные газовые сенсоры.....	418
12.1.1. Введение.....	418
12.1.2. Газоответный механизм.....	418
12.1.3. Ответный сигнал на влажность.....	420
12.1.4. Структура сенсора.....	421
12.1.5. Синтез и напыление металлических оксидов.....	423
12.1.6. Изготовление металлооксидных хемирезисторов.....	423
12.1.7. Селективность и чувствительность.....	424
12.1.8. Перспективный обзор.....	426
12.2. Хемирезисторы на основе органических материалов.....	427
12.3. Применение наноматериалов в резистивных газовых сенсорах.....	429
12.4. Резистивные газовые сенсорные матрицы.....	431
12.5. Итоговая информация.....	433
Литература.....	434

Глава 13

Методы динамического электрохимического преобразования.....	437
--	------------

13.1.	Введение	437
13.2.	Электрохимические элементы в амперометрическом анализе	438
13.3.	Электролитический ток и его аналитическое значение	440
13.3.1.	Отношение ток/концентрация	440
13.3.2.	Функция ток/потенциал: выбор рабочего потенциала	444
13.3.3.	Необратимые электрохимические реакции	446
13.3.4.	Соглашение по обозначениям	447
13.3.5.	Геометрия диффузионных процессов	447
13.3.6.	Перспективный обзор	448
13.4.	Электроды с мембранным покрытием	449
13.5.	Нефарадеевские процессы	451
13.5.1.	Происхождение нефарадеевских токов	451
13.5.2.	Двойной электрический слой на границе электрод/раствор	451
13.5.3.	Зарядный ток	453
13.5.4.	Применение емкостных измерений в химических сенсорах	454
13.6.	Кинетика электрохимических реакций	455
13.6.1.	Реакционная скорость электрохимической реакции	455
13.6.2.	Отношения ток/потенциал	458
13.6.3.	Влияние массопереноса на кинетику электрохимических реакций ...	458
13.6.4.	Равновесные условия	460
13.6.5.	Электрохимическая реакция при отсутствии ограничений массопе- реноса	461
13.6.6.	Поляризующиеся и неполяризующиеся электроды	463
13.6.7.	Достижение стационарных условий в электрохимических измерениях	464
13.6.8.	Перспективный обзор	466
13.7.	Электрохимические методы	468
13.7.1.	Стационарные методы	468
13.7.2.	Хрооамперометрия при постоянном потенциале	469
13.7.3.	Полярография	471
13.7.4.	Вольтамперометрия с линейным сканированием (ВЛС) и цикличе- ская вольтамперометрия (ЦВ)	472
13.7.5.	Импульсная вольтамперометрия	475
13.7.6.	Прямоугольно-волновая вольтамперометрия (ПВВ)	477
13.7.7.	Вольтамперометрия переменного тока	479
13.7.8.	Хронопотенциалометрические методы	481
13.7.9.	Электрохимия с ультрамикрoэлектрoдами	482
13.7.10.	Усиление тока переработкой реагента	485
13.7.11.	Сканирующая электрохимическая микроскопия	486
13.7.12.	Перспективный обзор	487
13.8.	Электродные материалы	490
13.8.1.	Углеродые электроды	490
13.8.2.	Электроды из благородных металлов	493
13.8.3.	Металлооксидные пленки	494
13.8.4.	Изготовление электродов	494
13.8.5.	Применение углеродных наноматериалов в электрохимии	495
13.8.6.	Перспективный обзор	497
13.9.	Катализ в электрохимических реакциях	498
13.9.1.	Гомогенный окислительно-восстановительный катализ	498

13.9.2. Гомогенное посредничество в электрохимических ферментативных реакциях	500
13.9.3. Катализ иммобилизованными ферментами	501
13.9.4. Гетерогенный окислительно-восстановительный катализ	503
13.9.5. Поверхностная активация электрохимических реакций	506
13.9.6. Перспективный обзор	507
13.10. Амперометрические газовые сенсоры	509
13.10.1. Кислородный сенсор Кларка	509
13.10.2. Сенсоры оксида азота	511
13.10.3. Другие виды амперометрических газовых сенсоров	513
13.10.4. Газовый сенсор гальванического типа	514
13.10.5. Амперометрические газовые сенсоры с твердым электролитом	515
Литература	516

Глава 14

Амперометрические ферментативные сенсоры	522
14.1. Амперометрические ферментативные сенсоры первого поколения	522
14.2. Амперометрические ферментативные сенсоры второго поколения	525
14.2.1. Принципы	525
14.2.2. Неорганические посредники	527
14.2.3. Органические посредники	527
14.2.4. Производные ферроцена в качестве посредников	529
14.2.5. Посредничество в переносе электрона окислительно-восстановительными полимерами	531
14.2.6. Ощущение организованными молекулярными многослойными структурами	533
14.3. Посредник как аналит	535
14.4. Проводящие полимеры в амперометрических ферментативных сенсорах	537
14.5. Прямой переноса электрона: 3-е поколение амперометрических ферментативных сенсоров	538
14.5.1. Проводящие органические солевые электроды	538
14.5.2. Прямая передача электрона с FAD-гем-ферментами	539
14.5.3. Получение прямого переноса электрона с помощью наноматериалов	540
14.6. NAD/NADH ⁺ в качестве посредника в биосенсорах	542
14.7. Обобщенная информация	543
Литература	545

Глава 15

Математическое моделирование опосредованных амперометрических ферментативных сенсоров	550
15.1. Условия внешней диффузии	550
15.1.1. Формулировка модели	551
15.1.2. Отклик сенсора: предельные случаи	553
15.1.3. Динамический диапазон и предел обнаружения	555
15.1.4. Другие теоретические модели	558
15.1.5. Перспективный обзор	558

15.2. Условия внутренней диффузии	560
15.2.1. Создание модели	560
15.2.2. Безразмерные параметры и переменные	562
15.2.3. Граничные условия.....	564
15.2.4. Решение дифференциальных уравнений. Диаграмма вариантов	565
15.2.5. Кинетические токи	565
15.2.6. Диффузионные токи.....	566
15.2.7. Перспективный обзор.....	568
Литература	569

Глава 16

Электрохимические аффинные и нуклеино-кислотные сенсоры.....

16.1. Амперометрические аффинные сенсоры	571
16.1.1. Окислительно-восстановительные метки в амперометрических иммуносенсорах.....	571
16.1.2. Ферментно-связанные амперометрические иммуносенсоры	572
16.1.3. Несепарационные амперометрические иммуносенсоры	574
16.1.4. Применение наноматериалов в амперометрических иммуносенсорах	576
16.1.5. Печатные полимеры в амперометрических аффинных сенсорах	578
16.1.6. Перспективный обзор.....	581
16.2. Электрохимические сенсоры на основе нуклеиновых кислот	583
16.2.1. Электрохимические реакции нуклеиновых оснований	583
16.2.2. Амперометрические сенсоры нуклеиновой кислоты на основе самоиндицирующей гибридизации.....	584
16.2.3. Интеркалирующие окислительно-восстановительные индикаторы....	587
16.2.4. Ковалентно связанные окислительно-восстановительные индикаторы в сэндвич-технологии анализа	588
16.2.5. Ковалентно связанные окислительно-восстановительные индикаторы в пространственном преобразовании.....	589
16.2.6. Ферментные метки в амперометрических нуклеино-кислотных сенсорах.....	590
16.2.7. Электрохимические ДНК-матрицы	593
16.2.8. Нуклеиновые кислоты как распознающие материалы ненуклеотидных соединений.....	593
16.2.9. Аптамерные амперометрические сенсоры.....	594
16.2.10. Перспективный обзор.....	596
Литература	598

Глава 17

Сенсоры на основе электрического импеданса

17.1. Электрический импеданс: термины и определения.....	603
17.2. Электрохимическая импедансная спектроскопия	605
17.2.1. Основные понятия и определения	605
17.2.2. Нефарадеевские процессы	608
17.2.3. Фарадеевские процессы.....	610

17.2.4. Зондирование поверхности электрода электрохимической импедансной спектроскопией	612
17.3. Электрохимические импедансные аффинные сенсоры.....	614
17.3.1. Электрохимическое импедансное преобразование в аффинных сенсорах	614
17.3.2. Структура импедометрических биосенсоров	616
17.3.3. Емкостные биосенсоры.....	617
17.3.4. Усиление сигнала	619
17.3.5. Импедометрические сенсоры на основе синтетических рецепторов...	620
17.3.6. Применение импедометрических аффинных сенсоров	622
17.4. Биокаталитические импедометрические сенсоры	623
17.5. Перспективный обзор.....	624
17.6. Импедометрические сенсоры нуклеиновых кислот.....	626
17.6.1. Нефарадеевские импедометрические сенсоры ДНК	626
17.6.2. Фарадеевские импедометрические сенсоры ДНК.....	627
17.6.3. Импедометрические аптасенсоры	629
17.7. Кондуктометрические сенсоры	630
17.7.1. Электропроводность растворов электролитов	630
17.7.2. Измерение проводимости.....	633
17.7.3. Кондуктометрические преобразователи	634
17.7.4. Кондуктометрические ферментативные сенсоры	635
17.7.5. Кондуктометрическая трансдукция хеморезистивными материалами	638
17.7.6. Кондуктометрические сенсоры на основе ионных каналов	641
17.7.7. Перспективный обзор.....	642
17.8. Импедометрические сенсоры для газов и паров	644
17.8.1. Влажность: термины и определения	644
17.8.2. Резистивные сенсоры влажности	645
17.8.3. Емкостной сенсор влажности	648
17.8.4. Емкостной газовый сенсор	649
17.8.5. Интегрированные импедометрические газовые сенсоры и сенсорные матрицы	650
17.8.6. Перспективный обзор.....	651
Литература	653

Глава 18

Оптические сенсоры: основы.....	658
18.1. Электромагнитное излучение	658
18.2. Оптические волноводы в химических сенсорах	661
18.2.1. Оптические волокна: структура и распространение света.....	661
18.2.2. Пассивные волоконно-оптические сенсорные платформы	663
18.2.3. Активные волоконно-оптические сенсорные платформы	664
18.2.4. Планарные волноводы.....	665
18.2.5. Капиллярные волноводы	666
18.2.6. Перспективный обзор.....	666
18.3. Спектрохимические методы преобразования	667
18.3.1. Поглощение света	667
18.3.2. Диффузная отражательная спектроскопия	668

18.3.3. Люминесценция	669
18.3.4. Флуоресцентная спектрометрия.....	670
18.3.5. Измерения при стационарной флуоресценции	672
18.3.6. Флуориметрия с временным разрешением.....	674
18.3.7. Флуоресценция тушения.....	676
18.3.8. Резонансный перенос энергии.....	678
18.3.9. Хемилюминесценция и биолюминесценция	679
18.3.10. Электрохимически генерированная хемилюминесценция	680
18.3.11. Рамановская спектрометрия	681
18.3.12. Перспективный обзор.....	682
18.4. Схемы преобразования в спектрохимических сенсорах.....	685
18.4.1. Прямое преобразование	685
18.4.2. Косвенное (конкурентно-связывающее) преобразование	687
18.4.3. Перспективный обзор.....	688
18.5. Волоконно-оптические сенсорные матрицы	689
18.6. Преобразование без меток в оптических сенсорах	690
18.6.1. Поверхностная плазмонная резонансная спектрометрия	690
18.6.2. Интерферометрическое преобразование	692
18.6.3. Резонансное зеркало	695
18.6.4. Резонансная волноводная решетка	696
18.6.5. Перспективный обзор.....	697
18.7. Преобразование фотонными приборами.....	697
18.7.1. Оптические микрорезонаторы	698
18.7.2. Фотонные кристаллы	699
18.7.3. Перспективный обзор.....	702
Литература	702

Глава 19

Оптические сенсоры: применения.....	707
19.1. Оптические сенсоры на основе кислотно-щелочных индикаторов.....	707
19.1.1. Оптические сенсоры pH	707
19.1.2. Оптические сенсоры для кислотных и щелочных газов	710
19.2. Оптические ионные сенсоры	712
19.2.1. Оптические ионные сенсоры прямого действия	712
19.2.2. Оптические ионные сенсоры косвенного действия	713
19.3. Оптические кислородные сенсоры.....	716
19.4. Оптические ферментативные сенсоры	718
19.4.1. Принципы и конструкция	718
19.4.2. Оптический мониторинг реагентов или продуктов реакции	719
19.4.3. Оптическое преобразование на основе коферментов	720
19.4.4. Перспективный обзор.....	721
19.5. Оптические аффинные сенсоры.....	722
19.5.1. Оптические иммуносенсоры	722
19.5.2. Оптические сенсоры на основе биологических рецепторов	723
19.5.3. Перспективный обзор.....	725
19.6. Оптические ДНК-сенсоры и матрицы.....	726
19.6.1. Флуоресцентное преобразование в нуклеиново-кислотных сенсорах	726

19.6.2. Волоконно-оптические нуклеиново-кислотные сенсоры	728
19.6.3. Волоконно-оптические нуклеиново-кислотные матрицы	731
19.6.4. Оптические ДНК-микроматрицы	732
19.6.5. Перспективный обзор	733
Литература	734

Глава 20

Применение наноматериалов в оптическом преобразовании 738

20.1. Полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки)	738
20.1.1. Квантовые точки: структура и свойства	738
20.1.2. Применение квантовых точек в химической сенсорике	741
20.1.3. Перспективный обзор	749
20.2. Углеродные нанотрубки в качестве оптических меток	751
20.2.1. Поглощение и испускание света углеродными нанотрубками	751
20.2.2. Рамановское рассеяние в УНТ	753
20.2.3. Оптические сенсоры и матрицы на УНТ	754
20.2.4. Перспективный обзор	756
20.3. Металлические наночастицы в оптической сенсорике	756
20.3.1. Оптические свойства металлических наночастиц	756
20.3.2. Оптическое обнаружение на основе металлических наночастиц	758
20.3.3. Металлические наночастицы в оптической сенсорике	761
20.4. Пористый кремний	763
20.5. Люминесцентные наноматериалы лантаноидных соединений	764
20.6. Обобщение	764
Литература	765

Глава 21

Акустиковолновые сенсоры 769

21.1. Пьезоэлектрический эффект	770
21.2. Толщинно-сдвиговые моды пьезоэлектрических резонаторов	771
21.2.1. Кварцевые микровесы	771
21.2.2. Невозмущенный резонатор	773
21.2.3. ККМ, нагруженные жестким верхним слоем. Уравнение Зауэрбрея	775
21.2.4. ККМ в контакте с жидкостями	777
21.2.5. ККМ в контакте с ньютоновской жидкостью	778
21.2.6. ККМ в контакте с вязкоупругой жидкостью	779
21.2.7. Моделирование нагруженного ТСМ-резонатора	780
21.2.8. Кварцевые кристаллические микровесы с контролируемым рассеиванием (ККМ-Р)	788
21.2.9. Эксплуатация ККМ-сенсоров	789
21.2.10. Калибровка ККМ	790
21.2.11. Перспективный обзор	791
21.3. Газовые и паровые сенсоры на основе ККМ	793
21.4. Аффинные сенсоры на основе ККМ	794
21.4.1. Иммуносенсоры на основе ККМ	794
21.4.2. Усиление в ККМ-иммуносенсорах	795

21.4.3. Обнаружение малых молекул с использованием естественных рецепторов	797
21.4.4. ККМ-сенсоры на основе молекулярных печатных полимеров.....	798
21.4.5. ККМ-сенсоры на основе малых синтетических рецепторов	800
21.4.6. Перспективный обзор.....	802
21.5. ККМ-сенсоры нуклеиновых кислот	802
21.5.1. Сенсоры гибридизации.....	802
21.5.2. Пьезоэлектрические аптасенсоры.....	804
21.5.3. Перспективный обзор.....	805
21.6. Сенсоры на поверхностных акустических волнах	806
21.6.1. Принципы	806
21.6.2. Поверхностная акустическая волна	806
21.6.3. Пластинчато-модовые ПАВ-приборы.....	808
21.6.4. Газовые и паровые ПАВ-сенсоры.....	809
21.6.5. Жидкофазная ПАВ-сенсорика	812
21.6.6. Перспективный обзор.....	815
21.7. Основная информация	816
Литература	817

Глава 22

Микрокантилеверные сенсоры	822
22.1. Принципы микрокантилеверного преобразования.....	822
22.1.1. Микрокантилевер	822
22.1.2. Статическое деформационное преобразование	824
22.1.3. Резонансно-модовое преобразование.....	826
22.2. Измерение отклонений кантилевера	828
22.2.1. Оптические измерения отклонения кантилевера	828
22.2.2. Электрическое измерение кантилеверного отклонения	829
22.3. Функционализация микрокантилеверов	830
22.4. Микрокантилеверные газовые и паровые сенсоры	831
22.5. Микрокантилеверные аффинные сенсоры	832
22.5.1. Общие положения	832
22.5.2. Микрокантилеверные протеиновые сенсоры	833
22.5.3. Микрокантилеверные патогенные сенсоры	833
22.5.4. Микрокантилеверные аффинные сенсоры на основе других рецепторов распознавания.....	834
22.6. Ферментный анализ микрокантилеверными сенсорами	835
22.7. Микрокантилеверные сенсоры нуклеиновых кислот.....	835
22.8. Перспективный обзор.....	836
Литература	837

Глава 23

Химические сенсоры на основе микроорганизмов, живых клеток и тканей.....	840
23.1. Биосенсоры на основе живых материалов: общие принципы.....	840
23.2. Принципы обнаружения в сенсорах на основе живых материалов	841

23.2.1. Биокаталитические сенсоры	841
23.2.2. Биосенсоры на основе внешних раздражителей	842
23.3. Иммобилизация живых клеток и микроорганизмов	843
23.4. Электрохимические микробные биосенсоры	844
23.4.1. Амперометрические микробные биосенсоры	845
23.4.2. Потенциометрические микробные биосенсоры	848
23.4.3. Кондуктометрические микробные сенсоры	849
23.4.4. Электрическое импедансное преобразование	850
23.5. Оптические цельноклеточные сенсоры	851
23.5.1. Оптические респираторные биосенсоры	851
23.5.2. Оптические сенсоры на основе внешних раздражителей	852
23.5.3. Биорепортеры	853
23.6. Улучшение избирательности биосенсоров микроорганизмов	854
23.7. Заключение	855
Литература	856
Список символов	859
Предметный указатель	871

Введение научного редактора перевода

Интенсивное развитие научных областей биотехнологии, микроэлектроники и информатики естественным образом привело к их взаимодействию в направлении создания биоэлектронных устройств, позволяющих расширить возможности человека как в познании свойств окружающей среды, элементом которой следует считать собственно человека, так и в получении средств управления обобщенной средой.

В части технических средств в последнее время ускоренно развивается новое направление, называемое микросистемотехникой, которое ориентировано на использование достижений микроэлектроники и пограничных явлений различных сред, представляемых оптоэлектроникой, акустоэлектроникой, магнитоэлектроникой, криоэлектроникой, хемотроникой и биоэлектроникой. Парадигма микросистемотехники состоит в обнаружении и измерении заданного свойства физической, химической или биологической среды, преобразовании полученной характеристики в электронное представление, обработке его средствами вычислительной техники с целью направленного управления средой. Очевидно, что процедура метода микросистемотехники начинается с сенсорики состояния среды. В настоящее время достаточно полно освоена не только разработка физических сенсоров, но и созданы системы управления физическими средами, поскольку такая задача наиболее актуальна в промышленном, транспортном и экологическом применении. Наиболее перспективными по технологическим, конструктивным, электрическим и климатическим требованиям представляются сенсоры на основе акустоэлектронного эффекта — поверхностных акустических волн (ПАВ), с использованием которого созданы и промышленно выпускаются ПАВ-сенсоры таких характеристик физических сред как давление (жидкостей и газов), температура, деформация, механическое напряжение, сила, перемещение, скорость, ускорение. Использование ПАВ-сенсоров параметров физических сред позволило разработать системы управления стабилизацией летательных аппаратов (ПАВ-гироскопы), подачи водяного потока на гидротурбины большой мощности, управления работой высоковольтных энергетических установок, обеспечения конструкционной безопасности промышленных и гражданских строительных сооружений и др.

Что же касается химических и биологических сред, то в этом направлении научный прогресс, преимущественно, ориентирован на исследовательские и аналитические цели. Соответственно химическая и биологическая сенсорика, обогатившаяся достаточным объемом методов и средств получения информации о состоянии сред, объективно потребовала обобщения и осмысления накопленного опыта с целью выделения наиболее перспективных направлений для промышленного освоения как собственно сенсоров, так и систем на их основе, среди которых первоочередными представляются устройства искусственного носа и языка, естественно, в электронном исполнении. И если последние устройства выполняют функцию селективного обнаружения заданных веществ и их композиций в выборке, то на основе химических сенсоров, создающих выходной сигнал, пропорциональный концентрации целевого вещества, возможна реализация систем управления средой. В дополнение актуальной стала еще одна задача: для борьбы с террористическими проявлениями необходимо создание технических средств, которые позволят с высокой достоверностью обнаруживать опасные химические, биологические, взрывчатые и наркотические вещества в сверхмалых концентрациях, а системы на их основе создадут возможность локализации и обезвреживания носителей или источников опасных веществ.

Вышеназванные побудительные мотивы определили актуальность появления представляемой российскому научно-техническому сообществу книги проф. Ф-Г Баника «Химические и биологические сенсоры».

В книге достаточно полно представлена теория функционирования химических и биологических сенсоров различных типов: ферментативных, иммунных, термохимических, потенциометрических, полупроводниковых (химических), хемирезистивных, амперометрических, электрохимических (аффинных и нуклеино-кислотных), импедометрических, оптических (включая Рамановскую спектроскопию) и акустических. Особое внимание уделено практическому аспекту проектирования и производства химических и биологических сенсоров — применению элементов микроэлектронной технологии, методов золь-гель химии, нековалентной иммобилизации и ковалентного сопряжения, инкапсуляции, а также самых передовых материалов: естественных и синтетических полимеров, металлических наноматериалов, углеродных и кремниевых нанотрубок, полимерных и неорганических волокон, магнитных микро- и наночастиц, халькогенидных стекол, пористого кремния и люминесцентных наноматериалов лантаноидных соединений. Рассмотренные технологии производства и используемые материалы подвергаются сравнительному анализу, ориентированному на достижение конкурентных рыночных преимуществ.

Для оценки качества сенсора в целом предлагаются такие характеристики, как надежность измерений, селективность, чувствительность (предел обнаружения), способность определения количества целевого вещества, интерференционная устойчивость к воздействию сопутствующих веществ (специфика или помехоустойчивость), динамический диапазон, разрешающая способность и время формирования ответного сигнала.

Достаточно большой объем книги посвящен методам преобразования химических и биологических сред в электронный сигнал, то есть одному из начальных и существенному этапу в последовательности реализации функции сенсора. Среди методов электрохимического преобразования рассматриваются: хроноамперометрия при постоянном токе полярография, вольтамперометрии с линейным сканированием, циклическая, импульсная, и прямоугольно-волновая разновидности вольтамперометрии при постоянном токе, вольтамперометрия при переменном токе. Для сенсоров на основе электрического импеданса рассмотрены методы: электрохимической импедансной спектроскопии, электрохимического импедансного преобразования в аффинных сенсорах, кондуктометрического преобразования в том числе хеморезистивными материалами. В оптических сенсорах анализируются спектроскопические методы преобразования на основе эффектов поглощения света, диффузной отражательной спектроскопии, люминесценции, флуоресцентной спектроскопии, резонансного переноса энергии и Рамановской спектроскопии. Показано, что для целей хемооптического преобразования могут быть использованы некоторые физические приборы: резонансное зеркало, резонансная волноводная решетка, оптические микрорезонаторы и фотонные кристаллы.

В акустоэлектронных сенсорах результат хемотронного преобразования, как правило, отображается в изменении частоты поверхностной акустической волны, тогда как в случае вольтамперометрических, импедансных, кондуктометрических методов электрохимического преобразования результат измерения состояния среды выражается в микро- и наноамперах или милливольтках, поэтому электронная обработка сигналов столь малых значений требует более сложного оборудования, чем определение частоты акустической волны, и в этом отношении ориентация на акустоэлектронные методы преобразования представляется весьма перспективной.

И, наконец, в микрокантилеверных сенсорах процедура преобразования завершается измерением либо изменения частоты резонансных колебаний микрокантилевера, либо отклонения кантилевера за счет нагрузки массой, причем последнее измерение производится оптическими методами, свободными от влияния электромагнитных помех.

Следует заметить, что последние два типа сенсоров в основе используют технологии, достаточно хорошо освоенные микросистемотехникой для получения информации о состоянии физических сред. Поэтому такое обстоятельство позволяет полагать, что это взаимодействие создает перспективу расширения применения методов микросистемотехники на управление химическими и биологическими средами. Сложившаяся тенденция определила актуальность публикации книги на русском языке.

Первоначально предполагалось издать русскоязычный вариант книги в 2013 году, однако, проф. Ф.-Г. Баника, получив информацию о планах издателя РИЦ «ТЕХНОСФЕРА» сделал предложение опубликовать в России сразу 2-е, исправленное и дополненное издание книги, которое в настоящее время подготавливается издательством John Wiley & Sons, Ltd на английском языке для выпуска в 2016 году. По согласованию с обладателем прав на издание книги настоящий текст представляет собой 2-е издание, которое будет полезным для разработчиков микросистемотехнических устройств, а также преподавателям, аспирантам и студентам, специализирующимся в областях сенсорики, в том числе интеллектуальных сенсорных систем.

