



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147649** (13) **U**  
(51) МПК (2021.01)  
**G01N 33/00**  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 27/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2020 06748</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Солдаткін Олександр Олексійович (UA),</b> <b>Сєдюко Дар'я Віталіївна (UA),</b> <b>Кучеренко Іван Сергійович (UA),</b> <b>Мруга Дарина Олександрівна (UA),</b> <b>Дзядевич Сергій Вікторович (UA),</b> <b>Солдаткін Олексій Петрович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>20.10.2020</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>03.06.2021</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>02.06.2021, Бюл.№ 22</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці): <b>ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І</b> <b>ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ</b> <b>НАУК УКРАЇНИ,</b> вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
	<b>(74)</b> Представник: <b>Солдаткіна Ірина Арнольдівна</b>

**(54) БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ**

**(57) Реферат:**

Біосенсор для визначення дофаміну складається з двох пар золотих електродів. На першу пару золотих електродів нанесена робоча біоселективна мембрана на основі фермента лаккази, селективна до дофаміну. На другу пару золотих електродів нанесена референтна мембрана на основі бичачого сироваткового альбуміну. Вказаний біосенсор призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

**UA 147649 U**

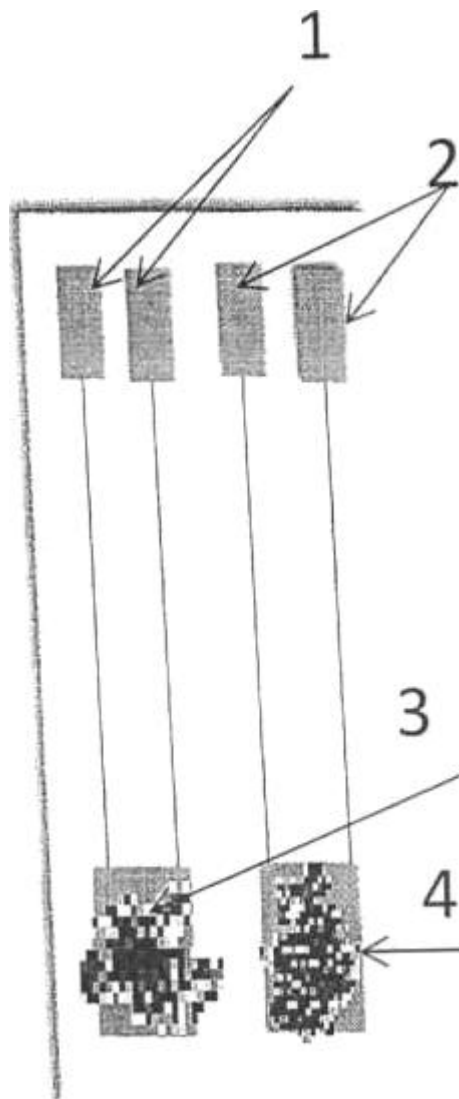


Fig. 1

Пропонована корисна модель належить до галузі біомедицини та контролю якості фармацевтичних препаратів і може бути використана з метою ранньої діагностики нейродегенеративних захворювань або для контролю якості фармацевтичних препаратів, а саме для визначення концентрації дофаміну в сироватці крові, сечі або ліках, а більш конкретно

до розробки та створення біосенсора для визначення дофаміну.

На сьогодні, для визначення дофаміну було розроблено ряд амперометричних біосенсорів на основі різних ферментів та з використанням різних перетворювачів.

Амперометричний метод найчастіше використовується для прямого визначення дофаміну. Проте, амперометричне визначення має ряд обмежень. Наприклад, порівняно великий потенціал для прямого окислення на електроді та утворення феноксирадикалів. Ці радикали здатні з'єднуватися з утворенням полімерної плівки на електроді, що призводить до зниження швидкості переносу електронів, а відповідно зменшенню чутливості самого біосенсора до дофаміну [1].

Іншим недоліком, амперометричних біосенсорів для виявлення дофаміну є співіснування багатьох електроактивних інтерферуючих сполук у біологічних рідинах. Аскорбінова та сечова кислоти існують у рідинах організму людини у високій концентрації, і можуть бути легко окислені при потенціалах, близьких до потенціалу окислення дофаміну, що призводить до накладання відгуків та неправильного визначення концентрацій дофаміну. Крім того, концентрація дофаміну є надзвичайно низькою (0,01-1 мкМ) у здорових осіб та ще меншою (в наномолярному діапазоні) у пацієнтів з хворобою Паркінсона, тоді як концентрація аскорбінової кислоти на 2-3 порядки вища [2].

