

MEMBRÁNY PRO AMPEROMETRICKÉ BIOSENZORY

LUDMILA ZAJONCOVÁ
a KRISTÝNA POSPÍŠKOVÁ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
ludmila.zajoncova@upol.cz*

Došlo 12.3.08, přijato 22.4.08.

Klíčová slova: amperometrické biosenzory, imobilizace, selektivita, specifita, elektropolymerace

Obsah

1. Úvod – význam biosenzorů v analytické chemii
2. Interference při analýzách biologických vzorků
 - 2.1. Řešení interferencí
3. Imobilizace biorekogniční vrstvy
 - 3.1. Fyzikální postupy imobilizace
 - 3.2. Chemické postupy imobilizace
 - 3.3. Elektropolymerace
 - 3.3.1. Vodivé polymery
 - 3.3.2. Nevodivé polymery
4. Ochranné membrány pro zvýšení selektivity
 - 4.1. Polymerní selektivní membrány
 - 4.2. Nevodivé polymery jako selektivní membrány
5. Difuzní membrány a biokompatibilita
6. Závěr

1. Úvod – význam biosenzorů v analytické chemii

Biosenzory jsou významná analytická zařízení obsahující složku biologického původu, která ve spojení s fyzikálně chemickým převodníkem zajišťuje určitý stupeň selektivity při analýzách ve složitých biologických směsích. Biologický prvek pracuje v tomto zařízení na principu biokatalytickém nebo na principu vzniku specifické pevné afinitní vazby, a právě tento prvek ovlivňuje specifitu stanovení. V současnosti umožňuje řada instrumentálních metod stanovení stopových koncentrací nejrůznějších složek ve složitých analyzovaných směsích. Je však třeba tyto směsi často složitě připravovat pro analýzu, použít vhodnou separační metodu, případně stanovené sloučeniny derivatizovat, a pak teprve lze citlivě stanovit požadovaný analyt. Tyto kroky jsou časově i finančně náročné. Nedovolují stanovení velkého množství vzorků v krátkém čase. Během analýzy může dojít v průběhu několika přípravných kroků k řadě nepřesností. Jako alternativní stano-

vení se nabízí použití biosenzoru vhodné konstrukce. Nejčastějším typem v praxi používaných biosenzorů jsou amperometrické senzory s peroxidovou elektrodou. Amperometrické biosenzory zaznamenávají změny proudu, které nastanou při biokatalytické reakci. Proud na elektrodě vzniká v případě anodické oxidace peroxidu vodíku¹ či katodické redukce kyslíku, popřípadě peroxidu vodíku.

Použití biosenzoru při analýze složitých směsí však nemusí být vždy výhodou, biologická složka sice zajišťuje vysokou specifitu stanovení, ale ve směsích se mohou vyskytovat látky, které mohou nějakým způsobem ovlivňovat signál na amperometrickém převodníku. Jakým způsobem lze eliminovat tyto rušivé signály a dosáhnout vysoké selektivity, je tématem tohoto článku.

2. Interference při analýzách biologických vzorků

Jedním z největších problémů, které doprovází analýzy prováděné pomocí biosenzorů s peroxidovou elektrodou, je přítomnost interferujících látek ve zkoumaném vzorku. Přítomné elektroaktivní interferující látky mohou zvýšit signál, protože dojde k jejich oxidaci souběžně s analytem. Mezi nejčastější snadno oxidovatelné sloučeniny², které se vyskytují v biologických tekutinách, lze zařadit³ kyselinu askorbovou, kyselinu močovou, močovinu, cystein, dále různá léčiva, jako např. paracetamol, acetaminofen, ampicilin, mannitol, digoxin, aminofylin, cimetidin, dopamin, erytromycin, gentamycin, norepinefrin, penicilin, salicylát aj. Na druhé straně se na povrchu pracovní elektrody může postupně usazovat nános nečistot, neelektroaktivních sloučenin, následkem tohoto procesu je naopak pokles odezvy signálu v čase⁴. K nepřesnostem při stanovení může také přispět přítomnost téže látky, která vzniká v průběhu katalytické reakce, v analyzovaném biologickém vzorku.