Научный редактор перевода приносит благодарность переводчику книги к.т.н., доц. И.М. Лазеру за плодотворную дискуссию относительно возможностей и перспектив взаимодействия технологий микросистемотехники и химикобиологической сенсорики с целью создания систем управления химическими и биологическими средами. Также следует выразить признательность директору книгоиздательских программ РИЦ «ТЕХНОСФЕРА» С.А. Орлову за конструктивность проведения переговоров с издательством John Wiley & Sons, Ltd, результатом которых было получение прав на перевод и выпуск книги сразу во 2-м издании.

Научный редактор перевода
д.т.н., проф. В.А. Шубарев

Введение к русскому изданию

Было приятным сюрпризом узнать в начале 2013 года, что русская версия этой книги будет опубликована издательством «Техносфера» в Москве. Без сомнения, для любого автора прямой доступ русскоговорящей аудитории ученых к его работе является удовлетворением и вознаграждением за его усилия.

Развитие химических сенсоров было вызвано ростом спроса на недорогие устройства, которые могли бы обеспечить аналитическую информацию в режиме реального масштаба времени для различных применений, таких как контроль промышленных процессов, тестирование загрязнения окружающей среды на месте выполнения анализа, а также проведение децентрализованных клинических анализов. В соответствии с международной тенденцией, различные научно-исследовательские группы в России вовлекаются в работу в области химической сенсорики. Следовательно, в этом контексте может представлять интерес краткое освещение основных элементов вклада российских ученых в развитие и прогресс науки и технологии химической сенсорики.

Первым видом химических сенсоров, которые возбудили широкий интерес в применении для рутинного химического анализа, были потенциометрические ионные сенсоры. Эта тенденция находит свое отражение и в работе различных исследовательских групп на территории бывшего СССР и нынешней Российской Федерации. Начнем с вклада, связанного с кафедрой радиохимии Санкт-Петербургского государственного университета. Широко известен и оценен результат проф. Ю.Г. Власова в области прогресса ионных сенсоров на основе халькогенидного стекла, начиная от одиночного сенсора и далее к сенсорным матрицам для создания искусственного языка. Проф. К.Н. Михельсон и его коллеги (СПбГУ) активно работают в области создания ионно-селективных электродов с непосредственным контактом, разработки новых полимерных материалов для ионно-селективных мембран и математического моделирования процесса распознавания ионов ионофором на основе ионно-чувствительных мембран. В Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, химический факультет, доц. Н.В. Шведене и ее группа решили несколько аспектов в области ионно-селективных электродов, таких как развитие потенциометрических сенсоров для органических ионов и применение ионных жидкостей и фталоцианинов в качестве компонентов ионно-селективных мембран.

Исследования в области биосенсоров в России были начаты (насколько мне известно) в Институте физической химии и электрохимии (Российская академия наук, Москва) в работах д.х.н. В.А. Богдановской и проф. М.Р. Тарасевича по электрохимии окислительно-восстановительных ферментов и развития ферментных электрохимических сенсоров.

Одновременно следует упомянуть группу кафедры химии Казанского государственного университета в лице проф. Г.А. Евтюгина и проф. Г.К. Будникова, которые сделали свой вклад в области химических сенсоров для органических загрязнителей на основе ингибирования ферментов. Совсем недавно, эта группа приблизилась к применению наноматериалов, биомиметических материалов и микроорганизмов в химической сенсорике.

Особого упоминания заслуживает работа проф. А.Н. Решетилова и его группы из Института биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина (РАН). Этот коллектив специализируется на использовании микроорганизмов и целых клеток как чувствительных элементов в химических сенсорах.

К использованию химических сенсоров в качестве исследовательских инструментов в биомедицинских исследованиях с особым упором на биохимию протеинов подошла группа в НИИ биомедицинской химии им В.Н. Ореховича (РАМН) в том числе академик А.И. Арчаков, д.б.н. Ю.Д. Иванов, к.б.н. О.В. Гнеденко и др.

В Институте биохимии им А.Н. Баха (РАН), д.х.н. С.В. Шлеев и проф. А.И. Ярополов в сотрудничестве с исследовательскими группами из других стран сделали существенный вклад в продвижение химических сенсоров на основе медьсодержащих ферментов и конструкции электрохимических сенсоров на основе прямого переноса электрона между ферментом окислительно-восстановительного центра и электродом.

Область газовых сенсоров хорошо представлена группой д.х.н. М.Н. Румянцевой кафедры неорганической химии МГУ им. М.В. Ломоносова. Основная сфера интересов этой группы ориентирована на резистивные газовые сенсоры на основе полупроводниковых оксидов металлов. В последнее время работы этой группы сосредоточены на наноструктурированных материалах для газовой сенсорики.

Часто говорят, что современный мир превращается в большую деревню. Среди многих других коннотаций, это заявление указывает также на мобильность человеческих ресурсов, причем ученые являются одной из самых мобильных категорий. Российскому читателю должно быть интересно узнать о некоторых ученых, воспитанных в Российской Федерации или на территории бывшего СССР, которые дальнейшее успешное развитие исследований в области химической сенсорики продолжили за рубежом. Это далеко не исчерпывающий перечень, но следует упомянуть следующие персоналии: проф. Е. Кац (Clarkson University, USA, интересы- биоэлектроника, биовычисления и наноматериалы как основа биосенсоров); В.М. Мирский (Бранденбургский технический университет, Германия, интересы - проводящие полимеры, сенсорные микроматрицы, молекулярными печатные полимеры; поверхностно-плазмонные резонансные сенсоры); Г. Коротченков (Кванджу, институт науки и технологии, Южная Коре, интересы — газовые сенсоры на основе металло-оксидных полупроводников); Р.А. Потырайло, (GE Global Research, Niskayuna, USA, интересы - оптические сенсоры, микроаналитические приборы, и комбинаторное материаловедение); С.М. Борисов (Грац, технологический университет, Австрия, интересы — сенсоры на основе оптической флуоресценции) Заслуживающим упоминания является вклад А.К. Гейма и К.С. Новоселова (Манчестерский университет, Великобритания), которые удостоены Нобелевской премии по физике в 2010 году «за новаторские эксперименты, касающиеся двумерного материала графена». Среди других выдающихся результатов, группа во главе с этими учеными продемонстрировала замечательные свойства графена в качестве газового чувствительного материала.

По понятным причинам, указанный обзор является далеко не исчерпывающим. Читателя, интересующегося более широкой перспективой упоминания серии недавних публикаций, посвященных достижению российских исследовательских групп в области химических сенсоров, следует адресовать к следующим работам: по ионо-селективным электродам [1], биосенсорам в общем аспекте [2], применениям биосенсоров в мониторинге окружающей среды и биотехнологии [3], а также применению наноматериалов в разработке химических сенсоров [4].

Флоринель-Габриель Баника

Литература

1. Mikhelson, K.N. (2012) Development of ion-selective electrodes in Russia in 1991-2010, *J. Anal. Chem.* **67**, 1-5.
2. Evtuguin, G.A. (2011) Biosensors in Russia: Twenty Years of Research, *J. Anal. Chem.* **66**, 1029-1034.
3. Reshetilov, A.N. (2005) Microbial, enzymatic, and immune biosensors for ecological monitoring and control of biotechnological processes, *Appl. Biochem. Microbiol.* **41**, 442-449.
4. Reshetilov, A.N., and Bezborodov, A.M. (2008) Nanobiotechnology and biosensor research, *Appl. Biochem. Microbiol.* **44**, 1-5.

Благодарности

Во-первых, я хотел бы поблагодарить профессора Арнольда Фогга, который любезно согласился лингвистически отредактировать начальный текст. Ответственность за окончательный вариант, тем не менее, лежит на авторе и редакторах публикации. Кроме того, я хотел бы принести благодарность коллегам из Норвежского университета науки и технологии Тронхейма, Норвегия, за великодушную помощь, выразившуюся в прочтении некоторых глав книги и формулировании ценных комментариев и предложений. Этими коллегами являются: профессор Торбьерн Ленес, профессор Дэвид Г. Николсон и профессор Кэйлб Рази Нэкви. Я также благодарю доктора Александру Опреа (университет Тюбинген, Германия) и доктора Мэриан Флореску (университет Суррея, Великобритания) за аналогичную помощь.

Наконец, я особо благодарен всем тем ученым, которые способствовали прогрессу науки о химических сенсорах и соответствующей технологии, что и позволило написать эту книгу. Многие из этих ученых процитированы в книге, но вследствие объемных ограничений некоторая часть результатов в этой области не могла быть включена в текст или процитирована.

Введение

Маршал МакЛюэн предположил, что СМИ в самом общем значении этого понятия действуют как расширения функций человеческого сообщества [1]. Таким же образом, как микрофон может рассматриваться в качестве расширения функций уха, химические сенсоры представляются расширением органов химического восприятия, реализуемого носом и языком.

Разработка химических сенсоров является реакцией на растущие требования к химической информации, которой характеризуются различные сферы познания. Одним из таких направлений может быть человеческое тело, психологическое состояние которого однозначно оценивается физическими, химическими и биохимическими параметрами. Качество атмосферы и окружающей среды характеризуются содержанием вредных химических ингредиентов. Не менее важно автоматически управлять различными промышленными процессами, которые зависят от определенных химических параметров.

В общем случае стандартные аналитические методы (например хроматография, спектрометрия и электрофорез) могут обеспечить тот же самый вид информации, как и химические сенсоры. Преимущество достижения результата на основе химического сенсора состоит в том, что они специализированы, имеют небольшой размер, портативны и недороги, а также представляют собой приборы, которые подходят для анализа в полевых условиях и контроля химических параметров в реальном масштабе времени. Достойна упоминания также способность специальных химических сенсоров идентифицировать патогенные микроорганизмы и вирусы через характерные составы, которые являются частями структуры целевых веществ.

«Там, внизу, полно места», — сказал Ричард Фейнман в оригинальной лекции в 1959 году, в которой предвосхищалось появление нанотехнологии. Это предложение можно перефразировать следующим образом: «Есть много новых возможностей

в основании», что хорошо применимо к разработке химических сенсоров. Действительно, самая важная тенденция в этой области состоит в применении наноматериалов, равно как в замене классических материалов и реактивов или во внедрении абсолютно новых методов сенсорики и преобразования. Особо важной является совместимость размеров наноматериалов с молекулами биополимера, что позволяет производить бионаноккомпозиты с многообещающим потенциалом для применения в проектировании химических сенсоров. Новые технологии производства, основанные главным образом на микроэлектронике и нанотехнологии, как ожидается, приведут к увеличению степени интеграции в химических сенсорных матрицах, что позволит усовершенствовать производство и применение искусственных устройств носа/языка. Интеграция химических сенсоров с микрожидкостными системами — другая многообещающая тенденция, поскольку такие структуры позволяют использовать чрезвычайно маленькие объемы выборки для автоматической обработки и анализа.

Регулярно издаются новые книги по химическим сенсорам, но большинство из них представляют собой сборные тома, специализирующиеся на некоторых особых видах химических сенсоров и их специальных применениях. Всесторонний обзор химических сенсоров в одной-единственной книге необходим по двум причинам. Во-первых, такая книга служила бы полезным учебным пособием для использования в курсах, раскрывающих предмет химических сенсоров. Во-вторых, всестороннее введение в эту область для ученых и инженеров, плохо знакомых с таким предметом, было бы определенным достижением. В настоящее время существует серия изданий, которые предназначены для достижения вышеупомянутых целей. Однако в связи с интенсивным прогрессом в области сенсорики появление новой книги, в которой раскрываются последние достижения, всегда приветствуется.

Разработка химического сенсора очень часто связана с синтезом и обработкой материалов. Синтетические материалы (как неорганические, так и органические), материалы биологического происхождения (белки, нуклеиновые кислоты, микроорганизмы и живые клетки), так же как и биомиметические синтетические материалы, широко используются в разработке химических сенсоров и в равной степени важности в технологии производства, потому что заключительная цель в исследовании химических сенсоров — это производство рыночного продукта. Именно поэтому первые восемь глав в этом тексте посвящены главным видам материалов, используемым в разработках химических сенсоров, так же как и типовым технологическим процессам, созданным для производства химических сенсоров.

Следующие четырнадцать глав представляют различные классы химических сенсоров, сгруппированных согласно методам преобразования. Последняя глава посвящена химическим сенсорам, основанным на высокоорганизованном биологическом материале, таком как микроорганизмы и живые клетки.

Эта книга была создана главным образом в качестве руководства в области химических сенсоров с особым акцентом на балансе классических основ с современными тенденциями. Очевидно, что, следуя содержанию этой области, книга не позволяет составить обычный курс лекций. Однако преподаватель может выбрать темы, которые соответствуют уровню аудитории и интересу обучающихся студентов. Кроме того, учебный план может быть персонифицированным, побуждая каждого студента более глубоко исследовать определенные темы. В дополнение можно сравнить изучение химических сенсоров с просветительской экскурсией по различным научным и технологическим областям, которая способствует существенному развитию научных знаний студента.

Эта книга будет полезна для любого ученого, который нуждается во введении в научную область химических сенсоров и их технологий. Поскольку химическая сенсорика представляет собой междисциплинарную область, эта книга будет интересна инженерам, химикам, биохимикам, микробиологам и физикам, проводящим исследовательскую работу в области химических сенсоров.

Ничто сделанное человечеством не может быть совершенным, но, по крайней мере, оно должно быть совершенствуемо. Следовательно, любой критический комментарий или предложение приветствуется.

1. McLuhan, M. (2003). Understanding Media: The Extensions of Man, Gingko Press, Corte Madera, Calif.

ГЛАВА I

ЧТО ТАКОЕ ХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ?

1.1. Химические сенсоры: определение и компоненты

Определение электрохимических биосенсоров, данное в [1], может быть легко адаптировано, чтобы получить общее определение химического сенсора следующим образом. Химический сенсор является автономным устройством, которое создает информацию с определенной селективностью относительно конкретных химических веществ (*аналитов*), присутствующих в выборках, производя измеримый выходной сигнал, который коррелируется с концентрацией аналита¹. Помимо химических веществ могут быть обнаружены микроорганизмы и вирусы посредством определенных биосоставов, таких как нуклеиновая кислота или мембранные компоненты. В противоположность этому *физический сенсор* представляет собой устройство, которое создает величину конкретных физических параметров, таких как сила, давление, температура, скорость и многих других.

Первый (и также самый известный) химический сенсор — это стеклянный электрод для определения pH-фактора, который указывает на активность водородного иона в растворе.

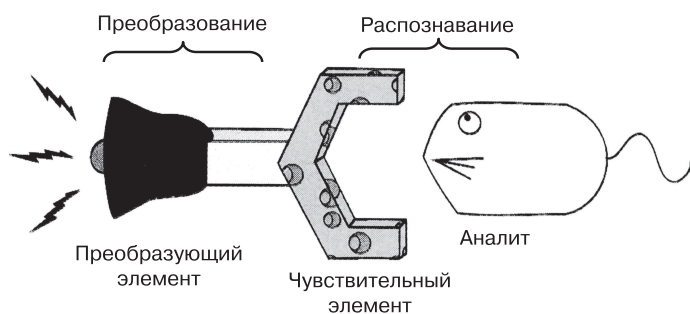


Рис. 1.1. Структура химического сенсора. Сенсор — композиция рецептора и сигнального (преобразование) элемента. Публикуется с разрешения [3]. Copyright 1995, The Royal Society of Chemistry

При функционировании химический сенсор выполняет две функции — *распознавание* и *преобразование*, которые качественно иллюстрируются на рис. 1.1. Во-первых, аналит взаимодействует более или менее селективным способом с *распознающим (или сенсорным) элементом*, который проявляет общность с аналитом.

¹В отечественной литературе термином «аналит» принято обозначать выборку продукта, подвергаемого анализу для нахождения целевого вещества. В настоящем тексте термин «аналит» соответствует понятию *целевого вещества*, тем не менее в дальнейшем сохраняется авторская версия. — Прим. научного редактора перевода.

Сенсорный элемент может быть составлен из однозначных молекулярных структур, называемых *рецепторами распознавания*. Альтернативно элемент распознавания может быть материалом, который включает в состав его композиции бесспорные *распознающие части*. Более того, элемент распознавания может быть сформирован из материала, не имеющего распознающей части, но способного к взаимодействию с аналитом.

В химическом сенсоре распознающая и преобразующая функции объединены в том же самом устройстве. Аналитическая структура, не содержащая функции распознавания, не является химическим сенсором, но представляет собой типичный преобразователь.

Биосенсоры — это химические сенсоры, в которых система распознавания основана на биохимических или биологических механизмах. Следует напомнить о том факте, что синтетические, биомиметические материалы, которые выступают аналогами материалов биологического происхождения, были созданы и использованы в элементах распознавания.

В результате взаимодействия аналита с чувствительным элементом определенные физические или химические свойства чувствительного элемента изменяются как функция концентрации аналита. Чтобы позволить пользователю оценить это изменение, химический сенсор преобразовывает вышеупомянутое изменение в измеряемое физическое количество. Этот процесс называют преобразованием сигнала (или просто *преобразованием*) или *сигнализацией*. Устройство, которое переводит информацию из одной системы (например химической) в другую (например физическую), называют *преобразователем* [2].

Чувствительный элемент и преобразователь могут быть различными компонентами, размещенными вместе, в прямом пространственном контакте, в одной и той же конструктивной единице. В некоторых типах химических сенсоров возможно отсутствие физических различий между чувствительным элементом и преобразователем. Несмотря на это, различия между распознаванием и преобразованием как отдельными функциями в действительности существуют, как и соответствующие им физические или химические процессы.

Понятие *молекулярного сенсора* часто появляется в литературе. Молекулярный сенсор — это молекула, содержащая две отличные части. Одна из них в состоянии связать аналит (например ион) селективным образом, в то время как вторая часть изменяет некоторые физико-химические свойства (например поглощение света или эмиссию) в ответ на закрепление аналита [3]. Поэтому распознавание и передача сигналов выполняются той же самой молекулой и такие соединения также относятся к хемосенсорам.

По аналогии с молекулярными сенсорами было принято понятие *наносенсора*, описывающее субмикроскопическую гибридную композицию, включающую наночастицы и молекулярные элементы, реализующие как распознавание, так и функцию передачи сигналов.

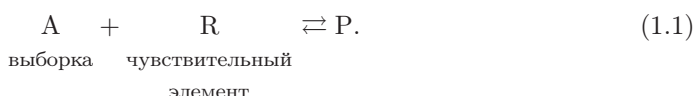
Молекулярные сенсоры и наносенсоры в смысле вышеупомянутого определения не являются химическими сенсорами, потому что отсутствует преобразователь. Скорее такие разновидности можно рассматривать как продвинутые аналитические реактивы. Несмотря на это, молекулярные сенсоры и наносенсоры могут в принципе использоваться, чтобы реализовать полный сенсор в интеграции с преобразовательным устройством.

1.2. Методы распознавания

1.2.1. Общие аспекты

Несмотря на то, что в химических сенсорах используется широкое разнообразие методов распознавания, обобщенное описание этого процесса едва ли достижимо. Детали различных методов распознавания даны в соответствующих главах. Здесь представлено только итоговое приближение к этой теме.

Ряд процессов распознавания происходит согласно следующей реактивной схеме, в которой А — аналит, R — рецептор распознавания (включенный в чувствительный элемент) и Р — продукт взаимодействия системы аналит–рецептор:



Двойная стрелка обозначает, что процесс распознавания является обратимым при равновесной реакции. Реверсивность процесса распознавания является результатом того, что продукт Р вовлекает нековалентные химические связи, такие как ионные, водородные и связи взаимодействия Ван-дер-Ваальса. Процесс распознавания может быть охарактеризован его константой равновесия K_A , которая определяется как

$$K_A = \frac{c_P}{c_A c_R}, \quad (1.2)$$

где символы c представляют концентрации веществ, обозначенных индексами. Эта константа равновесия указывает на аффинность¹ рецептора распознавания и аналита. Большая аффинность приводит к высокому значению константы равновесия. Если реакция сенсора будет зависеть от концентрации продукта, то сигнал будет зависеть от концентрации аналита в образце (выборке).

Существенной характеристикой процесса распознавания является его *селективность*, которая состоит в способности сенсора обладать избирательностью к аналиту, а не к другому веществу В, также присутствующему в выборке и действующему как помеха (интерферент)². Взаимодействие рецептор–интерферент может быть представлено следующим образом:



Аффинность рецептора с веществом В обозначена следующей константой равновесия:

$$K_B = \frac{c_Q}{c_B c_R}. \quad (1.4)$$

Селективность сенсора аналита определена в общем виде отношением вышеупомянутых констант равновесия, и хорошая селективность получается, если $K_A/K_B \gg 1$. Более характерные определения селективности даны в главах, посвященных особым классам химических сенсоров.

Важно отметить, что некоторые методы распознавания не позволяют получить хороший результат, как показано в схеме (1.1). В таких случаях взаимодействие аналита с чувствительным элементом имеет физическую природу, такую как газовая сорбция на твердом теле без химической реакции. Тогда управление процессом

¹Сходство, общность. — Прим. научного редактора перевода.

²В соответствии с авторской терминологией вещество–помеха обозначается термином «интерферент». — Прим. научного редактора перевода.

распознавания может быть выполнено измерением физических свойств чувствительного элемента, которые зависят от концентрации аналита в выборке.

Следующие разделы представляют в краткой форме некоторые общие методы распознавания, используемые в химических сенсорах.

1.2.2. Ионное распознавание

Первым типом химических сенсоров, которые были разработаны и производились в крупносерийном масштабе, были ионные сенсоры. Среди них стеклянный электрод рН-фактора стал первым широко используемым ионным сенсором. Основанием для этого явилась новаторская работа Ф. Хабера и З. Клеменсевича (1908), а результат стал коммерчески доступным к 1936 г. наряду с рН-метром Бекмана. В дальнейшем были созданы сенсоры для других ионов (катионов или анионов).

Электрический заряд, который является отличительным свойством ионов, подходит для ионного распознавания. Поэтому ионное распознавание может быть выполнено различными материалами и реактивами, у которых имеется электрический заряд, противоположный заряду иона аналита.

Селективность электростатического ионного распознавания является результатом дополнительных свойств чувствительных материалов, таких как размер элемента ионного рецептора, или некоторой особенности взаимодействия аналит–рецептор, такой как частичный ковалентный характер связи системы аналит–рецептор.

Первоначально ионные сенсоры были созданы на твердотельных материалах, таких как стекло или кристаллические структуры, включая элементы селективного распознавания. В 1967–1968 годах появились молекулярные ионные рецепторы, в качестве которых могут выступать ионы гидрофобной органики, встроенные в гидрофобную полимерную мембрану. Как и ожидалось, этот подход приводит к умеренному результату в отношении селективности. Превосходная селективность была получена при помощи нейтральных ионных рецепторов, которые взаимодействуют с ионами аналита через множество поляризованных атомов, включенных в их структуру.

Преобразование в ионных сенсорах может быть выполнено главным образом посредством воздействия заряда иона на свойства ионно-распознающего элемента. Соответственно преобразование в ионных сенсорах выполняется потенциометрическими или оптическими методами.

1.2.3. Распознавание аффинным взаимодействием

Распознавание через аффинность вовлекает обратимые многократные связи двух химических веществ через нековалентные связи, такие как ионные, водородные и связи взаимодействия Ван-дер-Ваальса. Результат аффинного взаимодействия выражается в молекулярном ассоциативном комплексе. Для того чтобы такой комплекс сформировался, вовлеченные вещества должны быть комплементарны для создания химической реактивности. Например, если одно вещество содержит положительно поляризованный водородный атом, то во втором должен быть электронно-донорный атом, размещенный таким образом, чтобы он был в состоянии сформировать водородную связь в комплексе. Сила комплекса характеризуется его константой стабильности, которая подобна константе равновесия в уравнении (1.2). Вследствие разнообразия химических соединений ассоциативные комплексы этого типа могут быть очень устойчивыми.

Аффинные взаимодействия весьма характерны для биологических систем. Пример такого вида представлен белками лектинового типа, которые распознают углеводы и формируют ассоциативные комплексы в таких составах.

Общий тип аффинного взаимодействия представлен структурой антиген–антитело. *Антитела*, являющиеся гликопротеинами, производятся иммунной системой, чтобы идентифицировать и нейтрализовать патогенные микроорганизмы, такие как бактерии и вирусы. Часть болезнетворного микроорганизма, которая взаимодействует с определенным антителом, называют антигеном. Взаимодействие антиген–антитело является иммунохимической реакцией. Антитела могут быть извлечены из крови животных с привитым антигеном, но их также можно получить из клеточных культур.

В клинической лаборатории иммунохимические реакции используются в диагностических целях. С помощью определенных антител в качестве рецепторов распознавания могут быть идентифицированы болезнетворные микроорганизмы. Инверсным образом, используя рецептор антигена, может быть идентифицировано определенное антитело, что позволяет осуществить диагностику возможного заражения специфическим болезнетворным микроорганизмом. Помимо обнаружения болезнетворного микроорганизма или антитела, последние используются, чтобы распознавать различные молекулы белка. Маленькие органические молекулы как таковые не производят иммунной реакции. Однако антитело с маленькой молекулой, произведенное организмом с привитым составом, формирует эту молекулу приложенной к белку. Таким образом, антитела, специфичные для некоторых маленьких молекул, могут быть получены и использованы в аналитических целях.

Некоторые синтетические материалы подражают поведению аффинных реагентов биологического происхождения. Сначала в этом отношении должны быть упомянуты полимеры, отпечатанные на молекулярном уровне, которые представляют собой материалы, содержащие впадины с размером и формой, соответствующими молекуле аналита. Кроме того, впадина включает функциональные группы, которые могут обратимо связаться с аналитом. Другой класс синтетических аффинных рецепторов — аптамеры нуклеиновых кислот, являющиеся синтетическими молекулами нуклеиновой кислоты, созданные таким образом, чтобы сформировать сильную ассоциативность с маленькими молекулами или белками.