Тому завдання створення простого, швидкого та точного методу для визначення дофаміну залишається актуальним. Проаналізувавши недоліки, переваги та особливості амперометричних біосенсорів автори дійшли висновку, що розробка нового біосенсора для визначення дофаміну є актуальною. Такі біосенсиори на основі кондуктометричного методу аналізу мають важливі переваги: не потребують використання електрода порівняння; не чутливі до електроактивних речовин; працюють при малій амплітуді переминої напруги, тим самим запобігають фарадеївським процесам на електродах; нечутливі до світла; можуть бути мініатюризовані та легко інтегровані за допомогою дешевої стандартної технології тонких плівок.

Відомий біосенсор на основі амперометричного методу аналізу для визначення дофаміну базувався на використанні ферменту - тирозинази [3]. Для роботи даний амперометричний біосенсор потребує технологічно складного електрода порівняння. В роботі використано тирозиназу, що має цілий ряд субстратів, що призводить до недостатньої селективності самого біосенсора. Крім того, використання тирозинази обмежує чутливість та лінійний діапазон роботи даного сенсора. Складність технології подальшої мініатюризації відомого біосенсора призведе до збільшення собівартості як самого біосенсора, так і аналізу дофаміну в цілому.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого біосенсора для визначення дофаміну, який би дозволив більш точно та селективно визначати концентрацію дофаміну та був значно дешевшим для метрологічної стандартизації та масового виробництва.

Поставлена задача вирішується запропонованим біосенсором для визначення дофаміну, що складається з двох пар золотих електродів, згідно з корисною моделлю, на першу пару золотих електродів нанесена робоча біоселективна мембрана на основі фермента лаккази, селективна до дофаміну, на другу пару золотих електродів нанесена референтна мембрана на основі бичачого сироваткового альбуміну, а вказаний біосенсор призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

Використання в роботі запропонованого біосенсора, кондуктометричного методу аналізу, дозволило проводити більш чутливий та селективний аналіз дофаміну у водних зразках завдяки використанню ферменту - лаккази та слабій чутливості кондуктометричного перетворювача до наявності електроактивних інтерферентів у аналізованому зразку. Крім того, за використання кондуктометричних перетворювачів, запропонований біосенсор для визначення дофаміну є більш дешевим для подальшої стандартизації та масового виробництва.

В основі роботи біосенсора для визначення дофаміну лежить наступна ферментативна реакція:



В процесі проходження ферментативної реакції лаккази розщеплює дофамін, при цьому змінюється провідність розчину в приелектродному просторі, яку і можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [4].

5 Суть запропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де на фіг. 1 показано зовнішній вигляд біосенсора для визначення дофаміну;

на фіг. 2 показана блок-схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань;

на фіг. 3 наведено калібрувальний графік залежності величини відгуку біосенсора від концентрації дофаміну в аналізованому розчині;

10 а на фіг. 4 продемонстровано відгуки кондуктометричного біосенсора на дофамін та інші можливі інтерференти.

Біосенсор для визначення дофаміну складається з двох золотих гребінчастих пар електродів 1 та 2 /ГЕ/ (фіг. 1). На одну пару електродів 1 /ГЕ/ нанесена робоча мембрана 3 /РМ/ на основі лаккази. На другу пару електродів 2 /ГЕ/ нанесена референтна мембрана порівняння 4 /МП/. Згаданий біосенсор підключений до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань (фіг. 2). Експериментальна установка для кондуктометричних вимірювань містить портативний вимірювальний прилад "МСП-3" 5 /ВП/, що був розроблений та виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України [5]. Також кондуктометрична схема вимірювання включала в себе тримач для біосенсора 6 /ТБ/ і штатив 7 /СШ/. При проведенні вимірювань на основу штативу встановлюють робочу комірку 8 /ВК/ з досліджуванним розчином 9 /ДР/, а весь сенсорний блок встановлюють на магнітний перемішувачий пристрій 10 /МП/. Портативний вимірювальний прилад "МСП-3" - 5 /ВП/ підключається до електромережі через адаптер мережі живлення 11 /БЖ/, до біосенсора - сполучними дротами через контакт 12 /СД/, а до персонального комп'ютера 13 /ПК/ зі встановленим пакетом відповідного програмного забезпечення - через контакт 14 /КК/. Вимірювання проводили при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ. Після підключення біосенсора до тримача 6 /ТБ/ одержували початкову базову лінію на графіку, а далі додавали досліджуваній зразок. Відгук реєстрували на екрані персонального комп'ютера 13 /ПК/.