2.1. Řešení interferencí

Hlavním cílem při konstrukci biosenzoru je tedy dosažení vysoké selektivity související s eliminací přítomných interferencí. Tento problém lze řešit různými cestami. Rušivé složky se převádí pomocí vhodné zvolené reakce na formu, která již není elektroaktivní. Glukosový biosenzor s enzymem glukosaoxidasou, který zaznamenává množství vzniklého peroxidu vodíku, je možno překrýt tenkou membránou s imobilizovaným enzymem askorbáttoxidasou⁵. Pro omezení rušivého vlivu glukosy při stanovení jiných disacharidů, např. sacharosy, pomocí amperometrického biosenzoru s pyranosaoxidasou lze zvolit klasickou reakci. Předřazením antiinterferenční membrány obsahující enzym hexokinasu dojde v přítomnosti ATP

a MgCl_2 k fosforylaci glukosy za vzniku glukosa-1-fosfátu⁶. Nejčastěji je povrch pracovní elektrody pokryt různými typy membrán⁴, jejichž úkolem je omezit přístup interferujícími látkami. Interferenci látek na elektrodě lze zabránit samostatnou membránou, která je v těsné blízkosti biosenzoru, ale může být také zvolena vhodná metoda imobilizace, která vytvoří membránu s biokatalytickou vrstvou o optimální selektivitě.

3. Imobilizace biorekogniční vrstvy

Při konstrukci biosenzoru se klade největší důraz na imobilizační proces. Výběr imobilizační techniky je rozhodující pro výslednou operační stabilitu, životnost a dobu odezvy biosenzoru. Pro upevnění enzymu k povrchu lze použít fyzikální postupy (adsorpce, enkapsulace či zachycení enzymu ve struktuře matrice) nebo chemické postupy, jako je zesítění enzymu či kovalentní vazba enzymu s membránou nebo povrchem převodníku (obr. 1). Zvolený typ imobilizace má vliv na životnost biosenzoru.

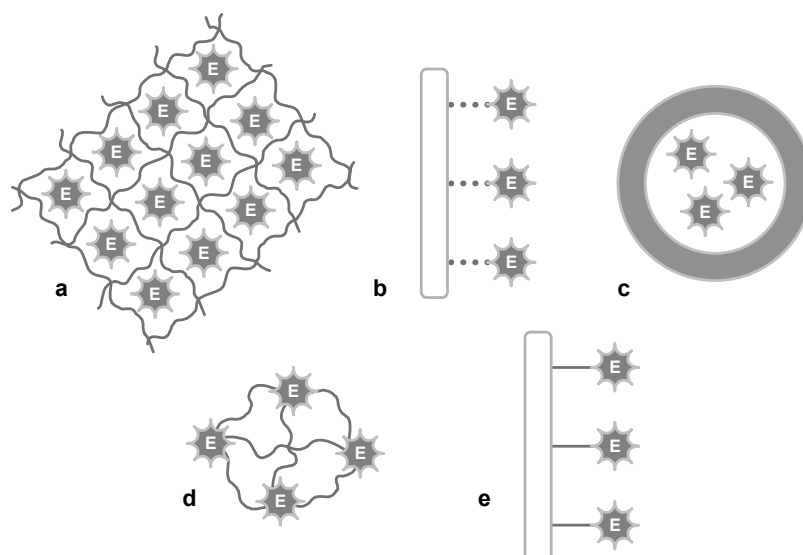
3.1. Fyzikální postupy imobilizace

Nejjednodušším způsobem zachycení komponenty na povrch převodníku je mechanické zachycení. Biokomponenta se nakápne na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou, která zadrží makromolekuly, ale nebrání průniku analytu. Vhodnými materiály pro přípravu dialyzační membrány jsou celulósa, acetylcelulósa, polycarbonáty nebo celofán⁷. Tímto způsobem byly konstruovány biosenzory s tkáňovými řezy či vrstvou tvořenou mikrobiálními buňkami ve formě pasty, ve kterých je řez

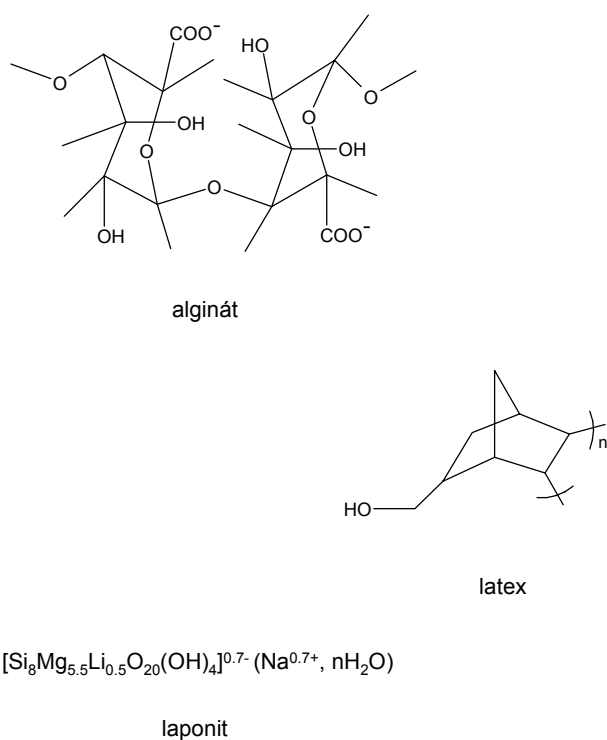
či pasta upevněna k převodníku pomocí polyamidové sítě⁸.