Все вышеупомянутые методы аффинного распознавания нашли применение в разработке химических сенсоров для широкого диапазона целевых веществ, включая патогенные микроорганизмы, белки и органические молекулы.

1.2.4. Распознавание нуклеиновых кислот

В живых организмах нуклеиновые кислоты функционируют как средство обеспечения хранения и передачи генетической информации. Вообще хранение генетической информации выполняется дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК), в то время как передача информации в пределах клетки осуществляется рибонуклеиновыми кислотами (РНК).

Нуклеиновые кислоты состоят из полимерной основы, в которую встроены нуклеиновые основания. В составах ДНК существуют четыре нуклеиновых основания, а именно аденин (А), цитозин (С), гуанин (G) и тимин (Т). В РНК тимин заменяется урацилом (U). Последовательность трех нуклеиновых оснований кодирует аминокислоту, а последовательность троек нуклеиновых оснований кодирует основную структуру белка.

Существенно, что водородные связи могут сформироваться только между двумя различными парами нуклеиновых оснований, которые представляются последовательностями G-C и A-T в ДНК (или A-U в РНК). Это позволяет двум комплементарным нуклеиновым кислотам формировать двойной спиральный ассоциативный комплекс, причем такой процесс называется репликацией и представляет собой особый вид аффинного взаимодействия, вовлекающего только водород, связывающий точно определенные пары нуклеиновых оснований.

Репликация нуклеиновой кислоты является основой процесса распознавания в сенсорах на базе нуклеиновой кислоты. Короткая нуклеиновая кислота формирует рецептор (обычно называемый захватывающим зондом), который в состоянии опознавать посредством репликации особенности последовательности нуклеиновой кислоты аналита.

Испытания нуклеиновой кислоты представляют интерес для клинического диагноза в целях обнаружения генетических аномалий, а также в идентификации патогенных микроорганизмов. В судебной медицине анализ ДНК помогает идентифицировать людей по их особым профилям ДНК.

1.2.5. Распознавание ферментами

Ферменты — это такие соединения белка, которые функционируют как катализаторы в некоторых химических реакциях, происходящих в живых системах. Состав, преобразованный каталитическим действием фермента, называют ферментным *субстратом* (основанием). Каталитические свойства фермента являются селективными в отношении некоторого особого основания или особой функциональной группы в классе составов.

Большинство химических сенсоров реализуют процессы распознавания на основе равновесности, как обозначено на схеме (1.1). Напротив, распознавание ферментами — это динамический процесс, в который включены три главных шага: во-первых, целевой состав (основание) связан с активной частью фермента для формирования комплекса фермент–основание в процессе, подобном тому, который соответствует схеме (1.1). Далее связанное основание подвергается химическому преобразованию, возможно, с участием другого реагента-соучастника. Наконец, продукты выделены и активная часть фермента возвращается к его начальному состоянию. Эта последовательность повторяется с другой молекулой основания до тех пор, пока все еще доступны основание и реагент-соучастник.

Многие ферменты сохраняют свою каталитическую активность после изоляции от биологического материала и могут быть внедрены как агенты распознавания в чувствительный элемент сенсора. Преобразование в ферментативных сенсорах может быть достигнуто посредством измерения установившейся концентрации продукта или реагента-соучастника, вовлеченного в ферментативный процесс.

Существует несколько возможных применений ферментов в химической сенсорике. Во-первых, ферментативные сенсоры могут быть разработаны в целях определения основания. Во-вторых, ферментативные сенсоры могут быть использованы для определения ингибиторов, которые являются химическими разновидностями, оказывающими влияние на деятельность фермента. В-третьих, ферменты могут использовать метки преобразования в сенсорах, основанных на аффинном распознавании. В этом случае соединение, участвующее в ферментативной реакции, служит индикатором для меченого вещества. Следовательно, ферменты играют центральную роль в структуре науки химических сенсоров.

1.2.6. Распознавание клетками и тканями биологического происхождения

Как показано выше, ферменты создают важный класс рецепторов распознавания, используемых в химических сенсорах. Хотя первоначально использовались отдельные ферменты, вскоре стало понятно, что ферменты соединяются в биологические материалы (такие как клетки или ткани) и могут функционировать лучше вследствие того, что они находятся в своей естественной окружающей среде. Это ведет к развитию нового класса химических сенсоров, в котором распознавание выполняется клетками или тканями биологического происхождения.

Применение биологических клеток и тканей является, однако, намного более широким, поскольку объекты могут реагировать на химические воздействия модификациями в их метаболических процессах, которые приводят к изменениям в потреблении кислорода или к выделению особых химических веществ. Такие модификации могут быть использованы в целях преобразования.

1.2.7. Газовая и паровая сорбция

Определение газов и паров представляет собой наиболее интересную тему для различных областей, включая контроль качества воздуха, мониторинг опасных газов и паров в промышленных, экологических и физиологических исследованиях. Общие методы распознавания газов и паров основаны на сорбции либо поверхностью (адсорбция), либо объемом твердого тела (абсорбция), используемого для распознавания. В этом направлении в зависимости от целевого состава применяются различные материалы, включая некоторые металлы, полимерные материалы и неорганические материалы. Сорбция может быть чисто физическим явлением, а может сопровождаться химическими реакциями, которые изменяют химическое состояние аналита или самого распознающего материала.

1.3. Методы преобразования

1.3.1. Общие аспекты

Следует различать две главных стратегии преобразования, а именно химическую и физическую.

Химическое преобразование выполняется при помощи наблюдения за изменением химического состава чувствительного элемента как реакцией на процесс распознавания, подобный тому, который описывается уравнением (1.1). Другими словами, контролируется изменение концентрации (или количества) продукта Р, чтобы получить выходной сигнал. Если основной продукт Р необнаружим, возможно обратиться к контролю другого сопровождающего реагента или вторичного продукта процесса распознавания.

Если ни один из элементов, вовлеченных в процесс распознавания, необнаружим, можно обратиться к маркировке продукта обнаруживаемыми элементами, называемыми *сигнальными метками* (или *метками преобразования*). Метка может быть простой молекулярной структурой или наночастицей, которые обнаруживаются доступными физико-химическими методами. Широко используемыми метками являются некоторые ферменты, позволяющие производить косвенное преобразование.

Более определенно ферментная метка катализирует химическую реакцию, в результате которой получают легко обнаруживаемые элементы.

Физические преобразователи ориентируются не на химические составы, а на определенные физические свойства сенсорного элемента, которые взаимодействуют с аналитом. Общие физические методы преобразования основаны на измерении массы, показателя преломления, диэлектрических свойств или электрического сопротивления. Такие методы осуществляют, как правило, преобразование без меток.

Краткий обзор методов преобразования, применяемых в химических сенсорах, дается ниже.

1.3.2. Термометрическое преобразование

Метод прямого преобразования основан на тепловом эффекте процесса распознавания, который приводит к изменению локальной температуры. Однако термометрическое преобразование осуществимо только в том случае, если распознавание сопровождается каталитическим процессом, как в случае ферментно-каталитических реакций. Только каталитические процессы вырабатывают достаточно тепловой энергии, чтобы возможно было получить измеримое изменение температуры. Термометрическое преобразование также применимо в химических сенсорах для горючих газов, которые реагируют с кислородом на поверхности соответствующего катализатора.

1.3.3. Преобразование, основанное на механических эффектах

Один из видов события преобразования может привести к изменению полной массы чувствительного элемента. Изменение массы может наблюдаться посредством преобразователя, выполненного на пьезоэлектрическом кристалле, известном как *кварцевые кристаллические микровесы*. Ответный сигнал этого преобразователя заключается в частоте вибрации, которая зависит от полной массы устройства.

В более общем виде распространение механических колебаний (акустические волны) может воздействовать на изменение свойств чувствительного элемента как ответ на процесс распознавания. Например, скорость акустической волны может быть изменена в результате взаимодействия аналита с чувствительным элементом.

Недавно был разработан новый класс механического преобразователя, а именно микрокантилеверы (микроконсоли). Если интегрированный с чувствительным элементом микрокантилевер подвергается изгибу, то этот процесс является функцией степени распознавания. Альтернативно вибрирующий микрокантилевер создает информацию о новом изменении массы в похожем способе с кварцевыми кристаллическими микровесами.

1.3.4. Резистивное и емкостное преобразование

Взаимодействие аналита с материалом для распознавания, отобранным должным образом, может привести к изменениям в электрических свойствах этого материала. Например, взаимодействие горючих газов с полупроводниками типа оксидов металлов вызывает изменение электрического сопротивления как функции концентрации аналита. На этом явлении основано *резистивное преобразование*.

Другое электрическое свойство, которое может быть использовано в качестве процесса распознавания, — это диэлектрическая постоянная, на основе которой из-

меряется емкость конденсатора с диэлектрической структурой из материала распознавания. Таким образом достигается емкостное преобразование.

1.3.5. Электрохимическое преобразование

Сенсоры для выборок водного раствора могут быть созданы с использованием электрохимических методов преобразования. Электрохимия имеет дело с перемещением ионов, реакцией передачи электрона, распределением ионов и взаимодействием на границе раздела с твердым проводником (электродом). Помимо растворов электролита, электрохимия также применима к процессам переноса заряда в системах, включающих ионизированные твердые тела, которые также имеют отношение к некоторым типам химических сенсоров.

Обнаружение ионов может быть достигнуто посредством сенсоров, основанных на *потенциометрическом преобразовании*. Чувствительный элемент в потенциометрическом ионном сенсоре может быть представлен мембраной, включающей либо ионно-селективные молекулярные рецепторы, либо рецепторные центры в твердом теле. Эта мембрана помещается между двумя растворами, один из них является выборкой, а другой содержит ионы аналита с постоянной концентрацией (эталонный раствор). Ионный обмен в каждой стороне мембраны приводит к развитию разности потенциалов между двумя сторонами мембраны, которая может быть измерена и увязана с концентрацией ионов аналита в выборке. Потенциометрические ионные сенсоры (обычно, но ошибочно определяемые как ионно-селективные электроды) формируют один из главных классов химических сенсоров.

Прогресс в потенциометрических ионных сенсорах был достигнут посредством интегрирования ионно-селективных мембран с полупроводниковыми приборами типа полевого транзистора. В таких сенсорах электрический потенциал, развивающийся в системе мембрана – раствор выборки, действует непосредственно на характеристики полевого транзистора.

Аналогичный принцип используется в газовых сенсорах, основанных на полевых приборах с известным исключением, состоящим в том, что газочувствительный элемент сформирован из металла с каталитическими свойствами.

У потенциометрических ионных сенсоров есть другое важное применение в качестве химических сенсоров, а именно то, что они могут действовать как преобразователи в сенсорах, основанных на ионогенирующих процессах распознавания. Эти применения относятся к сенсорам для газов, таких как углекислый газ, аммиак, водородный цианид и водородный фторид, которые способствуют образованию частных ионов после растворения в воде. Ионные сенсоры также широко используются в качестве преобразователей в ферментативных сенсорах, поскольку большинство ферментных реакций производят или поглощают некоторые ионы (например водородные или аммониевые ионы) или генерируют обнаружимый газ, такой как углекислый газ или аммиак.

Измерение электрического тока формирует другой важный класс методов преобразования в электрохимических сенсорах, общеизвестных как *амперометрические сенсоры*, начало которым представлено кислородной пробой, введенной Лелэндом К. Кларком мл. в 1956 году [4]. Это устройство указывает на концентрацию растворенного кислорода, используя электрохимическое сокращение кислорода, связанного с электролитическим током как сигналом отзыва. Открытие амперометрического кислородного датчика определило путь к разработке амперометрических

ферментативных сенсоров, также введенных впервые Лелэндом К. Кларком мл. Амперометрические ферментативные сенсоры основаны на существовании ферментов, которые катализируют кислородно-редукционные реакции и вовлекают маленькую неорганическую молекулу в качестве сопутствующего реагента. Кислород является естественным сопутствующим реагентом в такой реакции, но его можно заменить искусственным сопутствующим реагентом в более продвинутых структурах. Прямой электронный обмен между рабочим электродом электрохимического элемента и активной частью фермента типа оксидазы составляет альтернативный метод преобразования в амперометрических ферментативных сенсорах.

Амперометрическое преобразование также подходит для аффинных сенсоров при условии, что электрохимически активный состав приложен к продукту распознавания (Р в реакции (1.1)) и действует как электрохимическая метка.

Некоторые нуклеобазы, включенные в структуру нуклеиновой кислоты, электрохимически активны и их электрохимические реакции используются, чтобы управлять распознаванием.

Группа электрохимических методов преобразования основана на понятии *электрохимического импеданса*, который противодействует переменному току через электрохимический элемент. Измерения электрохимического импеданса обеспечивают большой объем информации о физико-химических процессах, происходящих в электрохимическом элементе, таких как миграция иона, распределение заряда на границе электрод/электролит и скорость электрохимической реакции. Каждый из вышеупомянутых процессов может быть связан со свойствами чувствительного элемента, объединенного с электрохимическим элементом, использованным в целях преобразования.

1.3.6. Оптическое преобразование

Взаимодействие электромагнитного излучения с веществом формирует базу широкого диапазона аналитических методов, обычно известных как спектрохимические методы анализа. Как правило, электромагнитное излучение в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазонах используется в аналитических целях. Неудивительно, что большинство химических сенсоров было создано на основе взаимодействия чувствительного элемента с электромагнитным излучением. Сенсоры, основанные на этом типе преобразования, называют оптическими.

Оптическое преобразование может использовать световое излучение или поглощение света чувствительным элементом. Такие процессы связаны с переходами между энергетическими уровнями различных частиц (молекул или наночастиц), включенных в чувствительный элемент. Легко отзывающиеся разновидности могут быть меткой преобразования, сопутствующим реагентом или продуктом процесса распознавания.

Оптическое преобразование может также быть достигнуто путем контроля физического количества носителей, легко распространяющихся через чувствительный слой, критерием чего может быть показатель преломления. Рассеяние света позволяет реализовать дополнительные методы оптического преобразования.

1.4. Структура сенсоров и их производство

Конечная цель разработки сенсоров состоит в том, чтобы получить рыночный продукт, и для достижения такой цели сенсор должен быть простым, устойчивым к различным воздействиям и удобным в применении. Переносные условия требуют портативных сенсоров, в то время как для биомедицинских направлений часто необходимы имплантируемые сенсоры, чтобы в *естественных условиях* контролировать химические элементы физиологического состояния. Миниатюризация в этом случае является существенным фактором и особо важна для сокращения количества элементов, требуемых для интеграции множества сенсоров в матрицах, чтобы увеличить информационную пропускную способность и облегчить вмешательства (см. раздел 1.7).

Миниатюризация сенсора создает дополнительное преимущество, состоящее в возможности конструирования *интеллектуальных сенсоров*, в которых собственно сенсор объединен с микроэлектронными схемами, управляющими функциональными параметрами и выполняющими обработку данных, а также обеспечивающими взаимодействие с внешним считывающим оборудованием.

Необходимая долговечность сенсора достигается, как правило, ценой использования более сложной технологии производства, применения дорогих материалов, что определяет более высокую стоимость продукта. С другой стороны, эксплуатация сенсоров с большим сроком службы требует предварительной калибровки и некоторой подстройки после каждого цикла работы, что является труднодостижимым в полевых условиях или пунктах обслуживания. Именно поэтому предпочтительно в некоторых случаях проектировать дешевые одноразовые сенсоры. Поскольку калибровка такого сенсора невыполнима, существенно необходимо, чтобы технология производства обеспечивала очень хорошую воспроизводимость характеристик чувствительности в партии.

Низкая цена и воспроизводимость в партии могут быть получены исключением использования ручной работы в производственном процессе. Передовые технологии изготовления сенсоров, первоначально созданные в области технологии микроэлектронных схем, основаны на методах микромеханической обработки, которая позволяет реализовать миниатюризацию и прямую интеграцию большого числа сенсоров в сенсорные матрицы.

Возможны различные сенсорные структуры. Так, химические сенсоры могут быть созданы как исследовательские зонды, подобно известному стеклянному электроду для определения pH-фактора.

Очень небольшие объемы выборок могут быть проверены путем ограниченного применения сенсоров с плоской поверхностью, например сформированных как тонкий слой на пластмассовой полосе. Эта конструкция подходит для использования в одноразовых сенсорах.

Поверхностное осуществление выборки обеспечивается *капиллярно заполняемыми сенсорами*. Такие сенсоры формируются из двух листов стекла, удерживаемых на расстоянии капиллярного размера. Сенсор образован тонким слоем на внутренней поверхности листа. Выборка выступает как устройство с восстанавливаемым объемом и капиллярным подъемом. Пример такого сенсора приведен в [5].

Принципы тонкослойной хроматографии были применены, чтобы создать *канально-поточные сенсоры*, которые состоят из тонкого пористого слоя, размещенного на полосе твердого тела. На полосе в определенной последовательности сфор-

мировано несколько различных зон: сначала имеется буферная зона выборки, затем одна или более зон, содержащих реактивы для химического распознавания аналита, и, наконец, чувствительная определяющая зона. Когда в буферной зоне осуществлена выборка, она капиллярно и диффузионно дрейфует через химически обусловленную зону и затем далее к зоне обнаружения, где накапливается эффект воздействия и генерируется ответный сигнал.

Последовательные многократные анализы выборок наилучшим образом выполняются интеграцией сенсора в систему поточного анализа (см. раздел 1.8).

Обобщенный сенсор или *сенсорная платформа* являются устройством, которое позволяет производить простую интеграцию рецепторов распознавания определенного класса, чтобы получить сенсоры для различных аналитов, принадлежащих тому же самому классу. Как правило, обобщенный сенсор включает преобразователь и дополнительные элементы (например молекулярные линкеры), которые способствуют интеграции чувствительных элементов легким и быстрым образом. Подход на основе сенсорной платформы удобен, когда элемент распознавания недостаточно устойчив. В этом случае чувствительный элемент интегрирован с готовой сенсорной платформой только для теста.

1.5. Калибровка сенсора

В аналитической химии калибровка предназначена для установления определенного математического соотношения между измеренным показанием и концентрацией аналита [6, 7].

Выход химического сенсора составляет некоторое измеримое физическое количество, названное *ответным сигналом*. Интенсивность сигнала (y) соответствует концентрации аналита в выборке (c) и вычисляется согласно следующему обобщенному соотношению:

$$y = F(c) + e_y. \quad (1.5)$$

Здесь $F(c)$ представляет *функцию калибровки*, а e_y — ошибку измерения ответного сигнала. Следовательно, концентрация может быть найдена обратным преобразованием функции калибровки, которая называется *аналитической функцией* или *оценочной функцией*:

$$c = F^{-1}(y). \quad (1.6)$$

Форма функции калибровки может быть получена математическим моделированием сенсора или установлена как эмпирическая интерполированная функция. Общая и очень удобная функция калибровки — это прямо пропорциональное соотношение

$$y = ac, \quad (1.7)$$

где a показывает чувствительность сенсора. Прямо пропорциональная функция характеризуется константой чувствительности. В более общем виде чувствительность определена следующим уравнением:

$$a = \frac{dy}{dc}. \quad (1.8)$$

В случае нелинейной калибровочной функции чувствительность не является константой, но зависит от концентрации аналита.

Калибровочная функция может включать постоянные параметры, которые характерны для сенсора, но независимы от свойств выборки. Если эти параметры могут быть получены на основании фундаментальных физико-химических законов и основных констант (например газовая постоянная, константа Фарадея), то имеет место *абсолютный аналитический метод*. Но такая ситуация возникает достаточно редко.

Часто ответ зависит также от специфических параметров аналита, таких как молярный коэффициент поглощения в измерениях, основанных на поглощении света. Когда известный определенный параметр аналита играет некоторую роль, возможно, наряду с другими известными эмпирическими параметрами аналитический метод становится *точным измерительным методом*.

Наиболее распространенная ситуация состоит в том, что в одном или нескольких параметрах для функции калибровки не могут быть получены приоритеты. Если математическая форма функции калибровки известна и ее параметры определены измерениями на выборках с известной концентрацией, то обычно такая ситуация соответствует термину «*справочная выборка*» или «*стандартная выборка*». Например, в случае прямо пропорциональной функции чувствительность может быть найдена на основе измерения ответного сигнала при концентрации справочной выборки. В этом случае чувствительность определяется измененным сигналом и известной концентрацией. Более точно чувствительность определяется как наклон отношения ответ/концентрация, полученный посредством усреднения измерений серии справочных выборок. Этот подход составляет *прямое справочное измерение*.

Общий случай заключается в том, что неизвестна математическая форма функции калибровки. Тогда ее форма получается в виде эмпирической интерполяционной функции, которая определяется подбором данных y -с, измеренных на справочных выборках, под некоторую функцию, такую как полином, или иную подходящую функцию. Возможная *функция интерполяции* — это линейная функция

$$y = a_0 + a_1c + e_y, \quad (1.9)$$

где a_0 и a_1 — это эмпирические параметры, которые обычно оцениваются подгонкой по наименьшим квадратам; a_1 представляет здесь чувствительность сенсора. Если линейная функция относится к концентрациям, близким к нулю, то a_0 — нулевой ответный сигнал. Аналитическое измерение, основанное на этих принципах, является *косвенным справочным измерением*.

Качество функции калибровки должно быть подтверждено выполнением измерений на справочных выборках или сравнением исследовательских результатов, полученных с помощью сенсора, с результатами, полученными альтернативным аналитическим методом. Надежная калибровка достижима посредством использования справочных выборок с определенным химическим составом настолько же близко, как и с неизвестной выборкой. Таким образом корректируется воздействие матрицы выборки на ответный сигнал.

Ошибка измеренной концентрации зависит как от ошибок измерения, так и от шага калибровки в анализируемой выборке. При использовании линейной функции калибровки ошибка калибровки минимальна в середине принятого диапазона концентрации и увеличивается с отклонением от середины. Поэтому настоятельно не рекомендуется выполнение измерения вне диапазона калибровки.

Если необходимые справочные выборки недоступны, можно обратиться к *стандартному дополнительному методу*, который основан на измерении известной выборки и выборок с концентрацией, изменяемой управляемым образом. Этот метод

применим, когда ответный сигнал прямо пропорционален концентрации аналита. Сигнал для выборки с изменяемой концентрацией представляется в виде

$$y = a(c + \Delta c), \quad (1.10)$$

где c — неизвестная концентрация и Δc — известное изменение в концентрации. Последовательное увеличение Δc дает ряд данных $y - \Delta c$, и неизвестная концентрация может быть получена как точка пересечения координатной оси и наклонной прямой линии $y - \Delta c$. Графически неизвестная концентрация может быть получена как $c = -(\Delta c)_{y=0}$, где $(\Delta c)_{y=0}$ является значением Δc , при котором продленная линия $y - \Delta c$ пересекает горизонтальную ось. Поскольку этот метод по существу реализуется экстраполяцией, то его точность хуже, чем при аналогичной операции, основанной на справочных измерениях.

В вышеупомянутом подходе предполагалось, что ответный сигнал сенсора зависит от концентрации одного-единственного вещества в растворе. Этот вид сенсора известен как *сенсор нулевого порядка*, а вычисление концентрации выполнено однофакторной калибровкой (или однокомпонентной калибровкой). Сенсоры более высоких порядков приведены в разделе 1.7.

1.6. Показатели качества сенсора

Показатели качества сенсора демонстрируют, насколько сенсор в данном исполнении соответствует ожидаемым результатам, таким как стабильность ответного сигнала и устойчивость при хранении результатов и выполнении затронутых операций.

Поскольку химический сенсор является аналитическим устройством, его технические характеристики могут быть определены параметрами, используемыми для оценки аналитического метода. Систематическое представление этих параметров дано в [8], рекомендуем заинтересованному читателю для более детального ознакомления. Большое количество технических характеристик, обусловленных статистическими параметрами, приведены в специализированных источниках (например [6]).

Важным статистическим параметром, используемым в оценке качества аналитических результатов, является *доверительный интервал*, который указывает на разброс измеренных значений. Доверительный интервал для серии повторяющихся измерений со средним числом $\bar{c}$ и стандартным отклонением значения $s_{\bar{c}}$ определяется выражением

$$\text{cnf}(\bar{c}) = \bar{c} \pm \Delta \bar{c}, \quad (1.11)$$

где $\Delta \bar{c}$ является доверительным пределом, задаваемым выражением

$$\Delta \bar{c} = s_{\bar{c}} t_{1-\alpha, \nu}. \quad (1.12)$$

Здесь $t_{1-\alpha, \nu}$ — квантиль t -распределения на уровне значения α ($0 < \alpha < 1$) и для ν степеней свободы. Соотношение $P = 1 - \alpha$ указывает на вероятность того, что истинное значение, вероятно, лежит в пределах доверительного интервала. Значения t сводятся в таблицу как функция $1 - \alpha$ и ν (см. [6]). Например, если $\alpha = 0,05$, то вероятность нахождения среднего значения в пределах доверительного интервала составляет 0,95 (т.е. 95%). Как обозначено в уравнении (1.12), малая величина стандартного отклонения вызывает сужение доверительного интервала, при котором подразумевается низкая дисперсия данных.

1.6.1. Надежность измерений

Термины «точность», «прецизионность» и «достоверность» определяют надежность аналитических измерений.

Точность указывает на степень соответствия между концентрацией, полностью определенной в единственном тесте, и истинной концентрацией (т. е. концентрацией в гарантированном справочном материале). Различие между гарантированной и измеренной концентрациями представляет *отклонение*

$$\text{bias}(c) = c_{\text{test}} - c_{\text{true}}. \quad (1.13)$$

Отклонение может произойти из-за *систематических ошибок*, произведенных неправильной калибровкой или неправильной эксплуатацией сенсора. Человеческие, инструментальные или вычислительные ошибки, известные как *грубые ошибки*, также вызывают увеличение отклонения. *Выброс* — это результат, появляющийся как заметное отклонение от других членов ряда данных выборки. Выбросы должны отбрасываться прежде, чем продолжится анализ данных.