30 Запропонований біосенсор для визначення дофаміну працює так. Попередньо виготовляли біоселективні мембрани. Для створення гелю для ферментної робочої мембрани 3 /РМ/ запропонованого біосенсора готували розчин з вмістом 7,5 % лаккази, 2,5 % сироваткового альбуміну бика (БСА), 10 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. До складу гелів додавався гліцерин для стабілізації ферментів при іммобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. В свою чергу, сироватковий альбумін бика в складі ферментних мембран відігравав роль стабілізуючого агенту для ферментів. На робочу поверхню однієї пари електродів 1 /ГЕ/ біосенсора наносили вихідну суміш для створення робочої мембрани 3 /РМ/ (об'єм 40 нл), яку вносили в пари глутарового альдегіду (ГА) на 10-20 хвилин. Цю робочу мембрану готували із 20 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

40 6-9 лаккази,  
1-4 БСА,  
8-12 гліцерин.

Референтну мембрану порівняння 4 /МП/ виготовляли таким же чином, але замість наважки ферменту до гелю додавали лише 10 % БСА. Референтну мембрану порівняння 4 /МП/, нанесена на другу робочу пару гребінчастих електродів 2 /ГЕ/ кондуктометричного біосенсора складалась з 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,5, та з наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %): 8-12 БСА, 8-12 гліцерин.

Співвідношення компонентів біоселективних мембран запропонованого біосенсора отримували експериментально. Проводили підбір співвідношення для покращення аналітичних характеристик біосенсора, таких як селективність, чутливість, собівартість біосенсора.

Після закінчення процесу створення біоселективних та референтних мембран біосенсиори висушували 20 хв. на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи, для видалення надлишку незв'язаного ферменту та інших компонентів мембран, біосенсор відмивали протягом 10 хв. у буфері, в якому і проводили подальші досліді.

55 Біосенсор для визначення дофаміну підключали до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань, що працювала у режимі кондуктометричних вимірювань при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ. Далі біосенсор для визначення дофаміну поміщали до робочої комірки об'ємом 2,0 мл, заповненої 10 мМ фосфатним буфером, рН 7,2, та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали певну аліквоту модельного розчину дофаміну та отримували сигнал біосенсора. Сигнал від

біосенсорів автоматично оброблявся персональним комп'ютером і виводився у графічному вигляді.

Протокол роботи біосенсора для визначення дофаміну в модельних розчинах. Для отримання калібрувальної кривої біосенсорного визначення дофаміну у вимірювальній комірці змінювали концентрацію субстрату, додаючи певні аліквоти вихідних концентрованих розчинів дофаміну. Після отримання кожного відгуку біосенсор відмивали від продукту, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази кожні 1,5 хв. З використанням відгуків біосенсора на додавання різних аліквот модельних розчинів дофаміну було побудовано калібрувальну криву для визначення концентрації дофаміну (Фіг. 3). Біосенсор характеризувався широким лінійним діапазоном роботи до 2 мМ дофаміну та мінімальною межею визначення - 5 мкМ дофаміну, ці параметри значно кращі, ніж у відомого аналога (до 0,25 мМ та 25 мкМ дофаміну, відповідно) [13].

З метою визначення концентрацій дофаміну в складних біологічних зразках та багатокомпонентних ліках, перевіряють селективність запропонованого біосенсора відносно можливих інтерферентів. В експериментальну комірку вносили розчин з 5 мМ концентрацією інтерферуючої речовини (глутамат, цистеїн, тирозин, глюкоза). Відгук біосенсора розраховано у відсотках (Фіг.4). Отримані результати свідчать, що біосенсор проявляє достатню селективність до дофаміну відносно ряду можливих інтерферентів.

Біосенсорне визначення концентрації дофаміну в рідинах біологічного походження та ліках за допомогою калібрувальної кривої. Додавали аліквоту проби до вимірювальної комірки та отримували відгук. Далі за калібрувальною кривою вираховували концентрацію дофаміну в невідомій пробі. За умов подальшої стандартизації запропонованого біосенсора для визначення дофаміну, ціна аналізу однієї проби, за пропонованою моделлю, буде щонайменше у 3 рази дешевше, ніж у відомих біосенсорів для визначення дофаміну [13].