Точность одного-единственного аналитического результата зависит от отклонения, а также предела достоверности и определена следующим соотношением:

$$\text{acc}(c) = 1 - \frac{\text{bias}(c)}{\Delta(\bar{c})}. \quad (1.14)$$

Достоверность относится к большому количеству повторяющихся измерений на одной и той же выборке, давая среднюю концентрацию $\bar{c}$. Достоверность подобна точности средней концентрации

$$\text{trn}(c) = 1 - \frac{\text{bias}(\bar{c})}{\Delta\bar{c}} = \text{acc}(\bar{c}). \quad (1.15)$$

Прецизионность указывает на степень соответствия между независимыми результатами измерения, полученными при подобных условиях измерений. *Прецизионность аналитической процедуры* представляется выражением

$$\text{pres}(c) = 1 - \frac{s_c}{\bar{c}}, \quad (1.16)$$

где s_c — стандартное отклонение и $\bar{c}$ — среднее значение серии повторяющихся измерений. Численное значение этого параметра увеличивается с уменьшением s_c , то есть ошибки. Для безошибочных измерений (при $s_c \rightarrow 0$) прецизионность становится равной 1. *Прецизионность аналитического результата* определена относительным доверительным интервалом в виде

$$\text{pres}(\bar{c}) = 1 - \frac{\Delta\bar{c}}{\bar{c}}. \quad (1.17)$$

Параметры, заданные уравнениями (1.14)–(1.17), имеют область определения, простирающуюся от нуля до единицы. Для хорошего качества сенсора каждый вышеупомянутый параметр должен быть близок к единице.

Поскольку сенсор может быть использован в анализе серии выборок, предполагается поддержка калибровки его параметров на постоянном уровне. Если это условие выполняется, сенсор имеет хорошую *воспроизводимость*, которая проверяется последовательностью измерений на идентичных справочных выборках, выполненных при тех же самых условиях измерений. Низкая воспроизводимость появляется, когда один или более параметров калибровки испытывают дрейф, который является медленным событием во времени. Дрейф может произойти из-за изменения свойств чувствительного элемента при повторном или длительном контакте с выборками.

Устранение дрейфа достигается корректным проектированием и производством чувствительного элемента.

Воспроизводимость не должна быть перепутана с *репродуктивностью*, которая указывает на возможность сенсора создавать подобный результат при различных условиях, т. е. у различных операторов, в различной аппаратуре, в различных лабораториях или после больших интервалов времени.

1.6.2. Селективность и специфика

Важным показателем качества является *селективность* сенсора, которая указывает на степень, с которой сенсор может выделить некоторый аналит при существовании влияния других компонентов выборки. Для обеспечения селективности функция калибровки должна включать одно или более дополнительных качеств, которые отображают влияние составов (сопутствующие обстоятельства), сопровождающих аналит в выборке. Если воздействие таких качеств обеспечивает заданный уровень ошибки, сенсор обладает удовлетворительной селективностью. Иначе сенсор представляет неправильный результат.

Помеха, являющаяся результатом взаимодействия сопутствующего обстоятельства с чувствительным элементом, создает специфические проблемы. Если сопутствующее обстоятельство затрагивает ответный сигнал сенсора, взаимодействуя с другими компонентами чувствительного элемента, то это приводит к неспецифическому эффекту. «Селективность» не следует путать с понятием «специфика», поскольку термин «селективность» является, в конечном счете, абсолютным.

Селективность сенсора определяется главным образом характером взаимодействия системы аналит–рецептор. На ранних стадиях изучения химических сенсоров селективность была важнейшей проблемой и главная цель исследования в этой области состояла в том, чтобы найти материалы для чувствительного элемента, максимально подходящие для заданного аналита. Как будет показано в разделе 1.7, даже сборка сенсоров с плохой селективностью может обеспечить определение концентрации различных аналитов соответствующими методами обработки данных. В этом случае плохая селективность — скорее преимущество, а не недостаток.

1.6.3. Способности обнаружения и определения количества

Предполагается, что сенсоры, как правило, определяют концентрации выше заданного уровня. Самый низкий уровень концентрации, при котором сенсор все еще обеспечивает надежные результаты, представляется как *предел обнаружения* (*limit of detection* — LOD). LOD — это самая низкая концентрация или количество вещества, которое можно отличить от факта его отсутствия (пустое состояние) с установленным пределом достоверности. Толкование терминов, включенных в определение LOD, продемонстрировано на рис. 1.2. Если y_b и s_b обозначают величину и стандартное отклонение чистых измерений соответственно, то сигнал, дающий предел обнаружения, определяется выражением

$$y_{\text{LOD}} = y_b + ks_b, \quad (1.18)$$

где k — числовой множитель, выбранный согласно требуемому доверительному уровню. Как правило, $k = 3$. LOD с точки зрения концентрации получен из величины y_{LOD} с использованием функции калибровки сенсора. Определение LOD

доказывает, что этот параметр зависит от двух факторов: чистоты ответного сигнала при пустом состоянии выборки и его стандартного отклонения. Хороший (т. е. очень низкий) LOD получен, если ответный сигнал чистой выборки очень низок и сопровождающий шум (который определяет величину s_b) также очень мал. LOD сенсора может зависеть как от особых характеристик процесса опознавания, так и от внутреннего LOD метода преобразования.

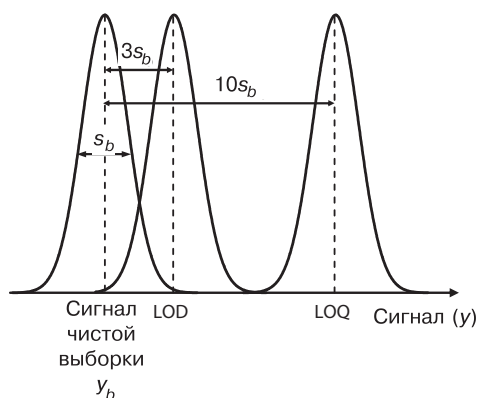


Рис. 1.2. Определение предела обнаружения (LOD) и предела определения количества (LOQ). Кривые представляют нормальное (гауссовское) распределение ошибок

(или область концентрации). Самый низкий предел диапазона ответа — LOD, введенный ранее; более точное обозначение этого параметра формулируется как нижний предел обнаружения. Верхний предел диапазона концентрации определяется значением, при котором ответный сигнал начинает значительно отклоняться от принятой функции калибровки. Например, отмеченное отклонение от линейной функции калибровки определяет верхний предел обнаружения. Это отклонение может быть определено различными факторами, такими как насыщенность чувствительного элемента частицами аналита. Отношение между верхним и нижним пределами обнаружения представляет *динамический диапазон сенсора*. Диапазон ответного сигнала размером в один порядок (т. е. динамический диапазон приблизительно 10) является минимально требуемым.

Другим показателем качества, связанным с чувствительностью, является *разрешающая способность* сенсора, которая определяется наименьшим обнаружимым изменением в концентрации аналита. Этот показатель зависит от двух факторов: шума и чувствительности. Шум определяет наименьшее обнаружимое изменение в ответном сигнале, а разрешающая способность является отношением между этим изменением ответного сигнала и чувствительностью. Высокая чувствительность

Более надежные аналитические результаты получаются, когда существует концентрация выше верхнего предела, названного *пределом определения количества* (limit of quantification — LOQ). Этот предел соответствует сигналу, который отличается от сигнала чистой выборки в среднем на $10s_b$.

Ясно, что предел обнаружения зависит от колебаний в сигнале чистой выборки, которые могут явиться результатом вероятностных процессов в функционировании сенсора (шум сенсора), а также от электронного шума в оборудовании считывания¹.

Каждый тип сенсора может обнаружить концентрации в пределах более или менее широкого диапазона концентраций, который известен как *диапазон ответа*

¹ *Чувствительность сенсора*, которая была уже введена в разделе 1.5, отражает изменение в создаваемом ответном сигнале единичным изменением в концентрации. Очевидно, что LOD связан с чувствительностью, как LOD, полученный умножением величины y_{LOD} на чувствительность. Часто чувствительность ассоциируется со способностью обнаружения. Это является ошибкой и не рекомендуется IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry — Международным союзом теоретической и прикладной химии). — Прим. научного редактора перевода.

и низкий уровень шума создают высокую разрешающую способность. Хотя это определение напоминает определение LOD, разрешающая способность не подобна LOD потому, что шум при наличии аналита может отличаться от шума чистой выборки.

1.6.4. Время формирования ответного сигнала

Как правило, сенсор используется, чтобы выполнить последовательный анализ серии выборок. Производительность аналитического процесса определяется временем, требуемым для дополнительных операций, таких как восстановление сенсора, восстановление выборки и введение новой выборки. *Время формирования ответного сигнала* (отклика)¹ сенсора может также определить до некоторой степени производительность. Время отклика определяется промежутком от момента, когда аналит добавлен к хорошо размешанному, свободному от аналита раствору, до момента, когда ответный сигнал сенсора становится фактически постоянной величиной. В течение этого интервала времени сенсор функционирует в переходном режиме. Время отклика может быть определено скоростью распространения (диффузии) аналита к чувствительному элементу или темпом взаимодействия аналита с чувствительным элементом или обоими процессами одновременно. Время отклика меньше 1 минуты превосходно, но и время отклика приблизительно в 10 минут все еще удовлетворительно. Намного более длительное время отклика в диапазоне десятков минут все еще приемлемо, если природа физико-химических процессов в сенсоре не позволяет произвести улучшения.

1.7. Сенсорные матрицы

Сенсорная матрица — это сборка множества сенсоров. Если все сенсоры в матрице подобны и откликаются на один-единственный аналит, матрица применима для параллельного анализа кратных выборок, причем каждая выборка взаимодействует с одним из сенсоров.

Сенсорные матрицы могут быть разработаны для того, чтобы выполнять одновременное определение кратных аналитов в выборке (мультиплексирование). Если каждый сенсор подобран к особому аналиту, его действия независимы от других сенсоров, тогда обеспечивается исключительное сенсорное определение концентрации. Однако есть необходимость в улучшенной селективности, которая может быть достигнута только в ограниченном количестве методов распознавания.

Более общий подход основан на матрицах, составленных из сенсоров с плохой селективностью (перекрестной чувствительностью). В этом случае каждый сенсор отзывается больше чем на один компонент выборки и отзыв каждого сенсора суммируется в эффектах, проявленных серией компонентов.

1.7.1. Количественный анализ сенсорными матрицами с перекрестной чувствительностью

Перекрестно-чувствительные сенсорные матрицы являются полезными инструментами для осуществления одновременного количественного обнаружения нескольких

¹Иногда время формирования ответного сигнала называют *временем отклика*, применение этих терминов равнозначно. — *Прим. научного редактора перевода.*

аналитов, принадлежащих к конкретному классу соединений (например летучих горючих паров в воздухе). Каждый сенсор в матрице производит составной ответный сигнал, который зависит от каждого превращения вещества аналита. Чтобы определить концентрацию конкретного аналита, композиционный отзыв должен быть обработан статистическими методами, известными как *многомерные методы анализа данных*. Применение таких методов к аналитической химии является одной из целей хеометрики [9]. Альтернативный подход к анализу данных, произведенных сенсорной матрицей, основан на *искусственных нервных сетях*.

Этот раздел вводит некоторые элементы многомерного анализа данных. Предположим, что матрица включает n сенсоров с перекрестной чувствительностью, которые отзываются линейно на m аналитов в некоторой выборке k . Далее предположим, что отзыв каждого сенсора к частному аналиту непосредственно пропорционален концентрации этого аналита (c_{jk}) и константе (названной чувствительностью), обозначенной a_{ij} . Наконец предположим, что полный сигнал, созданный одним сенсором (y_{jk}), является суперпозицией отзывов на каждый аналит ($a_{ij}c_{jk}$). Далее отзывы сенсоров задаются следующим набором уравнений:

[illegible]

Если N выборок проанализированы той же самой матрицей, тогда могут быть составлены N подобных систем уравнений при $k = 1, 2, \dots, N$. Эта композиция систем уравнений, которая представляет математическую модель отзыва матрицы, может быть записана в сжатой форме с использованием матричных обозначений следующим образом:

$$\underset{(n \times N)}{Y} = \underset{(n \times m)}{A} \times \underset{(m \times N)}{C} . \quad (1.20)$$

Здесь $\mathbf{Y}$ является матрицей, включающей отзыв n сенсоров в N выборках. В этой матрице каждая колонка включает отзывы, связанные с частным анализом в данной выборке, в то время как каждый ряд представляет отзыв отдельного сенсора к различным анализам в той же самой выборке. $\mathbf{A}$ является *матрицей чувствительности*, составленной из a_{ij} термов, и $\mathbf{C}$ — это матрица концентрации, которая содержит известные концентрации m аналитов (ряды) в N выборках (колонки). Уравнение (1.20) используется на стадии калибровки, чтобы получить матрицу чувствительности, используя выборки с известными концентрациями. Концентрации в множестве N' неизвестных выборок могут быть предсказаны отзывами матрицы сенсоров для неизвестных выборок $\mathbf{Y}^s$ следующей матричной операцией:

$$\underset{(m \times N')}{C^s} = \underset{(m \times n)}{B} \times \underset{(n \times N')}{Y^s} + \underset{(m \times N')}{e} \quad (1.21)$$

Здесь $\mathbf{e}$ — разностная матрица, отображающая остаток, являющийся отличием между измеренными и образцовыми данными, $\mathbf{B}$ — прогнозная матрица. Когда количество сенсоров в матрице превышает число аналитов, существующих в выборках (т. е. $n > m$), матрица $\mathbf{B}$ получается из матрицы чувствительности $\mathbf{A}$ как

$$\mathbf{B} = \mathbf{A}^T(\mathbf{A}\mathbf{A}^T)^{-1}, \quad (1.22)$$

где $\mathbf{A}^T$ является транспонированной матрицей к матрице чувствительности. Хотя могут быть использованы сенсорные матрицы при $n = m$, матрицы с $n > m$ позволяют производить более надежный расчет данных.

Уравнение (1.21) может быть обработано с помощью мультилинейного регрессивного анализа (multilinear regression analysis — MLR), но более надежные методы основаны на сжатии данных. В таких методах количество переменных сокращено посредством формирования новых переменных как линейных комбинаций из исходных переменных. Новые переменные называют *основными компонентами*, и p -я основная компонента может быть выражена как

$$X_p = \alpha_{1p}y_{1j} + \alpha_{2p}y_{2j} + \dots + \alpha_{ip}y_{ij} + \dots + \alpha_{np}y_{nj}. \quad (1.23)$$

Коэффициенты α_{ip} подобраны так, чтобы посредством X_p представлялись определенные статистические условия. Методы этого типа составляют *основную компонентную регрессию* (principal component regression — PCR) и *частичную регрессию наименьшего квадрата* (partial least square regression — PLS).

Поскольку отзыв матрицы на одну-единственную выборку является одномерной матрицей (т.е. вектором), сенсорная матрица формирует *сенсор первого порядка*. *Сенсор второго порядка* может быть получен путем записи каждого сигнала сенсора как функции времени, и тогда отзыв на одну-единственную выборку собирается в форме двумерной матрицы. В трехмерном представлении отзыв матрицы проявляется как поверхность, на которой каждая точка определена двумя переменными: числовым идентификатором сенсора и временем измерения. Следовательно, такая сенсорная матрица работает в переходном режиме. В стационарном состоянии матрица функционирует как сенсор первого порядка. По сравнению с сенсором нулевого порядка (т.е. один-единственный сенсор, отзывающийся на один-единственный аналит) сенсоры высших порядков создают значительно большее количество информации.

Это обстоятельство представляет интерес для указания на преимущества многомерного анализа данных сравнительно с методом одномерного анализа [10]. В одномерном методе предполагается, что каждый сенсор отзывається на один-единственный аналит. Однако отзыв может быть затронут интерференционными вмешательствами и шумом. Напротив, многомерный анализ обеспечивает достоверные результаты, даже если вмешательства в процесс опознавания действительно происходят. Эта особенность уменьшает строгую селективность сенсора, чего часто трудно достигнуть. Кроме того, многомерный анализ способствует шумоподавлению и позволяет обнаруживать выбросы. В дополнение, что не менее важно, многомерный анализ разрешает одновременное определение нескольких аналитов в смеси, несмотря на перекрестную чувствительность. Всесторонний краткий обзор калибровки сенсорных матриц представлен в [11].

1.7.2. Качественный анализ сенсорными матрицами с перекрестной чувствительностью

Матрицы сенсоров с перекрестной чувствительностью могут использоваться, чтобы идентифицировать особые смеси аналитов в соответствии с множеством ответных сигналов на смесь. Такое устройство может имитировать ощущение запаха (*искус-*

ственный нос [12, 13]) или вкуса (искусственный язык [14, 15]). Иными словами, искусственный нос или искусственный язык выполняют классификацию серии выборок согласно их подобию в химической композиции.

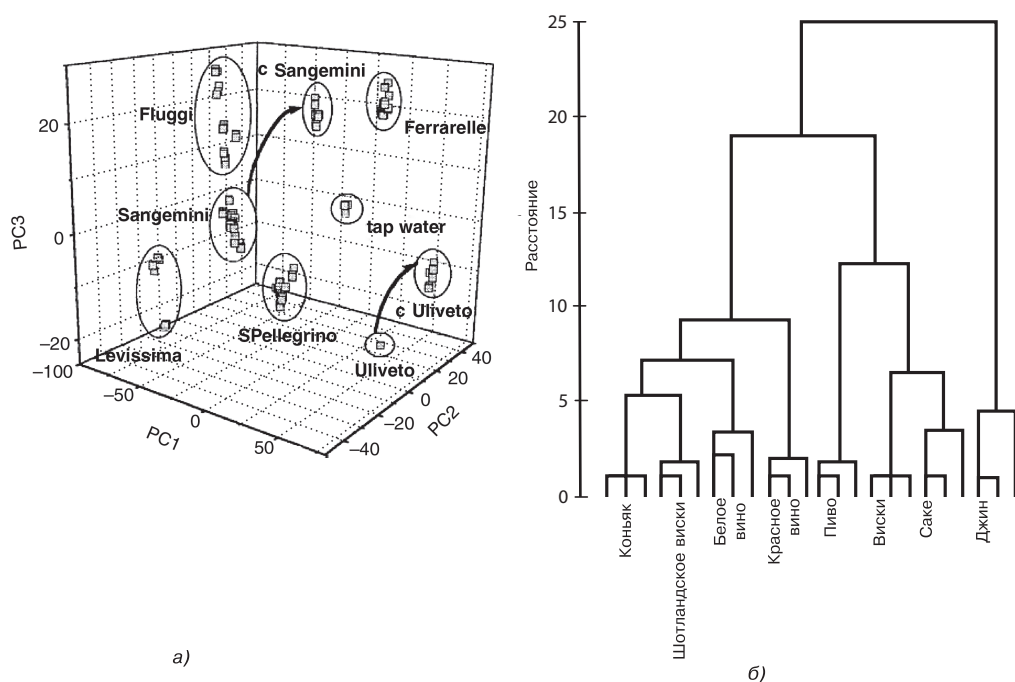


Рис. 1.3. Применения устройств «искусственный нос/язык»: а) классификация различных видов итальянских минеральных вод с использованием искусственного языка. Стрелки указывают на изменение кластеров в результате загрязнения органическими соединениями. б) Классификация ликеров (три выборки каждого бренда) иерархическим кластерным анализом. а) Воспроизведено с разрешения [16]. Copyright 2000 Elsevier. б) Воспроизведено с разрешения [17]. Copyright 1991 Elsevier

Так, например, для классификации минеральных вод используют матрицу неселективных ионных сенсоров, приведенных ниже. Используются отзывы сенсоров, чтобы вычислить три основных компонента (PC1, PC2 и PC3). В трехмерном графическом изображении каждая выборка представлена точкой, определенной значениями основных характерных компонентов, как показано на рис. 1.3, а. Степень подобия двух образцов выражена расстоянием между соответствующими точками. Очевидно, что различные выборки той же самой торговой марки сгруппированы в четких кластерах. Если выборка загрязнена небольшим количеством органического вещества, как это показано стрелкой на рис. 1.3, а, то загрязненные выборки формируют новые кластеры, маркированные приставкой перед названием продукта.

Основной компонентный анализ выгоден в том, что небольшое количество переменных является представительным для большого набора оригинальных данных. Это позволяет производить легкую визуализацию и интерпретацию данных, а также надежную классификацию и идентификацию выборок.

Другое возможное представление данных, полученных искусственным носом или языком, продемонстрировано на рис. 1.3, б.

Эти результаты получены ощущением паров различных спиртных напитков. С этой целью использовалась матрица из шести неспецифицированных газовых сенсоров. Для каждой выборки основные компоненты получаются и используются, чтобы вычислить расстояние от других выборок. Матричный выход представлен в этом случае посредством *иерархического кластерного анализа*, с помощью которого можно сортировать выборки в форме дерева поиска (древовидной диаграммы) по расстоянию между ними. Подобная информация может быть получена анализом распознавания выборок данных посредством газовой хроматографии, но по методу искусственного носа это сделать проще и быстрее.

Методы обработки данных, представленные выше, составляют класс методов *распознавания образов* [18], которые выполняют классификацию, определяя каждую выборку в особый класс.

1.7.3. Применения искусственной нервной сети в устройстве «искусственный нос/язык»

Искусственная нервная сеть является математической или вычислительной моделью, которая имитирует структуру и функциональные особенности мозга [18, 19]. Нервная сеть состоит из связанной группы искусственных нейронов. Линия передачи между двумя нейронами — это синапс. Одиночный нейрон получает серию входных переменных, которые взвешиваются синапсами и затем суммируются. Получающаяся сумма преобразуется применением передаточной функции (например умножением с константой или применением нелинейной функции). Результат преобразования формирует выходной сигнал нейрона.

Чтобы получить нервную сеть, искусственные нейроны собраны в последовательность слоев так, чтобы выходные сигналы от слоя питали нейроны в следующем слое. Последний в последовательности слой обеспечивает сетевой выход.

В применениях искусственного носа входные сигналы создаются матричными сенсорами. Прежде чем быть использованной, нервная сеть обучается посредством многих известных составов. В этом процессе факторы взвешивания настраиваются так, чтобы минимизировать различие между фактическим и предопределенным сигналом выхода. После этого шага обучения сеть в состоянии определить эти составы.

По сравнению с методами, введенными в предыдущих разделах, искусственные нервные сети имеют много возможных преимуществ, поскольку они являются адаптивными системами, которые изменяют свою структуру сообразно внешней или внутренней информации, которая распространяется через сеть во время фазы обучения. Сети обычно используются, чтобы моделировать сложные отношения между входными и выходными сигналами или находить изображения по составу данных. Неудобство нервных сетей состоит в длительном времени обучения, необходимом большим сетям. Несмотря на это, искусственные нервные сети — это очень ценные инструменты для обработки данных в искусственных устройствах обоняния и дегустации.

1.7.4. Перспективный обзор

Сенсорные матрицы позволяют реализовать мультиплексный анализ выборок. Особным преимуществом матриц сенсоров с перекрестной чувствительностью является обеспечение более точных и надежных результатов по сравнению с сенсорами, ориентированными на некоторый отдельный анализ.

Матрицами сенсоров с перекрестной чувствительностью можно управлять в устройствах искусственного носа/языка. Вместо обнаружения определенных компонентов искусственный нос/язык назначает аналиту характерный образ, который зависит от его полного химического состава. Таким образом, возможно выполнить типовую идентификацию и классификацию.

Существует широкий диапазон применений искусственного носа/языка в различных областях [13]. Качество и органолептические свойства пищевых продуктов и напитков, так же как и процессы старения или фальсификации, могут быть оценены с помощью исследования особенности композиции химических компонентов. В медицине искусственный нос может быть полезным для неразрушающего диагностического испытания изменчивых составных смесей в дыхании, моче или поте. Контроль загрязнения воздуха или воды составляет другое многообещающее применение искусственного обоняния. В области безопасности искусственный нос является перспективным инструментом для обнаружения химического или биологического оружия, а также наркотиков или взрывчатых веществ.

Детали распознавания и методы преобразования в искусственном носе/языке представлены в следующей главе, где рассматриваются различные виды химических сенсоров. Физико-химические принципы различных типов газовых сенсоров, используемых в искусственных носсах, рассмотрены в [12, 20]. Краткие обзоры методов расчета для обработки данных в устройствах искусственного носа даны в [12, 21].

1.8. Сенсоры в проточно-аналитических системах

Поскольку очень часто сенсор или сенсорная матрица используются при анализе значительного числа выборок, автоматизация управления последовательностью действий существенна для получения высокой пропускной способности выборок и сокращения стоимости персонала.

Общий метод автоматизации при анализе жидких выборок называется проточно-инжекционным анализом (flow injection analysis — FIA) [22, 23]. В этом методе сенсор установлен в поточную ячейку, через которую непрерывно качается жидкость. Выборка инжектируется посредством жидкостно-хроматографического клапана (ротационного клапана) и переносится через разъем, вставленный в течение несущего потока. Вследствие диффузии выборка рассеивается в стороны, производя изменение концентрации после разъема. Когда такая композиция достигает сенсорного элемента, выборка создает сигнал, который изменяется во времени от фоновому уровню до максимального значения и затем уменьшается, поскольку выборка прекращает поступать из разъема в сенсорный элемент. Как высота пика, так и область кривой сигнал–время могут быть коррелированы концентрацией аналита.

FIA позволяет получить надежный результат, если поток жидкости является ламинарным, для чего требуется, чтобы диаметр трубки составлял приблизительно от 0,1 до 1 мм. Высокая степень автоматизации в FIA достигается интеграцией устройств введения выборки и ее предварительной обработки.

Более того, FIA предлагает возможность управления последовательностью различных шагов, таких как испытание выборки, очистка сенсорной ячейки и восстановление сенсора.

Сенсор, разработанный для применения FIA, может быть либо плоской формы, либо иметь форму проточного канала с сенсорным элементом на внутренней стенке.

Современные методы проточного анализа основаны на микрожидкостных системах [24], которые имеют дело с управлением и манипуляциями жидких объемов в субмикролитровом диапазоне и поэтому ограничены каналами очень небольшого размера. Поток жидкости может быть вызван приложенным давлением или явлениями электрокинетики. Отличие микрожидкостных систем от традиционных систем проточного анализа состоит в интеграции большой сети каналов и других микроустройств (таких как актюаторы и клапаны) на небольшом кристалле. Поэтому микрожидкостные устройства позволяют осуществить крупномасштабную параллельную обработку и мультиплексирование поточного анализа. Существенное преимущество микрожидкостных устройств состоит в их совместимости с микромеханическими технологиями.

Появление микрожидкостных устройств вызвало революцию в области автоматической аналитической химии развитием тотальных микроаналитических систем (micro-total analytical system — μ TAS), также известных как системы «лаборатория-на-кристалле» [25, 26], которые позволяют производить миниатюризацию и интеграцию сложных функций, включая физический и химический анализ выборки, разделение и обнаружение аналита в пределах границ однокристалльной схемы. Эти системы могут быть точными, надежными, устойчивыми и недорогими, а поэтому хорошо подходят для тестирования в пунктах экспресс-анализа или полевых условиях.

1.9. Применение химических сенсоров

В общем виде химические сенсоры были созданы, чтобы обеспечить альтернативу стандартным аналитическим методам, основанным на таких методах, как спектрометрия, хроматография, биохимические или микробиологические технологии. Химический сенсор может обеспечить дешевое решение частной аналитической проблемы без дорогого многофункционального аналитического оборудования.

Кроме того, химические сенсоры подходят для полевого химического анализа в экологических исследованиях. В лекарственных применениях химические сенсоры полезны для децентрализованных клинических исследований (применения в медпунктах).

Химические сенсоры предполагают возможность мониторинга химических параметров в промышленном, экологическом и иных применениях. Очень интересно применение химических сенсоров *в естественных условиях* определения и мониторинга химических элементов в отношении физиологии.

Использование сенсоров является более быстрым, чем обычное химическое, биохимическое или микробиологическое исследование. Поэтому неудивительно, что химические сенсоры нашли широкое применение в различных областях, таких как контроль качества окружающей среды, клинические исследования, продовольственная технология и обнаружение элементов оружия. Следующие разделы выделяют некоторые типичные аналитические проблемы, которыми возможно заниматься посредством химических сенсоров. Обзоры применений химических сенсоров доступны в [27, 28].

1.9.1. Применение химических сенсоров в экологии

Экологическое применение химических сенсоров сосредотачивается главным образом на оценке качества воды и загрязнения воздуха [29–31].

Загрязнение воздуха автомобильным движением и промышленными воздействиями определяется токсичными газами (сера, азот, окись углерода, цианид водорода и т. д.), токсичными неорганическими парами (например ртуть), а также многими другими токсичными парами. В частном отношении необходим контроль промышленного загрязнения окружающей среды, вызванного опасными газами и парами, особенно теми, которые являются токсичными, огнеопасными или взрывчатыми. Качество воздуха в помещении может быть оценено посредством сенсоров углекислого газа и водного пара (влажность).

Загрязнение воды непосредственно затрагивает водные организмы и, в более общем виде, любые организмы, которые нуждаются в воде для выживания. Главные загрязнители воды, обнаруживаемые химическими сенсорами, являются токсичными ионами (например ртуть, свинец, кадмий и ионы цианида), а также ионами, возникающими в результате сельскохозяйственных работ. Использование удобрений может привести к загрязнению водных источников нитратами и ионами фосфата, которые могут разрушить водные экологические системы. Сельское хозяйство — это также источник загрязнения воды токсичными остатками пестицидов.

Различные токсичные составы в воде могут быть оценены посредством их эффектов подавления в реакциях, катализируемых ферментами [32]. Сенсоры органических загрязнителей также были разработаны с использованием специфических антител в качестве реактивов опознавания.

Ионные определители могут быть выполнены в виде стандартных потенциометрических ионных сенсоров, но из-за свойственных им высоких порогов обнаружения такие сенсоры подходят только для анализа вод с большой степенью загрязнения. Однако недавний прогресс в этой области привел к разработке ионных сенсоров с очень низким порогом обнаружения, который может обеспечить определение ионов металла ниже предела концентрации, заданного правовым регулированием по качеству питьевой воды.

Сенсоры для токсинов были созданы на основе использования микроорганизмов в качестве чувствительных элементов. Токсины выборки затрагивают метаболизм микроорганизма, что позволяет произвести контроль концентрации токсина посредством измерения потребления кислорода в процессе дыхания микроорганизма. Тот же самый принцип использовался, чтобы разработать сенсоры для измерения содержания полностью разложившегося органического материала в воде. В этом случае разложившаяся органика стимулирует метаболизм и, следовательно, потребление кислорода. Генотоксичность экологических выборок может быть оценена посредством сенсоров нуклеиновой кислоты [33].

Определение возможных патогенных микроорганизмов в воде составляет другое важное применение, которое может быть выполнено посредством сенсоров на антителах [34, 35].

Большой проблемой является кислотный дождь, вызванный производством энергии, основанном на сгорании ископаемого топлива. Распространенные источники кислотности — это окиси азота и серы, которые приводят к увеличенной кислотности после растворения в атмосферной воде.

Увеличенная кислотность может быть обнаружена косвенным способом, путем контроля содержания определенных анионов, таких как нитрит и сульфат.

Решению аналитических проблем в науке о море хорошо способствует применение химических сенсоров [36, 37].

Типичными примерами представляются управление эвтрофикацией водоемов, на которую оказывает влияние увеличенной концентрации нитрата и ионов фосфата

от удобрений или сточных вод, контроль загрязнения пестицидами или загрязнение водных путей сбросами с платформ добычи нефти, а также определение следов металлов.

1.9.2. Применение химических сенсоров в здравоохранении

Одна из главных областей применения химических сенсоров — это здравоохранение, в котором химические сенсоры используются в пробирке или в естественных условиях (в живом организме) для определения химизма физиологии [38]. Функционирование сенсоров в естественных условиях зависит в большой степени от их биологической совместимости [39], поскольку в естественных условиях в общем случае необходимы миниатюризированные сенсоры, которые были разработаны именно с этой целью. Кроме того, химические сенсоры могут быть использованы, чтобы обнаружить патогенные микроорганизмы в клинических исследованиях.

Щелочь и щелочноземельные ионы, так же как неорганические газы (растворенный кислород и углекислый газ, окись азота), могут быть определены посредством отделенных сенсоров.

Определение глюкозы в крови очень важно при лечении диабета [40, 41]. В настоящее время сенсоры глюкозы для самоконтроля ее в крови легко доступны, и интенсивные научно-исследовательские работы посвящены развитию и улучшению сенсоров глюкозы, работающих в естественных условиях [42]. Следующий шаг в этой области заключается в интеграции сенсоров глюкозы с системами доставки инсулина, чтобы автоматически поддерживать нормальный уровень инсулина в крови.

Были также созданы сенсоры для большого числа биогенных составов. Среди многих целевых составов следует назвать L-лактат, пироват, мочевины, мочевые и щавелевые кислоты, гистидин и гистамин, фенолические составы (L-допа, допамин и адреналин); супероксиды и сульфатные желчные кислоты также могут быть упомянуты. Названные сенсоры позволяют обеспечить контроль наркотиков в крови или моче. Обнаружение патогенных бактерий и вирусов — другое применение химических сенсоров в клинических исследованиях.

Болезнетворные микроорганизмы могут быть обнаружены иммунологическими или нуклеино-кислотными сенсорами [35]. Нормальные биологические процессы, патогенные процессы или фармакологические отзывы на терапевтическое вмешательство могут быть оценены посредством *биомаркеров*, которые являются веществами, используемыми в качестве индикаторов патологических состояний. Химические сенсоры для биомаркеров были созданы в целях диагностики различных форм рака, сердечно-сосудистых заболеваний и гормональных проблем здоровья [43].

1.9.3. Применение химических сенсоров в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и биотехнологии

Различные химические сенсоры были разработаны, чтобы оценивать качество пищевых продуктов и напитков, а также для того, чтобы контролировать производственные процессы в пищевой промышленности и биотехнологии. Применение ферментативных сенсоров в пищевой промышленности рассмотрено в [44, 45].

Качество пищи зависит в большой степени от содержания в ней питательных веществ и витаминов. Сахариды (такие как глюкоза, фруктоза, сахароза и лактоза)

могут быть определены посредством ферментативных сенсоров, основанных на определенных ферментах, чтобы произвести химическое преобразование целевого состава.

Другие важные компоненты пищевых продуктов представляются молочной, яблочной, лимонной и глутаминовой кислотой. Различные ферментативные сенсоры для таких составов были созданы с использованием соответствующих ферментов.

Важным качественным параметром пищевых продуктов является их свежесть, которая может быть оценена по величине концентрации типичных продуктов процесса порчи. Порча мяса оценивается посредством ферментативного сенсора для путресина ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) и гипоксантина (производная пурина). Свежесть рыбы определяется серией измерений для выявления продуктов порчи, таких как иноксин-5-фосфат, инозин и гипоксантин [46].

Также были разработаны сенсоры для других составов, имеющих отношение к качеству пищи (таких как холестерин, жирные кислоты, лецитин, холин и полифенолы).

Особое значение в пищевой промышленности имеет контроль патогенных микроорганизмов и микробных токсинов в продовольствии [34, 35, 47]. Химические сенсоры для болезнетворных микроорганизмов могут быть созданы на основе использования распознавания антигена-антитела или обнаружением определенной ДНК.

В промышленности напитков упомянутые химические сенсоры могут использоваться, чтобы определить этанол и также глицерин, причем последний является главным вторичным продуктом алкогольного брожения, и для каждой вышеупомянутой разновидности были созданы ферментативные сенсоры. Содержание сернистоислого иона в вине может также быть определено посредством ферментативных сенсоров.

В сельском хозяйстве химические сенсоры используются в анализе качества почвы посредством контроля макропитательных веществ, таких как нитрат, фосфат и ионы калия [48].

Биотехнология использует биологические системы, живые организмы или их производные (например ферменты или живые клетки) для того, чтобы обработать сырье. Различные химические сенсоры используются, чтобы контролировать параметры процессов — pH-фактор, растворенный кислород, углекислый газ и различные биоорганические составы, такие как сахараиды и аминокислоты [49, 50]. Типовое применение химических сенсоров найдено в биотехнологии, в промышленности брожения и производстве некоторых антибиотиков.

1.9.4. Химические сенсоры в оборонных применениях

Оборона в общем случае и защита против террористических актов в частности в настоящее время являются предметом большого беспокойства, по причине которого ведется разработка химических сенсоров для взрывчатых веществ и боевых средств, таких как патогенные микроорганизмы и токсичные газы. Быстрое по месту обнаружение этих средств удобно производить посредством химических сенсоров.

Взрывчатые вещества могут быть прослежены с использованием сенсоров, определяющих наличие их паров. Такие сенсоры были разработаны на основе естественных и синтетических реагентов, которые позволяют производить распознавание по аффинности, по ферментам и по целым клеткам [51].

Реагенты биологической войны включают живые организмы, вирусы или инфекционный материал, полученный от них, который может использоваться в целях

агрессии. Объектами биологической войны могут быть люди, животные и урожай на плантациях. Такие реагенты могут размножаться в подвергшемся нападению организме и вызывать их болезнь или смерть. Патогенные бактерии, вирусы и некоторые грибы являются типичными реагентами биологической войны.

Различные типы химических сенсоров для обнаружения реагентов биологической войны были созданы на основе различных механизмов распознавания, таких как аффинность, распознавание по антителам или синтетическим материалам, распознавание ферментами или по целым клеткам, а также прослеживанием патогенной ДНК посредством комплементарной последовательности ДНК [52, 53]. Применение наноматериалов в сенсорах для распознавания реагентов биологической войны представляет собой непрерывно увеличивающийся интенсивный интерес [54].

1.10. Литература по химическим и биологическим сенсорам

Имеется значительное количество литературы, относящейся к химическим и биологическим сенсорам, в настоящем разделе перечислены только некоторые общие тексты и часть соответствующих журналов, относящихся к названной тематике. Ссылки по особым видам сенсоров включены в соответствующие главы.

Первая монография по химическим сенсорам была выпущена J. Janata в 1989 г. [55]. Исправленное издание этого текста стало доступным недавно [56].

К 1990 область биосенсоров достигла зрелости и была рассмотрена в серии изданных монографий: E.A.N. Hall [57], F.W. Scheller, F. Schubert [58], A.J. Cunningham [59].

Статус науки и технологий химических сенсоров в 1985–1995 годах подробно рассмотрен в нескольких коллективных томах [60–64]. Несколько позже были изданы всесторонние коллективные тома, посвященные биосенсорам [65, 66] и электрохимическим сенсорам [67].

Краткие обзоры недавних достижений в химических сенсорах доступны в продолжающихся сериях издательства Springer по химическим и биологическим сенсорам под редакцией G. Urban. Прогресс материалов и технологий для химических сенсоров достаточно полно рассмотрен в сериях под названием «Химические сенсоры» под редакцией Г. Коротченкова, выпущенных издательством Momentum Press (2010–2012).

Химические сенсоры достаточно представлены в энциклопедических текстах по физическим и химическим сенсорам в [68].

Большой интерес представляют комплекты прокомментированной технической документации процессов изготовления химических сенсоров, кроме того, стала доступна документация для различных видов биосенсоров [69–71]. Комплекты документации, ориентированной на особые виды химических сенсоров, упомянуты в соответствующих главах.

Развитие и расширение применений химических сенсоров вызвали публикацию нескольких соответствующих текстов для образовательных целей (например [72–75]). Всесторонний общий обзор различных видов элементов распознавания, используемых в химических сенсорах, доступен в [76].

Научно-исследовательские работы и обзоры по химическим сенсорам в настоящее время издаются в различных журналах. Два журнала, специализирующиеся на химических сенсорах, должны быть упомянуты в первую очередь, а именно:

- Biosensors and Bioelectronics (Elsevier),
- Sensors and Actuators B: Chemical (Elsevier).

Существуют также некоторые журналы, представляющие и химические, и физические сенсоры; например:

- IEEE Sensors Journal (Institute of Electrical and Electronics Engineers),
- Sensors-Open Access Journal (MDPI – Open Access Publishing).

Большое число вкладок по химическим сенсорам появляется в журналах, представляющих общую аналитическую химию, таких как перечисленные ниже:

- Analytica Chimica Acta (Elsevier),
- Analytical Chemistry (American Chemical Society),
- Analytical and Bioanalytical Chemistry (Springer),
- Analytical Letters (Taylor & Francis),
- Analyst (The Royal Society of Chemistry),
- Talanta (Elsevier),
- TrAC Trends in Analytical Chemistry (Elsevier). Этот журнал издает только обзоры.

Следующие журналы, представляющие электрохимию и электроаналитическую химию, часто публикуют работы по электрохимическим сенсорам:

- Bioelectrochemistry (Elsevier),
- Electroanalysis (Wiley-WCH),
- Electrochemistry Communications (Elsevier),
- Journal of Electroanalytical Chemistry (Elsevier).

1.10.1. Организация текста книги

Глава 1 вводит общие термины и понятия в науке и технологии химических сенсоров. Далее главы 2–8 посвящены общим методам распознавания и материалам, обычно используемым для химических сенсоров, так же как и методам и технологиям, реализуемым при производстве таких приборов.

Следующие главы ориентированы на различные виды химических сенсоров, классифицированных в соответствии с методом преобразования. Как правило, сначала вводятся физические или физико-химические принципы рассматриваемого метода преобразования. Далее представлены различные типы сенсоров, полученные объединением по рассматриваемому методу преобразования с разнообразными схемами преобразователей.

Белки широко используются в сенсорах в качестве элементов распознавания, также как и ферменты, антитела или биологические рецепторы. По этой причине вторая глава посвящена краткому обзору белковых структур и протеинов.

Глава 3 вводит ферменты и их применение в химических сенсорах для определения ферментных оснований и ингибиторов фермента, а также как сигнальные маркеры в аффинных сенсорах. Главные стратегии преобразования в ферментативных сенсорах также представлены в этой главе. Понимание функционирования ферментативных сенсоров зависит в значительной степени от математического моделирования таких сенсоров. Эта тема представлена в главе 4.

Понимание белка и химии фермента достаточно, чтобы оценить типичные методы производства химических сенсоров, которые формируют содержание главы 5. Общие методы для фиксации элементов распознавания, материалы, используемые в качестве поддержки фиксации, другие материалы, относящиеся к технологии сенсоров, так же как и микротехнологии, применяемые в производстве сенсоров, приведены в этой главе. Другие методы и материалы, которые специфичны для частных классов химических сенсоров, рассмотрены в последующих главах.

Главы 6 и 7 обращены к методам распознавания, основанным на реакциях аффинности. Глава 6 вводит методы опознавания, основанные на антителах и других естественных и синтетических реактивах аффинности. Особый класс аффинного взаимодействия включает нуклеиновые кислоты (глава 7). В этом случае взаимодействие системы аналит–рецептор основано только на двух типах водородных связей между комплементарными нуклеобазам. В обеих главах 6 и 7 представлена общая стратегия преобразования для каждого вида материала преобразования.

Поскольку применение наноматериалов в сенсорной технологии в настоящее время является темой огромного интереса, глава 8 описывает структуру и свойства различных классов наноматериалов и возможностей их применения при производстве сенсоров.

Следующие главы вводят типичные методы преобразования и представляют различные химические сенсоры, основанные на рассмотренных методах.

Глава 9 вводит сенсоры, в которых преобразование основано на главном свойстве химических реакций, то есть на тепловом эффекте. Два вида сенсоров рассмотрены в этой главе, а именно ферментативные сенсоры и сенсоры с каталитическим окислением горючих газов.

Глава 10 представляет методы ионного распознавания и потенциметрические ионные сенсоры. Кроме того, эта глава вводит ряд химических сенсоров, основанных на процессах опознавания, приводящих к формированию ионов, таких как сенсоры, основанные на ферментативной реакции или растворении газов в водных растворах. Эти сенсоры используют ионные сенсоры как преобразовательные элементы. Глава 11 посвящена продвинутому классу потенциметрических сенсоров, которые основаны на интеграции полупроводниковых электронных устройств с соответствующими чувствительными элементами.

Частное, но очень важное применение неорганических и органических полупроводниковых материалов относится к резистивному газовому восприятию темы, которая рассматривается в главе 12. Общее свойство глав 11 и 12 заключается в применении полупроводниковых материалов для распознавания и преобразования.

Следующие пять глав посвящены электрохимическим сенсорам, основанным на динамическом электрохимическом преобразовании, фундаментальные принципы которых являются объектом главы 13. Содержание глав 14 и 15 составляют амперометрические ферментативные сенсоры; предыдущая глава вводит принципы разработки таких датчиков, в то время как последующая дает методы расчета математического моделирования амперометрических ферментативных сенсоров.

Применение динамических электрохимических методов к аффинным сенсорам и нуклеино-кислотным сенсорам составляет содержание главы 16. Поскольку в обоих случаях распознавание основано на формировании ассоциативных комплексов, имеется много общих характеристик, привлекаемых из электрохимического преобразования.

Всестороннее исследование динамики электрохимических процессов возможно с помощью применения электрохимической импедансной спектроскопии. Этот об-

ций метод, так же как и более специализированные методы, являющиеся производными из него (такие как кондуктометрические и емкостные измерения), представлены в главе 17.

Степень объема, уделенного электрохимическим сенсорам, определяется центральным положением, занятым этими сенсорами в контексте науки о химических сенсорах.

Оптическим сенсорам посвящены главы 18–20. Глава 18 представляет общие принципы химических чувствительных элементов, основанных на световодах. Глава 19 посвящена дизайну оптических сенсоров вместе с различными методами распознавания и применениями, находящимися на стадии становления. Глава 20 обращена на важную современную тенденцию в развитии оптических сенсоров, состоящую в применении некоторых наноматериалов в оптических чувствительных элементах.

Глава 21 ориентирована на сенсоры, в основе которых лежит особый тип механического явления — акустическая волна, распространяющаяся в твердых, жидких и вязкоупругих материалах.

В настоящее время большой интерес вызывает применение микроэлектромеханических систем (МЭМС) в химическом восприятии, и этой тематике посвящена глава 22. Как в случае акустического сенсора, МЭМС-сенсор реализует преобразование механическими эффектами, полученными как событие распознавания.

Последняя глава, 23-я, вводит сенсоры, основанные на живом материале (клетки, ткани), в качестве рецепторов распознавания. Эта глава была размещена в конце, потому что живые материальные сенсоры используют серию методов преобразования, введенных в предыдущих главах.

Большинство глав и также некоторых разделов были организованы так, чтобы ввести сначала существенные принципы рассматриваемого типа сенсора. Далее перспективные темы представлены таким образом, чтобы заинтересованный читатель мог приобрести более глубокие знания в этой области.

Каждая глава дает некоторые ключевые ссылки, чтобы помочь заинтересованному читателю получить первый контакт с соответствующей литературой.

Литература

1. Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. *et al.* (1999) «Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification» — (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **71**, 2333–2348.
2. Sinclair, I.R. (2001). *Sensors and Transducers*, Newnes, Boston.
3. Fabbrizzi, L. and Poggi, A. (1995). «Sensors and switches from supramolecular chemistry». *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 197–202.
4. Heineman, W.R. and Jensen, W.B. (2006). «Leland C. Clark Jr. (1918–2005), Biosens». *Bioelectron.*, **21**, 1403–1404.
5. Fogg, A.G., Scullion, S.P., Edmonds, T.E. *et al.* (1990). «Adaptation of online reactions developed for use with flow-injection with amperometric detection for use in disposable sensor devices — reductive determination of phosphate as preformed 12-molybdophosphate in a capillary-fill device». *Analyst*, **115**, 1277–1281.
6. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Prentice Hall, Harlow.

7. Danzer, K. and Currie, L.A. (1998). «Guidelines for calibration in analytical chemistry — Part 1. Fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998)». *Pure Appl. Chem.*, **70**, 993–1014.
8. Danzer, K. (2007). *Analytical Chemistry: Theoretical and Metrological Fundamentals*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
9. Otto, M. (2007). *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim.
10. Bro, R. (2003). «Multivariate calibration — What is in chemometrics for the analytical chemist?». *Anal. Chim. Acta*, **500**, 185–194.
11. Carey, W.P. and Kowalski, B.R. (1996). «Sensor and sensor array calibration», in *Handbook of Chemical and Biological Sensors* (eds R.S. Taylor and J.S. Schultz), Institute of Physics Publ., Bristol, pp. 287–347.
12. Gardner, J.W. and Bartlett, P.N. (1999). *Electronic Noses: Principles and Applications*, Oxford University Press, Oxford.
13. Pearce, T.C., Schiffman, S.S., Troy Nagle, H. *et al.* (eds) (2003). *Handbook of Machine Olfaction: Electronic Nose Technology*, Wiley-VCH, Weinheim.
14. Citterio, D. and Suzuki, K. (2008). «Smart taste sensors». *Anal. Chem.*, **80**, 3965–3972.
15. Zeravik, J., Hlavacek, A., Lacina, K. *et al.* (2009). «State of the art in the field of electronic and bioelectronic tongues—towards the analysis of wines». *Electroanalysis*, **21**, 2509–2520.
16. Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y. *et al.* (2000). «Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media». *Sens. Actuators B-Chem.*, **65**, 232–234.
17. Aishima, T. (1991). «Discrimination of liquor aromas by pattern-recognition analysis of responses from a gas sensor array». *Anal. Chim. Acta*, **243**, 293–300.
18. Brereton, R. G. (2009). *Chemometrics for pattern recognition*, Wiley, Chichester.
19. Zupan, J. and Gasteiger, J. (1999). *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, Wiley-VCH, Weinheim.
20. James, D., Scott, S.M., Ali, Z. *et al.* (2005). «Chemical sensors for electronic nose systems». *Microchim. Acta*, **149**, 1–17.
21. Hines, E.L., Llobet, E., and Gardner, J.W. (1999). «Electronic noses: a review of signal processing techniques». *IEE Proc.-Circuit Device Syst.*, **146**, 297–310.
22. Ružička, J. and Hansen, E.H. (1988). *Flow Injection Analysis*, Wiley, New York.
23. Trojanowicz, M. (2000). *Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications*, World Scientific, Singapore.
24. Ohno, K., Tachikawa, K., and Manz, A. (2008). «Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry». *Electrophoresis*, **29**, 4443–4453.
25. Ghallab, Y.H. and Badawy, W. (2010). *Lab-on-a-Chip: Techniques, Circuits, and Bio-medical Applications*, Artech House, Norwood, MA.
26. Li, P.C.H. (2010). *Fundamentals of Microfluidics and Lab on a Chip for Biological Analysis and Discovery*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
27. Korotcenkov, G. (ed.) (2011). *Chemical Sensors Applications*, Momentum Press, Highland Park, N.J.
28. Ramsay, G. (1998). *Commercial Biosensors: Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples*, J.Wiley, New York.