З прикладу роботи біосенсора, за допомогою калібрувальної кривої (Фіг. 3) і графіка перевірки селективності (Фіг.4), видно, що пропонований кондуктометричний біосенсор на основі лаккази для аналізу концентрації дофаміну є функціонально придатним і дозволяє з кращою селективністю та чутливістю проводити аналіз концентрації дофаміну в реальних розчинах порівняно з відомими біосенсорами.

Джерела інформації:

1. S. Sanchez-Cortes, O. Francioso, J... Garcia-Ramos, C. Ciavatta, and C. Gessa, "Catechol polymerization in the presence of silver surface, " Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp., vol. 176, no. 2-3, pp. 177-184, Jan. 2001.

2. S. Hou, M. L. Kasner, S. Su, K. Patel, and R. Cuellari, "Highly Sensitive and Selective Dopamine Biosensor Fabricated with Silanized Graphene, " J. Phys. Chem. C, vol. 114, no. 35, pp. 14915-14921, Sep. 2010.

3. S. Tembe, B. S. Kubal, M. Karve, and S. F. D'Souza, "Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine, " Anal. Chim. Acta, vol. 612, no. 2, pp. 212-217, Apr. 2008.

4. С.В. Дзядевич Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. Біополімери і клітина - 2005,-21, -с. 91-106.

5. В.Г. Мельник, А.Д. Василенко, А.Е. Дудченко, В.Д. Погребняк, Исследования подавления синфазной помехи в биосенсорной кондуктометрической системе с дифференциальными датчиками. Sensor Electronics and Microsystem Technologies 2014 - Т. 11, № 3,49-61.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Біосенсор для визначення дофаміну, що складається з двох пар золотих електродів, який **відрізняється** тим, що на першу пару золотих електродів нанесена робоча біоселективна мембрана на основі фермента лаккази, селективна до дофаміну, на другу пару золотих електродів нанесена референтна мембрана на основі бичачого сироваткового альбуміну, а вказаний біосенсор призначений для підключення до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