29. Lieberzeit, P.A. and Dickert, F.L. (2007). «Sensor technology and its application in environmental analysis». *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 237–247.
30. Badihi-Mossberg, M., Buchner, V., and Rishpon, J. (2007). «Electrochemical biosensors for pollutants in the environment». *Electroanalysis*, **19**, 2015–2028.
31. Wanekaya, A.K., Chen, W., and Mulchandani, A. (2008). «Recent biosensing developments in environmental security». *J. Environ. Monit.*, **10**, 703–712.
32. Trojanowicz, M. (2002). «Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors». *Electroanalysis*, **14**, 1311–1328.
33. Palchetti, I. and Mascini, M. (2008). «Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring». *Analyst*, **133**, 846–854.
34. Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J. *et al.* (2003) Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 3–13.
35. Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S. *et al.* (2009). «Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques». *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 661–667.
36. Varney, M.S. (2000). *Chemical Sensors in Oceanography*, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
37. Kroger, S. and Law, R.J. (2005). «Biosensors for marine applications — We all need the sea, but does the sea need biosensors?» *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1903–1913.
38. D’Orazio, P. (2003). «Biosensors in clinical chemistry». *Clin. Chim. Acta*, **334**, 41–69.
39. Vadgama, P. (2007). «Sensor biocompatibility: Final frontier in bioanalytical measurement». *Analyst*, **132**, 495–499.
40. Wang, J. (2001). «Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges». *Electroanalysis*, **13**, 983–988.
41. Wang, J. (2008). «Electrochemical glucose biosensors». *Chem. Rev.*, **108**, 814–825.
42. Cunningham, D.D. and Stenken, J.A. (eds) (2010). *In Vivo Glucose Sensing*, John Wiley and Sons, Hooken N.J.
43. Mascini, M. and Tombelli, S. (2008). «Biosensors for biomarkers in medical diagnostics». *Biomarkers*, **13**, 637–657.
44. Prodromidis, M.I. (2010). «Impedimetric immunosensors-A review». *Electrochim. Acta*, **55**, 4227–4233.
45. Mello, L.D. and Kubota, L.T. (2002). «Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries». *Food Chem.*, **77**, 237–256.
46. Venugopal, V. (2002). «Biosensors in fish production and quality control». *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 147–157.
47. Palchetti, I. and Mascini, M. (2008). «Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection». *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 455–471.
48. Sinfield, J.V., Fagerman, D., and Colic, O. (2010). «Evaluation of sensing technologies for on-the-go detection of macronutrients in cultivated soils». *Comput. Electron. Agric.*, **70**, 1–18.
49. Freitag, R. (ed.) (1996). *Biosensors in Analytical Biotechnology*, Academic Press, San Diego, Calif.
50. Mulchandani, A. and Bassi, A.S. (1995). «Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control». *Crit. Rev. Biotechnol.*, **15**, 105–124.

51. Smith, R.G., D'Souza, N., and Nicklin, S. (2008). «A review of biosensors and biologically-inspired systems for explosives detection». *Analyst*, **133**, 571–584.
52. Gooding, J.J. (2006). «Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends». *Anal. Chim. Acta*, **559**, 137–151.
53. Shah, J. and Wilkins, E. (2003). «Electrochemical biosensors for detection of biological warfare agents». *Electroanalysis*, **15**, 157–167.
54. Tok, J.B.H. (ed.) (2008). *Nano and Microsensors for Chemical and Biological Terrorism Surveillance*, RSC Publishing, Cambridge.
55. Janata, J. (1989). *Principles of Chemical Sensors*, Plenum Press, New York.
56. Janata, J. (2009). *Principles of Chemical Sensors*, Springer-Verlag US, Boston, MA.
57. Hall, E.A.H. (1990). *Biosensors*, Open University Press, Milton Keynes, England.
58. Scheller, F.W. and Schubert, F. (1992). *Biosensors*, Elsevier, Amsterdam.
59. Cunningham, A.J. (1998). *Introduction to Bioanalytical Sensors*, Wiley, New York.
60. Turner, A.P.F., Karube, I., and Wilson, G.S. (eds) (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford.
61. Edmonds, T.E. (ed.) (1988). *Chemical Sensors*, Blackie, Glasgow.
62. Göpel, W. (ed.) (1991). *Chemical and Biochemical Sensors*, vol. 1, 2, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
63. Taylor, R.F. and Schultz, J.S. (eds) (1996). *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, Institute of Physics Publ., Bristol.
64. Kress-Rogers, E. (ed.) (1997). *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
65. Gorton, L. (ed.) (2005). *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Elsevier, Amsterdam.
66. Knopf, G.K. and Bassi, A.S. (eds) (2007). *Smart Biosensor Technology*, CRC Press, Boca Raton.
67. Alegret, S. and MerkoSci, A. (eds) (2007). *Electrochemical Sensor Analysis*, Elsevier, Amsterdam.
68. Grimes, C.A., Dickey, E.C., and Pishko, M.V. (eds) (2006). *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, Calif.
69. Cass, A.E.G. (ed.) (1990). *Biosensors: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
70. Cooper, J.M. and Cass, A.E.G. (eds) (2004). *Biosensors: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York.
71. Rasooly, A. and Herold, K.E. (eds) (2009). *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols*, Humana Press, New York.
72. Eggins, B.R. (1996). *Biosensors: An Introduction*, J. Wiley, Chichester.
73. Eggins, B.R. (2002). *Chemical Sensors and Biosensors*, J. Wiley, Chichester.
74. Diamond, D. (ed.) (1998). *Principles of Chemical and Biological Sensors*, Wiley, New York.
75. Gründler, P. (2007). *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*, Springer-Verlag, Berlin.
76. Zourob, M. (ed.) (2010). *Recognition Receptors in Biosensors*, Springer, New York.

ГЛАВА 2

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПРОТЕИНОВ

Биосенсоры — это химические сенсоры, которые распознают целевые молекулы при помощи веществ биологического происхождения, включая протеины. Две категории протеинов особым образом относятся к биосенсорам, а именно ферменты и антитела.

Ферменты и антитела созданы природой для выполнения важных задач, основанных на специфическом взаимодействии с другими видами химических веществ. Такие соединения преимущественно могут быть использованы для наделения сенсоров на основе биологического материала свойством избирательности.

Эта глава дает краткий обзор структур и свойств протеинов, чтобы помочь пониманию их поведения в случае применения в сенсорах.

Молекулы протеинов — это полимеры, состоящие из последовательности остатков α -аминокислот. Такие молекулы показывают высокую степень организации, включая слабые и сильные взаимосвязи между различными областями вдоль молекулы, а также между отдельными молекулами.

2.1. Аминокислоты

α -аминокислоты имеют общую структуру, приведенную на рис. 2.1. Каждая молекула отображает атом водорода и карбоксильную группу, связанную с центральным атомом углерода. Аминокислоты отличаются друг от друга природой четвертой группы, причем R — боковая связь, свойственная этому атому углерода. Простейшая аминокислота — это глицин, в котором R является атомом водорода. В других аминокислотах R может быть алифатической группой (например $-\text{CH}_3$ в аланине), кислотной группой (например $-\text{CH}_2\text{COOH}$ в аспарагиновой кислоте), щелочной группой (например $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ в лизине), неионной полярной группой (например $-\text{CH}_2\text{OH}$ в серине, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ в аспарагине) или гидрофобной ароматической группой (в тирозине и триптофане). Определенная боковая связь создает в каждой аминокислоте специфичный размер и форму и вводит такие свойства, как гидрофобность или гидрофильность, кислотный или щелочной характер, положительный или отрицательный заряд, а также полярный характер боковой связи.

Исключая глицин, α -аминокислоты содержат асимметрично замещенный атом углерода и проявляют оптическую изомерию. Все естественные α -аминокислоты имеют L-структуру.

Так как каждая молекула аминокислоты содержит как минимум две группы, способных подвергаться реакции переноса протона, их состояние протонирования в растворе зависит от уровня pH раствора (рис. 2.1). Константа ионизации (pK_a)

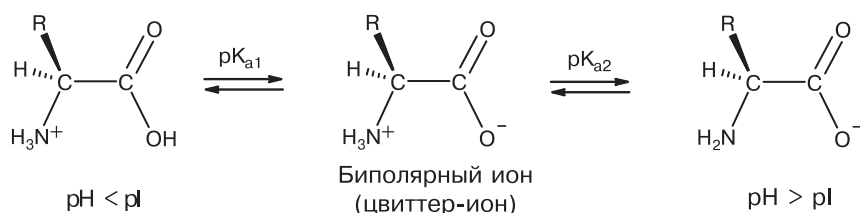


Рис. 2.1. α -аминокислота и ее равновесие протонирования

карбоксильной группы ($-\text{COOH}$) равна примерно 2, тогда как значение константы ионизации протонированной аминогруппы ($-\text{NH}_3^+$) численно находится между 9 и 10. Согласно индукционным электрическим эффектам константа ионизации зависит от некоторой протяженности структуры боковой цепочки. Как следствие равновесия протонирования/диссоциации при уровне $\text{pH} > 2$ карбоксил полностью ионизируется до $-\text{COO}^-$, в то время как аминогруппа полностью протонируется до $-\text{NH}_3^+$ при уровне $\text{pH} < 10$. В нейтральных растворах обе группы находятся в ионизированном состоянии и большинство молекул пребывают в форме гибридного иона (*цвиттер-ион*) с нулевым суммарным зарядом. Уровень pH , при котором все аминокислотные молекулы находятся в форме цвиттер-иона, называют *изоэлектрической точкой* (pI). Дополнительное равновесие протонирования наблюдается, если боковая цепочка содержит ионизируемые группы.

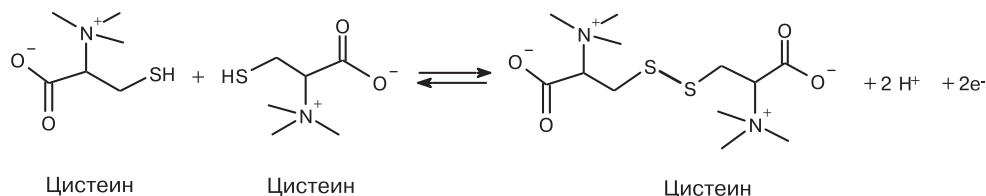


Рис. 2.2. Цистино-окислительная димеризация, приводящая к цистиновой молекуле (дисульфидный мост)

Аминокислота является элементом существенной важности в определении протеиновой структуры, которая является цистеином с $\text{R} = -\text{CH}_2-\text{SH}$ (рис. 2.2). Две молекулы цистеина могут образовать дисульфидную связь ($-\text{S}-\text{S}-$) посредством реакции окисления. Такая мостовая связь между остатками цистеина в основе протеина благоприятствует стабилизации трехмерной конфигурации молекулы протеина. В дополнение дисульфидный мостик может служить средством соединения макромолекулярных цепочек двух отдельных индивидуальных протеинов.

2.2. Химическая структура протеинов

Протеины образуются из аминокислот, используя информацию, зашифрованную в генах. У каждого протеина своя уникальная последовательность аминокислот, которая определяется последовательностью нуклеотидов уместных генов. Связь двух молекул аминокислот происходит через реакцию конденсации, как показано на рис. 2.3, и продукт, называемый *дипептидом*, образуется таким же образом, а в дальнейшем он может образовать связь с другой аминокислотой и сформировать трипептид.

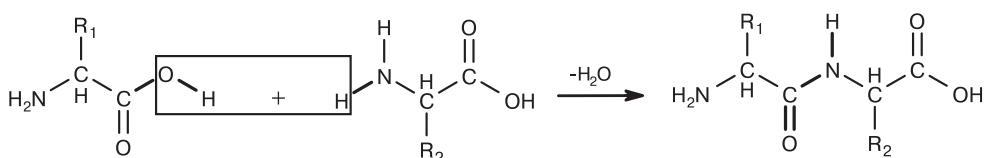


Рис. 2.3. Уплотнение двух молекул аминокислот, приводящее к дипептиду

Последовательность реакций, подобная показанной на рис. 2.3, ведет к формированию *полипептидов* (рис. 2.4, а). В полипептидах и протеинах отдельные аминокислотные остатки соединяются *пептидными связями* (т.е. группой $-\text{CO}-\text{NH}-$). В этих группах одиночная пара электронов атома азота делокализована, придавая связи $\text{C}-\text{N}$ характер частичной двойной связи (рис. 2.4, б). Это блокирует возможность ротации вокруг $\text{C}-\text{N}$ -связи и придает пептидной связи плоскую форму.

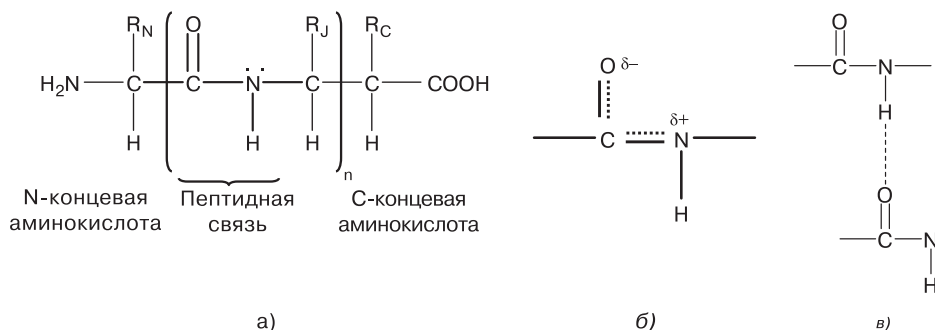


Рис. 2.4. а) Полимерная структура полипептида; б) резонансная структура пептидной связи; в) водородная связь между двумя пептидными связями

2.3. Структура макромолекул протеина

Молекулы протеина отличают несколько уровней организации. Первый уровень определяет просто последовательность аминокислот. Более высокие уровни организации придают протеину его характерную объемную форму в трех измерениях.

Первичная структура протеина создается однокоординатным распространением аминокислот вдоль полимерной цепи.

Решающим значением для протеиновой структуры является способность пептидных связей формировать водородные связи между ними, как показано на рис. 2.4, в. Водородные связи между пептидными связями содействуют в осуществлении процесса самоорганизации протеиновой цепочки, который формирует *вторичную структуру* протеина. Важнейшими конфигурациями этого типа являются α -спираль и β -слой.

Для формирования α -спирали полипептидная основа скручивается правовращательным витком, который позволяет боковым цепочкам располагаться на наружной части цепочки (рис. 2.5, а). Стабильность данной структуры поддерживается водородными связями между пептидными соединениями. Как правило, α -спираль представлена свернутой лентой (рис. 2.6), плоской полоской или трубкой. Один оборот α -спирали состоит из 3,6 аминокислот, которые располагают группу $-\text{C}=\text{O}$

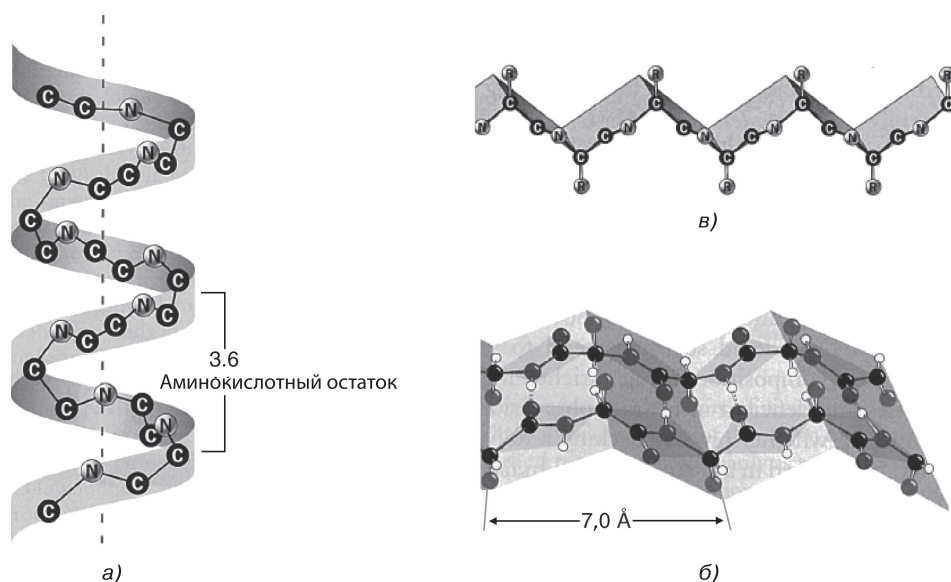
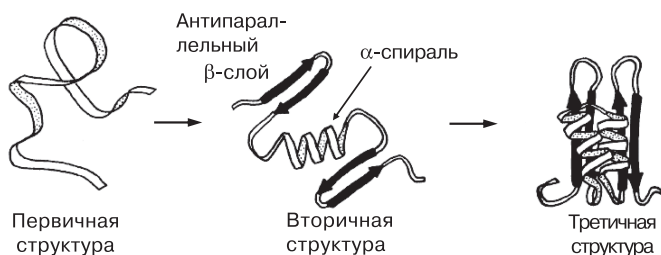


Рис. 2.5. Элементы вторичной структуры протеина: а) структура « α -спираль»; б) β -нить; в) β -слой. Использовано с разрешения [3]. Copyright 2010 Wiley, Hoboken

точно по линии с группой $-N-H$ следующих четырех аминокислот вдоль молекулы, что позволяет формироваться водородным связям.

β -нить (рис. 2.5, б) является последовательностью аминокислот, чьи пептидные боковые связи почти полностью вытянуты. Они, как правило, представлены стрелкой, указывающей в сторону C-окончания молекулы (рис. 2.6). Совокупность таких нитей, присоединенных водородными связями друг к другу, формирует β -слой (рис. 2.5, в). Два или более пограничных β -слоев имеют возможность группироваться в антипараллельной, параллельной или смешанной форме. β -слой проявляет явную склонность к закручиванию и сгибам, отсюда происходит отклонение от идеально параллельной организации как таковой, показанной на рис. 2.5, в. Благодаря эластичности водородных связей скручивание цепей и изгибы нисколько не препятствуют образованию β -слоев из β -нитей.

Рис. 2.6. Сворачивание полипептидной ленты, иллюстрирующее пошаговую самоорганизацию протеина от первичной до вторичной к третичной структуре. Вторичная структура стабилизирована водородными связями между атомами N и O в пептидных связях. Третичная структура стабилизирована химическими связями, вовлекающими боковые цепи. Опубликовано с разрешения [2]. Copyright 2000 John Wiley & Sons, Inc.



Дополнительные взаимодействия отдаленных областей полипептида побуждают элементы вторичной структуры присоединяться самостоятельно в определенном порядке, который представляет собой *третичную структуру* протеина (рис. 2.6). Такая структура может стабилизироваться дисульфидными мостиками и нековалентными связями, включающими функциональные возможности боковых цепочек. Нековалентная химическая связность в протеинах обсуждается в разделе 2.4.

В третичной структуре соединение между организованными областями осуществляется посредством неорганизованных частей цепочки (петлями) или небольшими поворотами, стабилизированными нековалентными связями.

Пример третичной структуры протеина с типичными элементами вторичной структуры показан на рис. 2.7, а. Этот частный вид протеина также включает в себя небольшие непротеиновые вещества (дигидрофолат и NADP^+), присоединенные нековалентными связями.

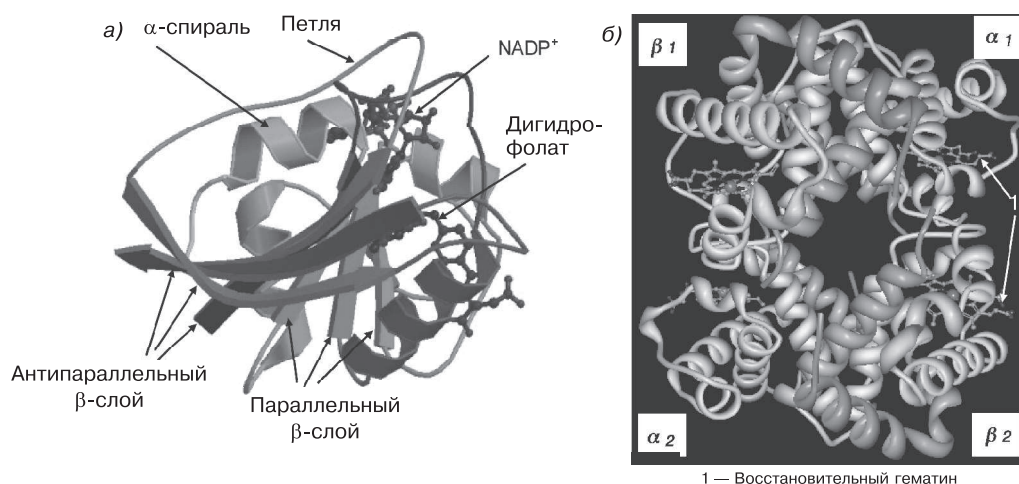


Рис. 2.7. а) Третичные структуры кишечной палочки фермента дигидрофолатредуктазы в качестве третичной структуры с основой (дигидрофолат) и коферментом NADP^+ . Взято из <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DRE>. б) Четвертичная структура гемоглобина. Также показаны группы гемо-железа. Взято из <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1A3N>. Последний доступ: 15.05.2012

Некоторые молекулы протеина состоят из двух или более полипептидных цепочек, связанных нековалентными связями, а иногда дисульфидными мостиками. Части определенных пептидов также могут попасть во внутримолекулярный состав β -слоев. Принятая таким соединением формация молекул полипептидов образует *четвертичную структуру протеина*.

В качестве примера рис. 2.8 отображает четвертичную структуру гемоглобина — тетрамер, состоящий из четырех отчетливых цепочек: двух схожих α -цепочек и двух похожих β -цепочек.

Множество протеинов встречаются в смешанных с полисахаридами (гликопротеины) или жирами (липопротеины) состояниях.

2.4. Нековалентные химические связи в молекулах протеина

На рис. 2.8 объединены главные виды нековалентных связей, которые определяют соединение макромолекул протеина [4]. К ним относятся водородные связи (*а*), ионные связи (*б*) и гидрофобные взаимодействия сил Ван-дер-Ваальса (*в*), причем последние характерны для электромагнитного взаимодействия, возникающего в результате колебаний распространения заряда в пределах атома. В отличие от ковалентных связей приведенные нековалентные связи не имеют определенной длины и силы.

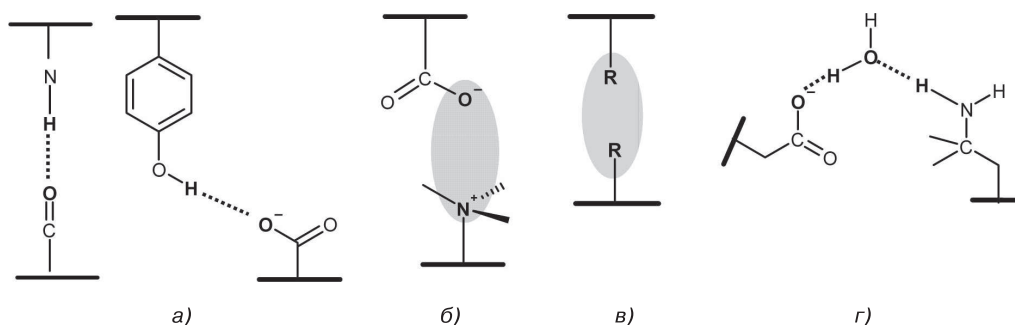


Рис. 2.8. Примеры нековалентных связей с включением боковых цепочек: *а*) водородная связь; *б*) ионная связь (соляной мостик); *в*) гидрофобная связь (*R* — гидрофобные боковые цепочки); *г*) водяной мостик с водородной связью между карбоксильной и аминной группой. Толстые линии представляют собой основы протеина

Главную роль в образовании ферментов также играет вода. Она может стабилизировать некоторые структуры посредством образования водородных связей, которые соединяют две различных области (рис. 2.8, *г*). Более того, связь воды с полярными и ионными группами вызывает сольватацию протеинов и ведет к растворимости протеинов в воде, когда такие группы достигают внешней поверхности молекулы.

Некоторые ионы металла также могут создавать специфические протеиновые структуры (рис. 2.9) посредством взаимодействия с боковыми цепочками. Таким образом, щелочные и щелочноземельные ионы связываются электростатическими силами, вовлекая анионы (такие как карбоксилат в аспарагиновой кислоте) и отрицательные окончания диполей (такие как $\text{C}=\text{O}$ в аспарагине и $=\text{NH}$ в аргинине, рис. 2.9, *а*). Так как электростатические взаимодействия не ориентированы пространственно, формирование электростатических связей сталкивается с небольшим количеством ограничений, поскольку направление и протяженность ограничены. Длина и сила таких связей может изменяться в широком диапазоне.

Ионы переходных металлов формируют координационные связи, которые специально строго пространственно ориентированы в соответствии с молекулярными орбиталями (рис. 2.9, *б*). К тому же протяженность и сила координационных связей ограничены законами квантовой механики. Поэтому ионы переходных металлов образуют жесткую структуру.

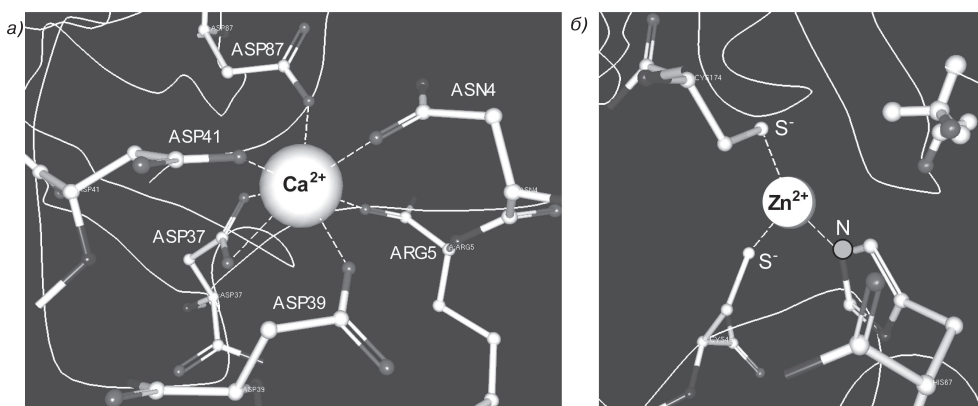


Рис. 2.9. Связь ионов металла в протеинах: а) ион кальция поддерживается электростатическими связями в кальдереине 23. Взято из <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2WBX>. б) Zn^{2+} в алкогольной дегидрогеназе. Координация металла выполняется двумя атомами серы из остатков цистеина и азотом из имидазольного кольца в остатке гистидина. Кривые линии отображают основу протеина. Взято из <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1SBY>. Последнее посещение: 15.05.2012

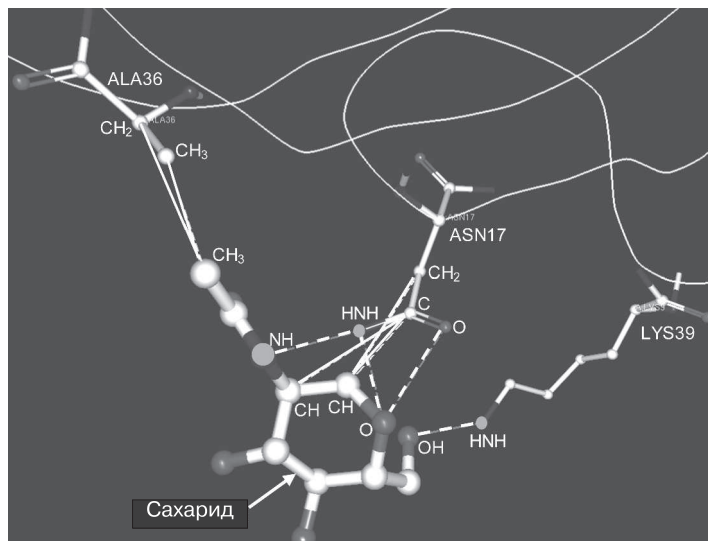
2.5. Протеины в процессах распознавания

В живых организмах множество протеинов выполняют функцию *рецепторов*, связываясь с определенным *лигандом* в целях формирования соединения, называемого *комплексом* (не путать с координационными соединениями ионов металла). Соединение в таком комплексе происходит нековалентными связями, которые обеспечивают стабильность благодаря их большому количеству. Пример третичного комплекса показан на рис. 2.7, а, в котором протеин соединен с двумя непротеинами для формирования третичного комплекса. Детали связи в комплексе маленькой молекулы сахара с авидином показаны на рис. 2.10. Полученный в результате комплекс стабилизируется гидрофобными и водородными связями. Высокая специфичность образования таких комплексов обусловлена химической и пространственной комплементарностью задействованных молекул. Однако идеальное пространственное соответствие не всегда основополагающе, так как рецепторная область часто может подвергнуться формационной реорганизации при взаимодействии с лигандом.

Особое отношение к применению в биосенсорах имеют ферменты и антитела. Ферменты действуют как катализатор в биохимических реакциях. Первым шагом в ферментной реакции является специфичное соединение лиганда с активной поверхностью фермента. Как только комплекс сформировался, лиганд подвергается химической реакции. Продукты реакции покидают область рецептора и оставляют ее свободной для дальнейшего взаимодействия со следующей молекулой лиганда. Такой каталитический цикл повторяется, пока лиганд доступен. Комплекс, подвергающийся каталитической перегруппировке под воздействием фермента, называют *ферментным субстратом* (коротко *субстратом*). Очевидно, что взаимодействия системы фермент–субстрат не находятся в равновесии, но все же они подчиняются законам химической кинетики. Когда в биосенсоре используют фермент как

распознающий элемент, всякое физическое или химическое последствие реакции теоретически может быть использовано для контроля протекания реакции и в качестве эффекта преобразования.

Рис. 2.10. Соединение сахара (2-(ацетиламино)-2-деокси- α -D-глюкопираноза) с авидином. Сплошные прямые линии: гидрофобные связи; пунктирная линия: водородные связи. Взято из: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2AVI>. Последний доступ: 15.05.2012



Антитела являются протеинами, производящимися иммунной системой организма для его защиты от потенциально вредоносных веществ, называемых антигенами. Антитело селективно связывает антиген нековалентными связями. Взаимодействие такого рода завершается в химическом равновесии, и, следовательно, стабильность этого комплекса может быть описана терминами термодинамических функций. В биосенсорах антитела могут быть использованы в качестве рецептора лиганда, который является аналитом. Альтернативно антиген возможно применить для определения присутствия антител. Физические явления (такие как изменение массы) или сигнальные метки (например люминесцентные отметки, прикрепленные к одному из реактивов) позволяют обнаружить комплекс в целях создания сигнала преобразования.

2.6. Перспективный обзор

Аминокислоты могут формировать посредством реакций конденсации полимеры, называемые протеинами. Молекула протеина состоит из линейной последовательности аминокислот, соединенных друг с другом с помощью пептидных связей, со свободной аминогруппой на одном конце молекулы и с карбоксильной группой на другом. Последовательность аминокислот, осаждающаяся в протеине, определяется генетическим кодом организма. Эта последовательность формирует первичную структуру молекулы протеина. Водородные связи между группами $-NH$ и $-C=O$ в основе стабилизируют частные формирования, такие как α -спирали и β -слои, которые представляют собой следующий уровень организации, называемый вторичной структурой. Дальнейшая организация протеина включает пространственное

расположение этих элементов вторичной структуры, которые формируют третичную структуру протеина и являются результатом образования химических связей с использованием боковых цепочек. Некоторые молекулы протеина являются результатом реакции нескольких определенных цепочек полипептидов, которые возникают за счет нековалентных связей, а иногда за счет формирования дисульфидных мостиков. Эту окончательную организацию называют четвертичной структурой.

Всесторонняя информация о структуре протеина доступна в специализированных базах данных, таких как Protein Data Bank на сайте <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>. Каждая структура в этой базе данных идентифицируется четырехзначным индексом (например 2AVI для протеина по рис. 2.10).

Первичная структура основывается на стабильных ковалентных связях. В противоположность этому более высокие уровни организации преимущественно основаны на нековалентных связях, которые подвержены изменениям под воздействием различных факторов, таких как уровень pH, ионная сила, температура, состав раствора. Отклонения в более высоких уровнях структуры приводят к *денатурализации* протеинов, которая, в свою очередь, вызывает утрату природных свойств самого протеина. Ввиду данного обстоятельства протеин считается относительно чувствительным веществом при использовании в искусственных средах. В зависимости от обстоятельств денатурализация может являться обратимым или необратимым процессом.

Применение протеинов в биосенсорах зависит от свойств некоторых молекул такого типа в целях присоединения определенного лиганда несколькими нековалентными связями для получения комплекса. Любые физические или химические последствия формирования комплекса могут быть использованы в целях преобразования.

Вопросы и упражнения

1. Что такое обобщенная структура α -аминокислоты? Дайте обзор общих свойств аминокислот. Прокомментируйте частные характеристики некоторых аминокислот и объясните причину их особого поведения.
2. Используйте интернет-ресурсы и подготовьте список протеиногенных α -аминокислот, сгруппированных согласно их характеристикам относительно боковых цепочек.
3. Напишите химическую формулу пептида, состоящего из последовательности глицина, цистеина и лизина, и еще одну для пептида, состоящего из аспарагина, глицина, аспарагиновой кислоты и цистеина. Возможно ли соединить упомянутые выше пептиды ковалентной связью?
4. Почему протеин подвергается денатурализации, если уровень pH отклоняется от естественного значения?
5. Что может произойти, если водный раствор протеина смешать с неводным растворителем?
6. Водорастворимый протеин может быть осажден инертной солью (такой как сульфат аммония) благодаря эффекту высаливания. Каковы изменения на молекулярном уровне, приводящие к изменению растворимости?
7. Присутствует ли взаимодействие системы рецептор–лиганд на рис. 2.7, а? Что является рецептором, а что лигандами?

8. Зайдите на веб-сайт Protein Data Bank, откройте файлы структуры комплексов, изображенных на рис. 2.9 и 2.10, и проверьте внутриатомные расстояния. Найдите взаимозависимость между природой химической связи и ее протяженностью.
9. Найдите структуру PDB ID: 2WDO в базе данных Protein Data Bank и изучите связь глицерола и Mg^{2+} в этой молекуле протеина.
10. Откройте структуру PDB ID: 1E9Z (фермент уреазы) в базе данных Protein Data Bank и скачайте структуру комплекса Ni(II) с помощью меню лиганда химического компонента. Прокомментируйте связь ионов никеля в этом ферменте.

Литература

1. Whitford, D. (2005). *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, Chichester.
2. Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, New York.
3. Karp, G. (2010). *Cell Biology*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
4. Chang, R. and Chang, R. (2004). Intermolecular forces, in *Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences*, University Science Books, Sausalito, Calif, pp. 669–700.

ГЛАВА 3

ФЕРМЕНТЫ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СЕНСОРЫ

3.1. Общие положения

Ферменты — это сложные составные протеины, которые специфически структурированы для связывания и воздействия на *субстрат* (молекулу реагента), чтобы преобразовать его посредством каталитического механизма, то есть снижением энергии активации реакции, без воздействия на химическое равновесие [1–4].

Реакции, катализируемые ферментами, основываются на формировании промежуточного включения субстрата для установления совпадения как формы, так и его структуры с активным центром фермента (рис. 3.1). В результирующем комплексе преобразование субстрата обеспечивается различными способами. Соответственно, взаимодействие системы фермент–субстрат может быть причиной ослабления ключевой химической связи в субстрате и склонности к дальнейшему изменению. Более того, фермент может предоставлять благоприятные условия для стабилизации промежуточной реакции и предотвращения обратного преобразования в исходную форму. Когда задействовано более одного реактива, фермент посредством специфических химических связей может собрать их всех в состоянии, стимулирующем дальнейшее протекание реакции. В некоторых случаях активный центр фермента может взаимно перемещать частицы, такие как электроны или ионы водорода, необходимые для реакции. Несмотря на то, что на рис. 3.1 показана реакция с одним субстратом, многие ферментативные реакции включают два или более реагентов (*косубстраты*).

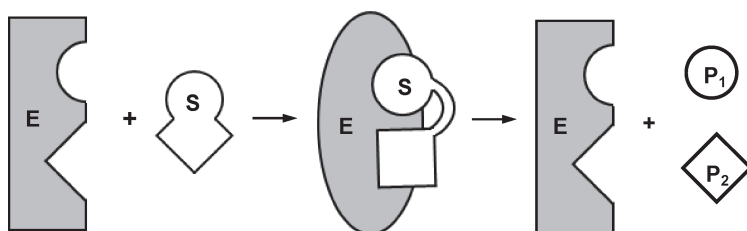


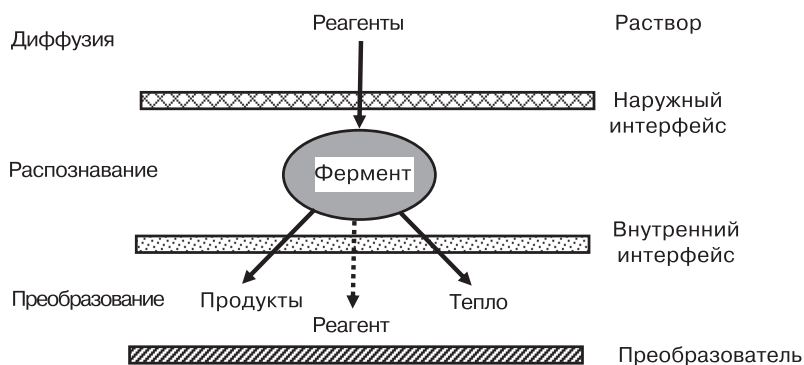
Рис. 3.1. Механизм ферментативно-каталитической конверсии субстрата. *E* — фермент, *S* — субстрат, *P*₁ и *P*₂ — продукты. Переходная фаза является фермент-субстратным комплексом

Ферментативные методы широко используются в биоаналитической химии для определения самого фермента или его субстрата [5]. С этой целью либо скорость реакции, либо концентрация реагента или продукта оцениваются с помощью подходящего аналитического метода.

В расширение сказанного следует отметить, что применение ферментов в проектировании биосенсоров зависит от избирательности системы субстрат–аналит, которая не может быть обнаружена прямым путем. Поэтому, для того чтобы создать

ферментативный сенсор, фермент должен быть иммобилизован как часть распознающего слоя на поверхности соответствующего преобразователя таким образом, чтобы измерить концентрацию обнаруживаемых веществ (рис. 3.2). Субстрат и любые дополнительные реагенты переносятся прежде всего диффузией из раствора выборки в распознающий слой, где происходят ферментативные реакции. Преобразователь позволяет осуществлять наблюдение за ходом реакции, обнаруживая либо продукт, либо остаточный реагент, который избежал ферментативной реакции. В дополнение, кроме чисто физических эффектов (например выделение тепла), для наблюдения за скоростью ферментативной реакции пригодна (косвенно) концентрация субстрата. Обладающие селективной проницаемостью мембраны часто включаются в конструкцию интерфейсов в целях наблюдения за распространением определенных реагентов. Кроме того, соответствующие внешние мембраны могут препятствовать диффузии некоторых интерферентных соединений из выборки к элементу распознавания.

Рис. 3.2. Типичная структура ферментативного биосенсора



Как и отдельные ферменты, так и ферменты, содержащиеся в живых объектах (например микроорганизмах или живых тканях), могут быть использованы непосредственно в целях выполнения распознавания аналита и преобразования (см. главу 23). Биосенсоры на основе ферментов, либо изолированных, либо заключенных в живые материалы, часто называют *сенсорами метаболизма*.

Более того, ферментный ингибитор может быть определен по эффекту замедления скорости преобразования субстрата. В дальнейшем фермент может действовать как метка преобразования, если он присоединен к невыявляемому веществу. По своему действию на соответствующий субстрат обнаруживаемый продукт формируется так, что позволяет косвенно выявить целевое соединение. В большом множестве веществ с присутствием ничтожного количества фермента-метки возможно чрезвычайно чувствительное обнаружение.

В течение долгого времени доступность ферментов была ограничена в связи с их производством живыми естественными организмами. В последнее время генная инженерия дала возможность расширить круг источников ферментов и создать новые, которые в состоянии удовлетворять специфическим требованиям.

3.2. Номенклатура и классификация ферментов

Названия множества ферментов образованы с добавлением суффикса «-аза» к наименованию вещества. Так, уреазы катализируют гидролиз мочевины в аммиак и

двуокись углерода, в то время как фосфатаза катализирует гидролиз фосфатного эфира. Однако для того чтобы избежать путаницы, ферменты делятся на шесть основных классов и ряд подклассов в зависимости от вида катализируемой реакции (табл. 3.1). В то же время правила для однозначной идентификации каждого фермента были рекомендованы Комитетом по номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии [6].

Таблица 3.1. Классы ферментов

Класс фермента	Катализируемая реакция	Систематическое название	Рекомендуемое название
1. Оксидоредуктазы Дегидрогеназы Оксидазы (O_2 — акцептор электронов)	Передача электронов (окисление/восстановление) Двухсубстратные реакции	Донор: акцептор оксидоредуктаза	Донор дегидрогеназа Донор оксидаза (только если O_2 — акцептор)
2. Трансферазы	Перенос атома или группы (X) между двумя молекулами: $AX+B \rightarrow A+BX$ Двухсубстратные реакции	Донор: трансфераза акцепторной группы	Субстрат + суффикс <i>-аза</i>
3. Гидролазы	Гидролизные реакции: $AB+H_2O \rightarrow A-OH+BH$ Двухсубстратные реакции; один из субстратов — вода	Субстрат X-гидролаза (X — группа, удаляемая гидролизом)	Акцептор (или донор) группы трансфераза
4. Лиазы	Негидролитический разрыв связи Односубстратные реакции (разрушение связи) Двухсубстратные реакции (формирование связи)	Субстрат группы лиаза	Реакция + суффикс <i>-аза</i> (например дегидратаза)
5. Изомеразы	Реакции изомеризации Односубстратные реакции	Тип реакции + суффикс <i>-аза</i> (например рацемаза)	
6. Лигаза	Реакции формирования связей Двухсубстратные реакции (АТФ ^а как косубстрат)	А:В лигаза (А и В указывают субстраты)	

^аАТФ обозначает аденозин трифосфат.

В соответствии с этой систематической номенклатурой каждому ферменту приписывают *рекомендуемое название*, подходящее для общего использования, *систематическое название*, которое обозначает катализируемую реакцию, и четырехзначный классификационный номер (предшествующий сокращению ЕС, что означает Enzyme Commission — комиссия по ферментам). Например, глюкозооксидаза (которая катализирует окисление глюкозы кислородом) обозначается ЕС 1.1.3.4 и имеет систематическое название β -D-глюкоза: кислород 1-оксидоредуктаза (см. схему на рис. 3.3).

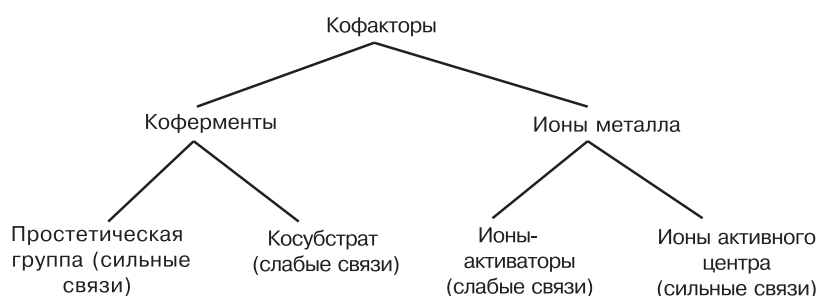
Основной класс:	Оксидоредуктаза	1
Подкласс:	Воздействует на группу $-CHON$	1
Под-подкласс:	O_2 как акцептор электронов.....	3
Систематическое название:	β -D-глюкоза- O_2 -1-оксидоредуктаза	4

Рис. 3.3. Присвоение классификационного номера ферменту глюкозы оксидазы (ЕС 1.1.3.4)

3.3. Компоненты и кофакторы ферментов

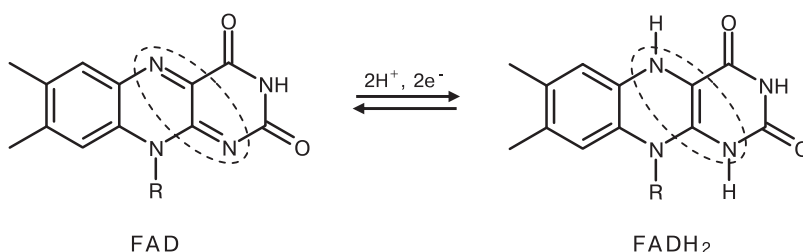
Несмотря на то, что ферменты являются веществами белкового типа, многие из них нуждаются в небелковых *кофакторах*, для того чтобы выполнять биологическое предназначение (рис. 3.4). Кофактором может быть органическая молекула, действующая в качестве кофермента. Некоторые коферменты тесно связаны с белковой структурой как *простетическая группа*. Если кофактор удаляется, оставшееся вещество называется *апоферментом*, в то время как весь фермент называется *холоферментом*. В других случаях кофактор является независимым веществом (*ко-субстрат*), которое временно связано с ферментом для того, чтобы принять участие в каталитическом процессе. Посредством свободной диффузии коферменты вносят вклад в перенос электронов, атомов или групп атомов между молекулами.

Рис. 3.4. Различные кофакторы и их взаимодействие с протеинами



Самыми простыми кофакторами являются ионы металлов, прикрепленные к боковым цепям протеина координационными или электростатическими связями. Таким образом, ион металла – *активатор* обязывает активный центр принять благоприятную конфигурацию или может быть вовлечен в связывание субстрата с активным центром. В некоторых случаях ион переходного металла действует как конвейер электронов. Сильно связанные ионы металла (например никель в уреазе) являются структурными составляющими активного центра фермента.

Рис. 3.5. Окислительно-восстановительная реакция активной части FAD. R обозначает остальную часть FAD/FADH₂



Примером сильно связанного кофактора является флавинадениндинуклеотид (FAD), который происходит из простетической группы различных ферментов. Он переносит электроны и ионы водорода между ферментом и субстратом, подвергаясь окислительно-восстановительной реакции аналогично изображенной на рис. 3.5. Электрохимическое окисление FADH₂ формы (полувосстановленная форма флавинадениндинуклеотида) может быть основой для электрохимического преобразования в некоторых биосенсорах. Однако так как FAD-центр окружен остовом проте-

ина, прямой перенос электронов может быть достигнут только тогда, когда используются электроды, состоящие из особых материалов. Кроме того, перенос может быть выполнен путем определения окислительно-восстановительного посредника, который переносит электроны между FADH_2 -центром и металлическим или графитовым электродом.

Примером кофермента является никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), который состоит из двух нуклеотидов, связанных двумя фосфатными группами, с никотинамидом, прикрепленным к одному концу и аденином в другом конце. Он может подвергаться окислительно-восстановительной реакции, как показано на рис. 3.6, и выступать в качестве переносчика электронов и протонов в реакциях, катализируемых некоторыми оксидоредуктазами. В амперометрическом ферментативном сенсоре акцепторно-донорную роль в реакции выполняет электрон подобно тому, как это показано на рис. 3.6, считаясь электродом в соответствующей электрохимической ячейке. При таких обстоятельствах пара NAD^+/NADH выступает в качестве электронного переносчика между субстратом и электродом, что приводит к увеличению тока ответного сигнала.

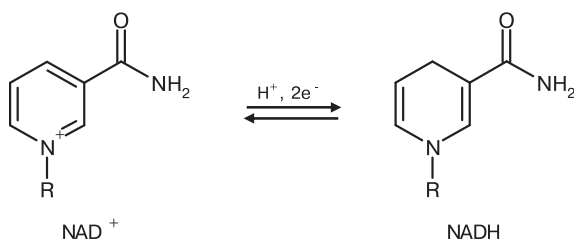


Рис. 3.6. Окислительно-восстановительная реакция амидадениндинуклеотида. Показанное реагирующее вещество — никотинамид; R обозначает остальную часть молекулы кофермента

Никотинамидадениндинуклеотид фосфата ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), который является производным фосфорилированных NAD/NADH , выполняет аналогичные функции в различных катализируемых ферментами реакциях.

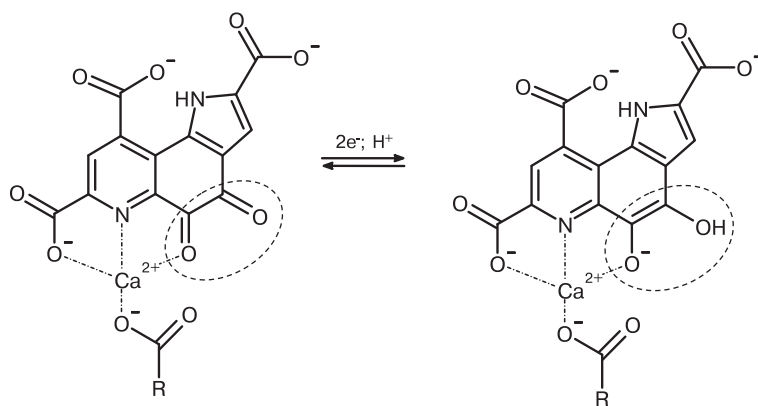


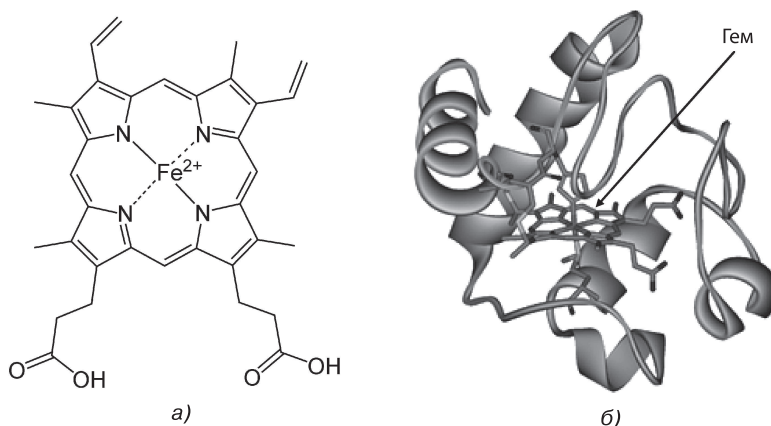
Рис. 3.7. Кофактор пирролохинолинхинон (PQQ). R обозначает остаток протеина

Кофактор *пирролохинолинхинон* (PQQ, рис. 3.7) встречается в некоторых бактериальных ферментах и играет роль, аналогичную NAD^+ . Этот кофактор присоединен к протеину карбоксилата с помощью иона кальция, который, кроме того,

позволяет осуществлять временное связывание субстрата (например алкоголя) в активном центре.

Общая простетическая группа в некоторых оксидоредуктазах имеет тип гема (рис. 3.8). Она состоит из атома железа, расположенного в центре большого гетероциклического кольца порфирина. Поскольку атом железа может колебаться между несколькими стадиями окисления, он выступает в качестве донора/акцептора в окислительно-восстановительных реакциях.