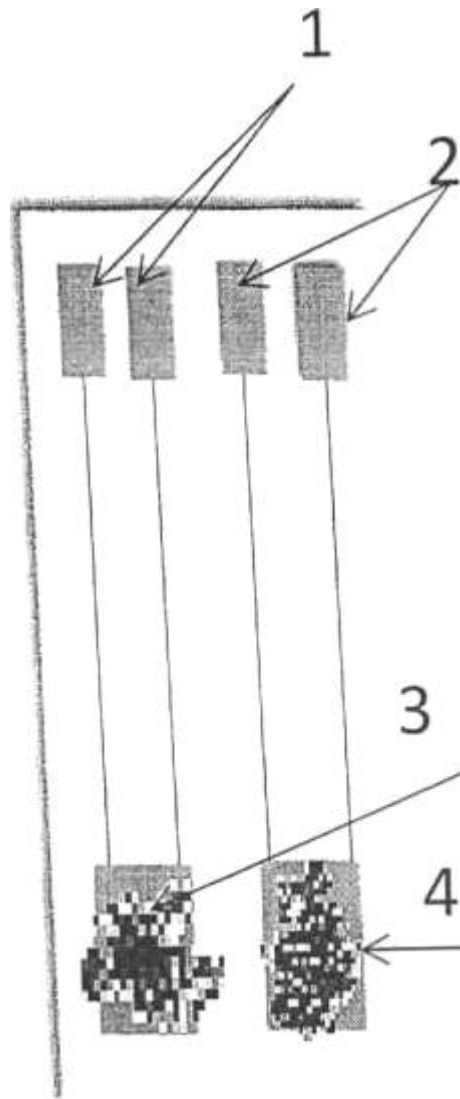


Fig. 1

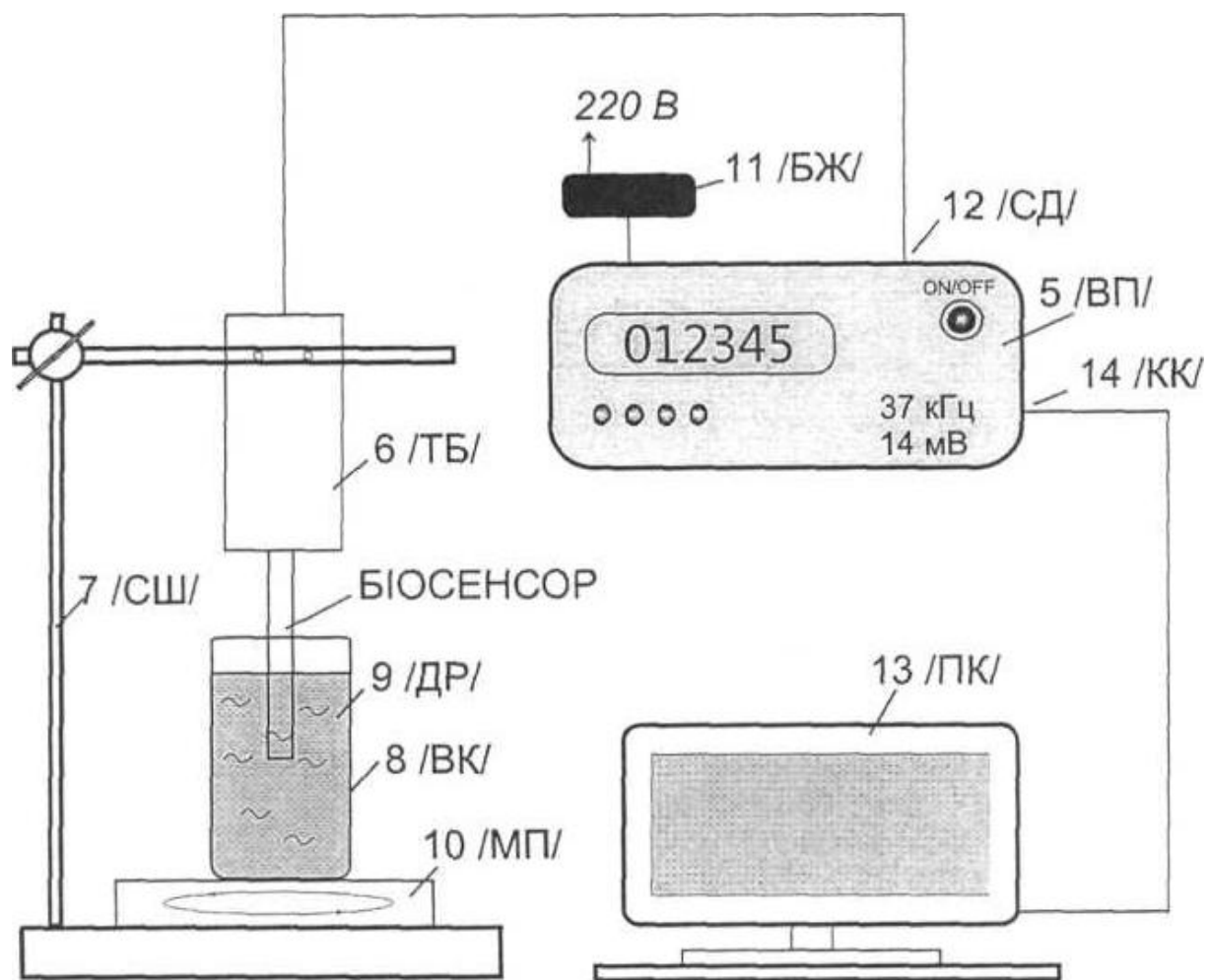
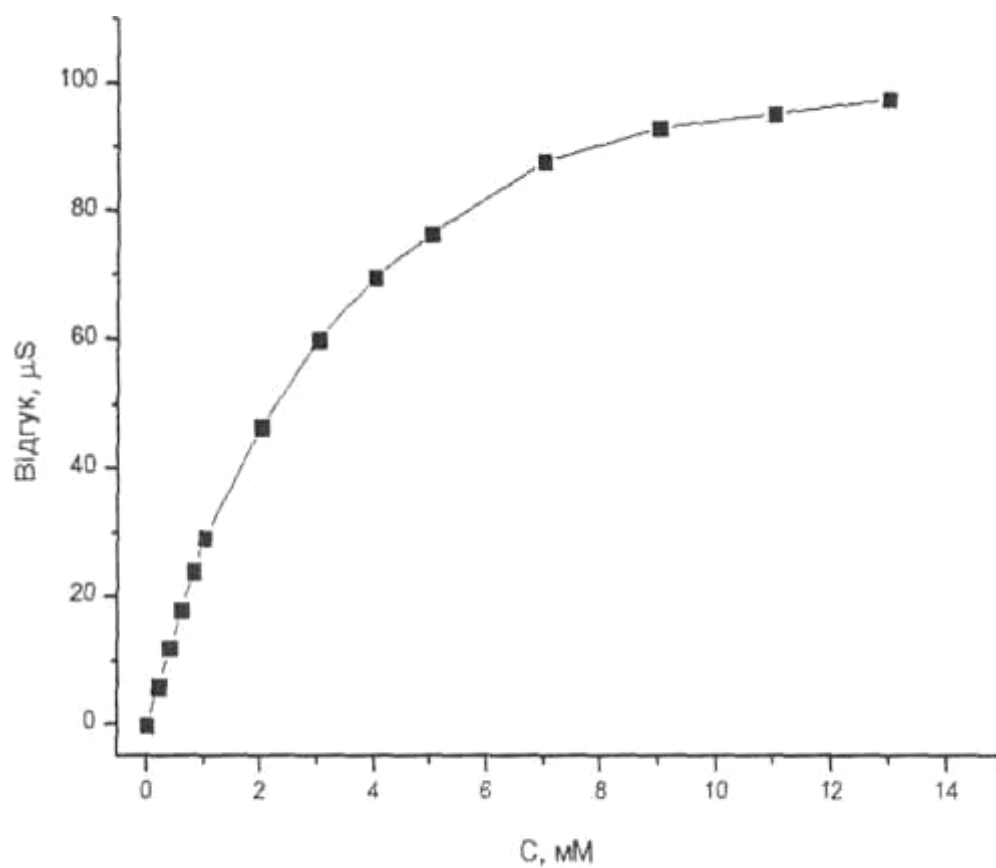
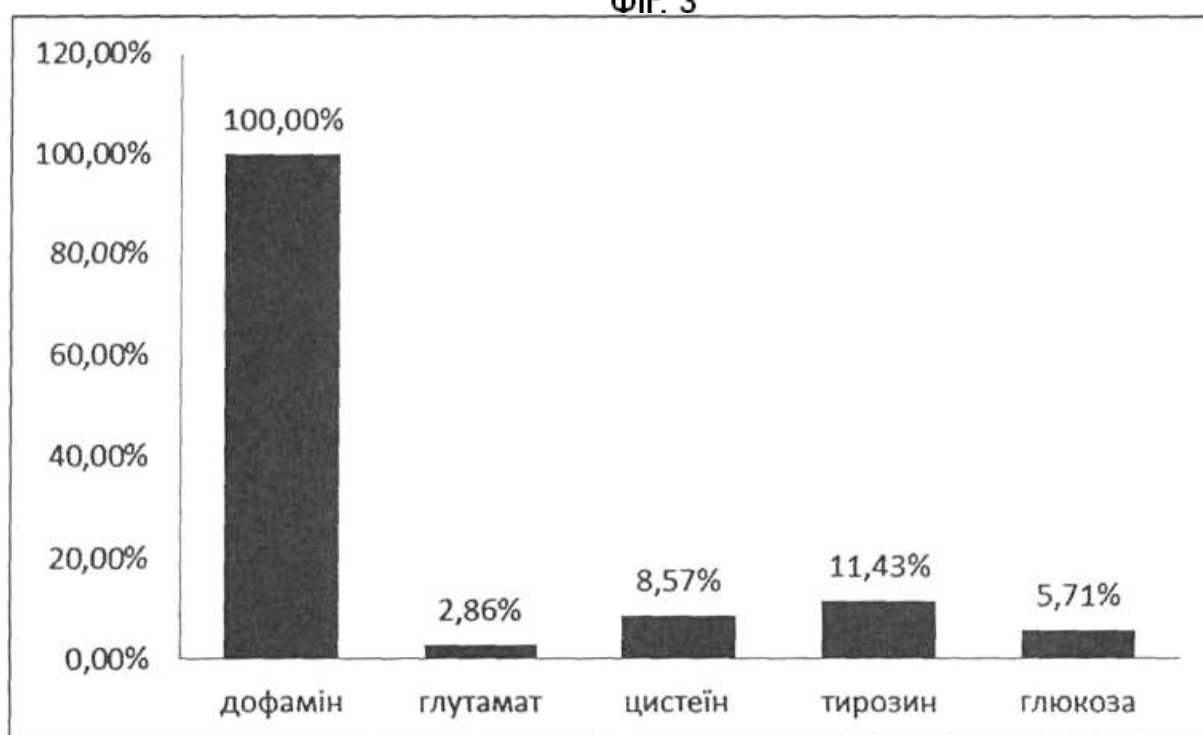


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4