Рис. 3.8. а) Гем В, типичная группа гема; б) цитохром с, гемопrotein. Взято из <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HRC>. Последний доступ 16.05.2012



Приведенный выше анализ был ограничен несколькими кофакторами, которые имеют широкое применение в ферментативных биосенсорах. Многие другие кофакторы встречаются в живых организмах

3.4. Некоторые ферменты, имеющие отношение к биосенсорам

Среди огромного количества ферментов, которые встречаются в живых организмах, некоторые оказались полезными для биоаналитических целей, а также для разработки ферментативных биосенсоров. Следующий раздел содержит краткий обзор ферментов особого значения с этой точки зрения. Всесторонний анализ применения ферментов для разработки и производства биосенсоров доступен в работе [7].

3.4.1. Оксидазы

FAD-оксидазы используют молекулярный кислород в качестве акцептора электронов и ионов водорода в каталитическом цикле. Типичный пример представляет собой окисление глюкозы, катализируемое глюкозооксидазой с помощью простетической FAD-группы как потока электронов и ионов водорода (рис. 3.9). Оксидаза глюкозы из *Aspergillus Niger* (черная плесень) широко используется в биоаналитической химии, а также в качестве аналитического реагента или в качестве распознающего материала в глюкозных биосенсорах [8–12]. Поэтому глюкоза представляет собой соединение большой аналитической значимости в наблюдении за больными сахарным диабетом, а также в пищевой промышленности. Кроме того, относительно низкая

цена и хорошая стабильность делает глюкозные/глюкозооксидазные системы достаточно подходящей моделью для создания научных методов разработки биосенсоров.

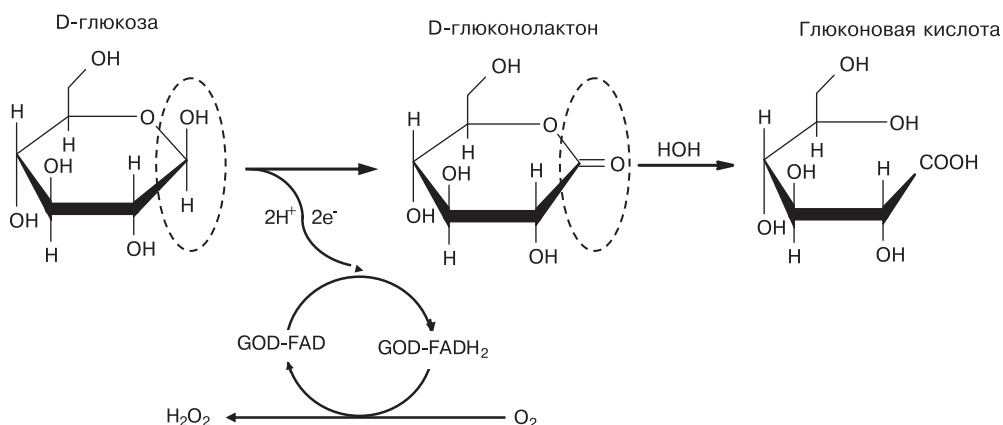


Рис. 3.9. Окисление глюкозы катализируется оксидазой глюкозы (GOD). Соответственно FAD и FADH₂ являются окисдованными и восстановленными формами простетической группы. Глюкоза окисляется посредством передачи электронов и ионов водорода окисленной форме простетической группы (FAD), которая восстанавливается до FADH₂ с молекулярным водородом. При этой реакции перекись водорода образуется как побочный продукт

Другие FAD-зависимые оксидазы с широким применением в сенсорной науке объединены в табл. 3.2. Последний фермент в этой таблице (лактат оксидаза) основывается на флавиномононуклеотиде простетической группы (FMD). Флавиноксидазы используют кислород в качестве косубстрата и являются источником перекиси водорода. Наблюдение за одним из перечисленных выше соединений является основным методом преобразования для сенсоров на основе FAD-оксидазы. Кислород, однако, может быть заменен искусственным акцептором электронов, позволяя осуществлять независимую от кислорода работу. Как показано в табл. 3.2, некоторые флавоферменты оксидаз служат источником неорганических газов, таких как аммиак или диоксид углерода. Наблюдение за такими газами или продуктами их гидролиза (для например, для NH_4^+ или H^+) представляет собой еще одну удобную стратегию преобразования.

Таблица 3.2. Некоторые оксидазы флавоферментов и их применение в биосенсорах. Систематические наименования приведены в скобках

Фермент	Реакция	Применение
Глюкооксидаза (β -D-глюкоза:кислород 1-оксиредуктаза) ЕС 1.1.3.4	рис. 3.9	Клиническое; пищевая про- мышленность
Галактозоксидаза (D-галактоза: кислород 6-оксидоредуктаза) ЕС 1.1.3.9	D-галактоза + $\text{O}_2 \rightarrow$ D-галакто- гексодиальдоза + H_2O	Пищевая про- мышленность
Холестеролоксидаза (Холестерол: кислород оксидоредуктаза) ЕС 1.1.3.6	Холестерол + $\text{O}_2 \rightarrow$ Холест- 4-ен-3-он + H_2O_2	Клиническое

Таблица 3.2 (окончание)

Фермент	Реакция	Применение
Моноаминоксидаза (амин:кислород оксидоредуктаза (дезаминирование)) ЕС 1.4.3.4	$\text{RCH}_2\text{NHR} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RCHO} + \text{R}'\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Клиническое; пищевая промышленность
Оксидаза L-аминокислоты (L-аминокислота: кислород оксидоредуктаза (дезаминирование)) ЕС 1.4.3.3	$\text{L-аминокислота} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{2-оксокислота} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$	Клиническое
Лактатоксидаза ((S)-лактат:кислород 2-оксидоредуктаза (декарбоксилирование)) ЕС 1.13.12.4	$\text{Лактат} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ацетат} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Клиническое; пищевая промышленность

Серия *медьсодержащих оксидаз* (табл. 3.3) также широко используется в биосенсорах для биологически активных соединений или фенольных загрязняющих веществ [13, 14]. Продукт окисления фенола является восстанавливаемым хиноном, который может контролироваться посредством электрохимической реакции. Медьсодержащие ферменты могут выполнять прямую передачу электронов на электрод, который может обеспечить электрохимический метод преобразования [15]. Лакказы, которая катализирует окисление бензолдиола, используется в сенсорах для контроля загрязнения окружающей среды [16].

Таблица 3.3. Медьсодержащие оксидазы, применяемые в биосенсорах

Фермент	Реакция	Применение
L-аскорбатоксидаза (L-аскорбат:кислород оксидоредуктаза) ЕС 1.10.3.3	$\text{L-аскорбат} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{дегидроаскорбат} + \text{H}_2\text{O}$	Пищевая промышленность
Тирозиназа (монофенол, L-допа:кислород оксидоредуктаза) ЕС 1.14.18.1	$\text{L-тирозин} + \text{L-допа} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-допа} + \text{допахинон} + \text{H}_2\text{O}$	Клиническое; окружающая среда
Катехол оксидаза (1,2-бензолдиол:кислород оксидоредуктаза) ЕС 1.10.3.1	$\text{Катехол} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{(1,2-бензохинон)} + \text{H}_2\text{O}$	Клиническое; окружающая среда
Лакказа (бензолдиол:кислород оксидоредуктаза) ЕС 1.10.3.2	$4 \text{ (бензолдиол)} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ (бензосемихинон)} + \text{H}_2\text{O}$	Окружающая среда

Другой класс оксидаз представлен *пероксидазами*, которые могут передавать электроны в перекись водорода (или небольшим органическим пероксидам) от электронных доноров. Простетическая группа во многих пероксидазах имеет тип гема (рис. 3.8). Наиболее распространенным представителем этого класса является *пероксидаза хрена* (HRP), которая может принимать электроны практически из любого восстановителя, например ферроцианида, фенола, гидрохинона, орто- и парафенилендиамина, аскорбиновой кислоты, йодида или ферроцена. Механизм

взаимодействия на катализируемую пероксидазой реакцию может быть описан следующими шагами [17]:



На первом шаге простетическая группа гемина в ферменте подвергается двух-электронному окислению с помощью перекиси водорода или органических гидроперекисей. Эта реакция приводит к образованию соединения-1 (степень окисления +5), состоящего из иона оксиферрилла ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$) и радикала катиона π -порфирина. В следующей реакции соединение-1 принимает один электрон от молекулы донора субстрата АН_2 и образует соединение-2 (степень окисления +4). На третьем этапе соединение-2 проходит дополнительную одноэлектронную восстановительную реакцию со второй молекулой АН_2 , в результате чего фермент восстанавливается в свое собственное состояние. Таким образом, общая реакция выглядит так:



где R и R' представляют собой органические остатки или атомы водорода.

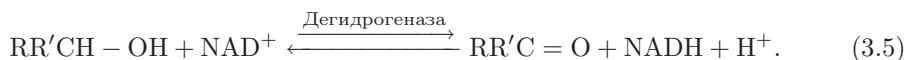
Конечный продукт зависит от природы субстрата. Органические доноры электронов, такие как ароматические амины и фенольные соединения, окисляются до свободных радикалов, АН^* . Неорганические вещества, подобные гексацианоферрату (II), просто окисляются, извлекая один электрон.

Реакции (3.1) и (3.2) могут также протекать как электрохимические (в которых ячейка катода действует в качестве электронного донора), либо путем прямого переноса электронов, либо с помощью окислительно-восстановительных посредников. В обоих случаях электролитический ток взаимосвязан с концентрацией пероксида в растворе.

Пероксидазные сенсоры могут быть использованы для определения либо пероксида, или вещества-донора электронов, а также ингибиторов, таких как CN^- и F^- . Пероксидазы также широко используются в качестве метки преобразования в аффинных сенсорах.

3.4.2. Дегидрогеназы

Дегидрогеназа выполняет перенос гидрид-иона (H^-) между субстратом, содержащим группу $-\text{CHOH}$ и соответствующим кофактором [18]. Такая реакция эквивалентна передаче одного протона и двух электронов. Таким образом, $\text{NAD}^{+/-}$ (или $\text{NADP}^{+/-}$) зависимые гидрогеназы преобразуют алкоголь в карбонильное соединение, как следует из реакции



Более 250 ферментов относятся к этому классу, таким образом, предлагая широкий диапазон аналитических применений. Несколько дегидрогеназ, имеющих отношение к использованию в биосенсорах, приведены в табл. 3.4.

Преобразование в биосенсорах на основе дегидрогеназ в принципе может быть выполнено путем мониторинга кофактора в любой (как окисленной, так и восстанов-

ленной) форме посредством — электрохимических реакций или поглощения/излучения света. Так как в такой реакции участвуют ионы водорода, наблюдение уровня рН также может быть простым методом преобразования. В случае дегидрогеназ аминокислот обнаружение аммиака (или аммония) с помощью соответствующего зонда обеспечивает дополнительный способ преобразования.

Некоторые бактериальные дегидрогеназы полагаются на PQQ-кофактор (рис. 3.7), который является относительно сильно связанным с ферментом. Такой фермент может в некоторых случаях быть удобной альтернативой NAD^+ -зависимых дегидрогеназ, потому что NAD^+/NADH -система является растворимым и свободно диффундирующим веществом. В естественных системах PQQ-ферменты выполняют ту же задачу, что NAD -зависимые дегидрогеназы (т. е. катализ переноса ионов гидрида), но используют хинон в качестве акцептора электронов. Хинопотеин алкогольдегидрогеназа (алкоголь:хинон оксидоредуктаза, ЕС 1.1.5.5) и хинопотеиндегидрогеназа глюкозы (D-глюкоза: убихинон оксидоредуктаза, ЕС 1.1.5.2) являются примерами PQQ-дегидрогеназ и уже исследованы в применении для биосенсоров.

Таблица 3.4. Некоторые NAD^+ -зависимые ферменты дегидрогеназы и их применение в биосенсорах

Фермент	Реакция	Применение
Алкогольдегидрогеназа (алкоголь: NAD^+ оксидоредуктаза) ЕС 1.1.1.1	Реакция (3.5)	Ферментация, пищевая промышленность
Глюкозодегидрогеназа (β -D-глюкоза: NAD(P)^+ 1-оксидоредуктаза) ЕС 1.1.1.118	β -D-глюкоза + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ D-глюконо-1,5-лактон + $\text{NADH} + \text{H}^+$	Клиническое, пищевая промышленность
Лактатдегидрогеназа (S-лактат: NAD^+ оксидоредуктаза) ЕС 1.1.1.28	Лактат + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ Пируват + $\text{NADH} + \text{H}^+$	Клиническое, пищевая промышленность
Дегидрогеназа L-аминокислот (L-аминокислота: NAD^+ оксидоредуктаза) ЕС 1.4.1.5	L-аминокислота + $\text{H}_2\text{O} +$ $\text{NAD}^+ \rightarrow$ 2-оксокислота + $\text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{H}^+$	Клиническое, пищевая промышленность
Глутаматдегидрогеназа (L-глутамат: NAD^+ оксидоредуктаза) ЕС 1.4.1.3	L-глутамат + $\text{H}_2\text{O} +$ $\text{NAD}^+ \rightarrow$ 2-оксоглутарат + $\text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{H}^+$	Ферментация, пищевая промышленность

3.4.3. Гидролазы

Гидролаза является ферментом, который катализирует гидролиз химических связей, таких как эфирная связь (эстеразы) или пептидная связь (протеазы).

Некоторые ферменты в классе гидролаз заслуживают особого упоминания. Так, *ацетилхолинэстераза* (AChE, ЕС 3.1.1.7) является существенной для функционирования нервных клеток за счет своего потенциала расщеплять нейромедиатор ацетилхолин на его составляющие (рис. 3.10). Различные пестициды или газы военного назначения являются ингибиторами AChE, что делает сенсор на основе AChE-ингибирования очень полезным для обнаружения таких вредных соединений [19].

Так как в результате гидролиза образуются ионы водорода, преобразование в AChE-сенсорах может быть выполнено простым образом путем оценки изменения pH. Для применения амперометрического сенсора естественный субстрат заменяют производным, который позволяет появляться легко обнаруживаемому продукту (например ацетилтихолину). Тиохоллин ($\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), который появляется вследствие реакции гидролиза, можно наблюдать за счет электрохимического окисления.

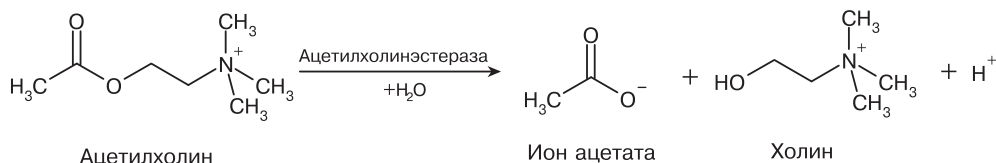


Рис. 3.10. Ферментативный гидролиз ацетилхолина

Уреаза (мочевина амидогидролаза ЕС 3.5.1.5) катализирует гидролиз мочевины (рис. 3.11) и широко используется для обнаружения мочевины, а также ингибиторов ферментов [20]. При соответствующем pH образуется либо аммиак, либо углекислый газ, а сенсоры для таких газов приемлемы для преобразования.

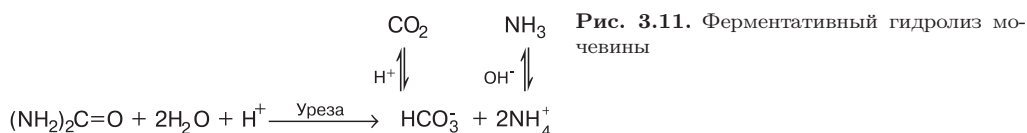


Рис. 3.11. Ферментативный гидролиз мочевины

Щелочная фосфатаза (ALP) (фосфат-моноэфир фосфогидролаза (щелочной оптимум), ЕС 3.1.3.1) отвечает за удаление фосфатных групп из многих типов фосфатных эфиров, в том числе нуклеотидов, белков и алкалоидов. ALP-катализируемая дефосфоризация происходит, как показано в реакции (3.6).



ALP как изолированный фермент или в качестве компонента живых микроорганизмов является полезной для определения загрязнителей посредством ингибирования ферментативной реакции. ALP также используется в качестве метки преобразования в аффинных сенсорах.

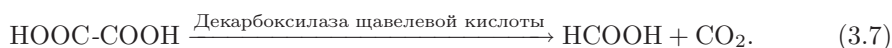
Сенсоры, используемые в производстве антибиотиков, были разработаны с помощью *пеницилазы*, которая преобразует субстрат (например пенициллин) в замещенную β -аминокислоту. Это приводит к изменению pH, что используется для получения ответного сигнала.

Некоторые аминокислотные производные подвергаются ферментативному гидролизу с образованием аммиака, который может быть определен датчиком аммиака, включенным в биосенсор. Таким образом, клинически значимые соединения, такие как креатинин и аденозин, могут быть обнаружены с помощью сенсоров на основе соответствующих ферментов (креатиназа и аденозиндезаминаза соответственно).

3.4.4. Лиазы

Лиазы являются ферментами, которые катализируют разрыв различных химических связей путем, отличным от гидролиза и окисления.

Клинически значимая щавелевая кислота может быть определена с помощью датчиков на основе декарбоксилазы щавелевой кислоты. Этот фермент превращает щавелевую кислоту в муравьиную кислоту и диоксид углерода (реакция (3.7)). Преобразование может быть выполнено с помощью зонда углекислого газа.



Другой интересной лиазой является L-аспартаза (аспартат аммиак-лиаза), преобразующая аспартат в фумарат с получением аммиака, который можно контролировать с помощью зонда аммиака.

3.4.5. Перспективный обзор

Ферменты являются белковыми соединениями, которые выполняют функцию специфических катализаторов в живых организмах. Особенность фермента определяется химической структурой и конфигурацией активного центра, что позволяет ферменту связывать субстрат и приводит к комплексу фермент-субстрат. В этом состоянии субстрат подвергается химическим превращениям в продукты, которые выделяются, освобождая активный центр. В конце этого процесса фермент способен связывать и преобразовывать другую молекулу субстрата.

Некоторые ферменты являются простыми белками, в то время как другие ферменты основываются на активном центре формирований небелковых видов (кофакторов). Кофактор может быть связан с остовом белка или может быть независимой молекулой, которая действует как носитель электронов, атомов или групп атомов.

Ферментативные сенсоры производятся путем интеграции слоя фермента с преобразователем, который отслеживает концентрацию реагента или продукта, участвующего в ферментативной реакции. Ответный сигнал образуется в зависимости от концентрации субстрата в выборке.

Селективность ферментативного датчика зависит от избирательности фермента. В этой связи следует учитывать, что лишь немногие ферменты обладают абсолютной селективностью, то есть они будут катализировать превращение только одного конкретного соединения. Другие ферменты будут ограничиваться частным типом химических связей или функциональных групп. Помимо определения субстрата, ферментативный сенсор может быть использован для обнаружения ингибиторов ферментов.

Кроме того, ферменты используются как сигнальные метки в некоторых типах сенсоров, таких как иммуносенсоры или сенсоры нуклеиновой кислоты.

Вопросы и упражнения (разделы 3.1–3.4)

1. Какова роль ферментов в живом организме и как ферменты выполняют эту функцию?
2. Как ферменты могут быть использованы в биосенсорах? Какие аналиты могут обнаруживаться биосенсорами?
3. Какова роль кофактора фермента?

4. Укажите сходства и различия между кофакторами, приведенными в разделе 3.3, с учетом их структуры, функции и механизма действия.
5. Каковы основные различия между FAD-оксидазами и пероксидазами с точки зрения структуры и химической реакции? Разверните это сравнение дополнительным сопоставлением с медьсодержащими оксидазами.
6. Разработайте общую процедуру преобразования для ферментов меди в табл. 3.3.
7. Укажите несколько ферментов и их применение в сенсорах для охраны окружающей среды.
8. Предложите несколько различных ферментов, которые используются в биосенсорах глюкозы. Напишите химические реакции для каждого из них и отметьте возможные методы преобразования.
9. Ответьте на тот же вопрос в случае аминокислотных биосенсоров.
10. Приведите ряд ферментов и охарактеризуйте их применение в сенсорах для биомедицинских наук и используйте интернет-ресурсы, чтобы найти биологическую значимость целевых веществ.
11. Используйте интернет-ресурсы, чтобы узнать (а) систематическое имя и номер ЕС для пеницилазы, креатиназы, аденозиндезаминазы, декарбоксилазы оксалата и L-аспартазы и (б) химические реакции, катализируемые каждым из указанных ферментов.

3.5. Методы преобразования в ферментативных биосенсорах

3.5.1. Методы преобразования

Стратегия преобразования выбирается в зависимости от ферментативной реакции с учетом доступных методов измерения физических и химических последствий процесса ферментной реакции.

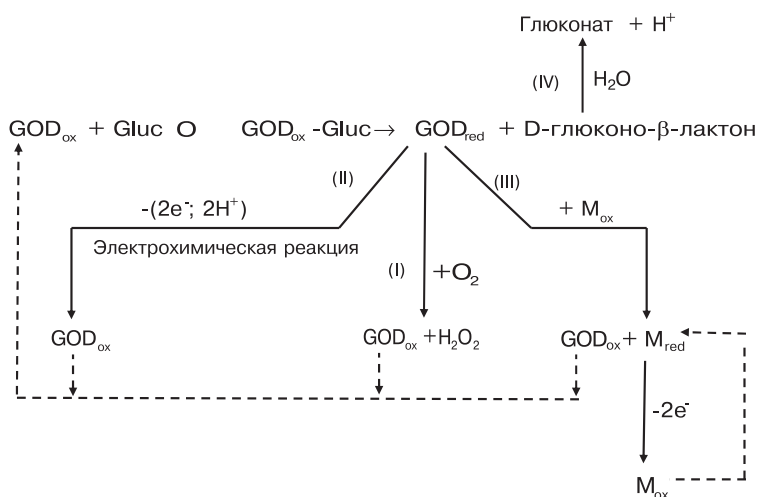
Чисто физические эффекты, такие как выделение тепла или изменение ионной проводимости, представляют собой общие методы преобразования, которые в принципе могут быть использованы с любым ферментативным сенсором. Однако такие методы преобразования не являются селективными и должны использоваться с осторожностью.

Химическое преобразование основывается на контроле концентраций любых возможных соединений, которые участвуют в ферментативной реакции. Основным ограничением в этом случае является наличие подходящих методов наблюдения. Если такой метод отсутствует, в схему преобразования могут быть интегрированы дополнительные реакции с целью получения обнаруживаемых соединений.

Общие принципы преобразования в ферментативных сенсорах проиллюстрированы здесь частным случаем сенсора глюкозы на основе глюкозооксидазы. На рис. 3.12 отображено основное направление окисления глюкозы при наличии глюкозооксидазы и последующие стратегии для выполнения преобразования в сенсоре глюкозы. Перенос электронов между ферментом и субстратом происходит в форме промежуточного комплекса, образованного субстратом и окисленной формой фермента (GOx_{ox}). После этого комплекс подвергается химическому превращению, которое выделяет продукт и фермент в восстановленной форме (GOx_{red}). Для того чтобы фермент в дальнейшем выполнял свои функции, эта форма должна быть преобразована обратно до GOx_{ox} путем реакции переноса электрона. В природных средах донором электронов на этом этапе является растворенный кислород, при этом образуется перекись водорода как продукт реакции (путь I). Таким образом, преобразование может быть выполнено путем мониторинга концентрации либо кислорода, либо перекиси водорода в чувствительном слое с помощью соответствующего датчика. Однако

в этом методе кислород и буфер pH должны быть добавлены к выборке в качестве вспомогательных реагентов. Безреагентный биосенсор глюкозы можно получить, если GOD_{ox} регенерируется до GOD_{red} путем прямого электрохимического окисления электролитическим током, действующим в качестве ответного сигнала (путь II). Другой метод основан на окислительно-восстановительном посреднике (M), который входит в структуру сенсора вместе с самим ферментом (путь III). GOD_{red} окисляется до GOD_{ox} переносом электронов на окисленную форму медиатора (M_{red}). В результате восстановленный медиатор (M_{red}) преобразуется обратно в M_{ox} за счет электрохимической реакции, которая обеспечивает ответный ток. В дополнение гидролиз основного продукта (глюконолактон) в анион глюконата (путь IV) вызывает изменение pH, что также можно использовать для осуществления преобразования.

Рис. 3.12. Возможные методы преобразования для сенсоров на основе оксидазы глюкозы. GOD и Gluc обозначают оксидазу глюкозы и глюкозу соответственно



Дополнительные реакции могут быть интегрированы в схему преобразования с целью получения продуктов, которые могут быть обнаружены с помощью доступных датчиков. Таким образом, перекись водорода может реагировать с ионом йодида при наличии соответствующего катализатора, который позволяет произвести преобразование с помощью потенциометрических йодидных сенсоров.

Как видно из вышеизложенного обсуждения, для данной пары фермент-субстрат возможны различные подходы к преобразованию. Селективный метод преобразования, который соответствует только частному реактивному продукту, предпочтительнее, но идеальной избирательности достичь трудно. Эндогенные компоненты в выборке во многих случаях могут создавать интерференцию на этапах преобразования. В таких случаях должны быть применены поправки к ответному сигналу для того, чтобы избежать ошибок. Тогда может быть использован вспомогательный сенсор, не содержащий фермента, чтобы получить образец интерференционных помех, и данный сигнал должен быть вычтен из общего ответного сигнала, представленного основным сенсором. Альтернативно селективно-проницаемые мембраны должны быть выбраны таким образом, чтобы предотвратить проникновение интерференционных элементов в зону преобразования. Следовательно, ключевой проблемой в исследованиях ферментативных сенсоров является нахождение наиболее подходящих процедур преобразования для конкретной реакции с целью получения надежного сенсора, который соответствует конкретным требованиям, предъявляемым к составу выборки и условиям эксплуатации.

Некоторые ферментативные реакции образуют газы, такие как аммиак или диоксид углерода, которые можно контролировать с помощью специфических сенсоров для получения ответного сигнала.