Při adsorpci je enzym poután k povrchu převodníku slabými silami, jako jsou van der Waalovy síly, iontové síly, vodíkové vazby či hydrofobní interakce. Pro lepší stabilitu je doporučováno použít navíc ještě glutaraldehyd k zesítění enzymu a k jeho lepšímu upevnění na povrchu převodníku. Na adsorpční povrch se vedle enzymu může adsorbovat také substrát či kontaminanty a limitovat tak difuzi či způsobit transportní problémy.

Další fyzikální postupy, jako je zachycení enzymu ve struktuře vhodné matrice či gelu a mikroenkapsulace, jsou pro imobilizaci výhodnější. Enzym zůstává volný v roztoku, ale jeho pohyb je omezen strukturou materiálu či gelu (obr. 1). Pórovitost materiálu dovoluje kontakt enzymu se substráty a uvolnění produktu po reakci. Metody jsou vhodné také pro zachycení mikroorganismů, které produkují požadovaný enzym. Ale ani tento způsob imobilizace nezabraňuje rychlé ztrátě aktivity enzymu a také doba odezvy biosenzoru je poměrně dlouhá. Materiál pro zachycení enzymů může být anorganického i organického původu. Z anorganických materiálů se k zachycení biomolekuly používalo koloidní zlato⁹, křemičitanové sklo¹⁰ nebo oxid¹¹ vanadičný. Nověji se pro fyzikální zachycení enzymu osvědčil laponit^{12,13}. Přesné složení laponitu je patrné z obr. 2. Výsledná enzymová vrstva může být ještě stabilizována zesítováním enzymu parami glutaraldehydu¹³. Liu¹⁴ při konstrukci uhlíkové elektrody použil nový anorganický materiál k zachycení glukosaoxidasy, a to koloidní roztok oxidu hlinitého, v literatuře označovaný jako boemit. Vyhnul se tak použití toxického glutaraldehydu při *in vivo* analýze. Chen použil boemit¹⁵ k imobilizaci glukosaoxidasy na platinovou elektrodu. Příkladem matric orga-



Obr. 1. Způsoby imobilizace enzymů; a – zachycení ve struktuře polymeru, b – adsorpce, c – enkapsulace, d – zesítování, e – kovalentní vazba



Obr. 2. Chemická struktura některých anorganických a organických matic

nického původu, které mohou sloužit k zachycení enzymů, jsou alginát a latex, jejichž struktury jsou znázorněny rovněž na obr. 2. Alginát je společný výraz pro skupinu kopolymerů obsahující 1,4-vázané β -D-mannuronové a α -L-guluronové kyselinové zbytky. Gel vzniká spontánně v přítomnosti dvojmocných iontů, jako jsou např. Ca²⁺ nebo Mg²⁺, za velmi mírných podmínek. Gel slouží k zachycení nebo k enkapsulaci enzymu. Alginát byl použit při konstrukci biosenzoru¹⁶ k imobilizaci buněk *Rhodococcus sp.*, které produkují enzym alkylhalidohydrolasu (EC. 3.8.1.1) katalyzující přeměnu halogenových uhlovodíků na odpovídající alkoholy a halogenové ionty. Jiným typem organické matrice jsou různé latexy¹⁷. Latex společně s požadovaným enzymem po nakápnutí na platinovou elektrodu vytvoří matici, která je ve vodě nerozpustná. Kumar¹⁸ použil k imobilizaci cholesteroloxidasy polyvinylovou pryskyřici zakoupenou pod komerčním názvem Formvar.

3.2. Chemické postupy imobilizace

Biokomponenta může být navázána na povrch převodníku chemickou vazbou přímo, nebo se imobilizuje na membránu, která se vhodným způsobem připevní na povrch převodníku. Nejstarší typy amperometrických biosenzorů používaly k imobilizaci enzymů obvykle nylonovou síťku⁸, která před imobilizací mohla být navíc aktivována

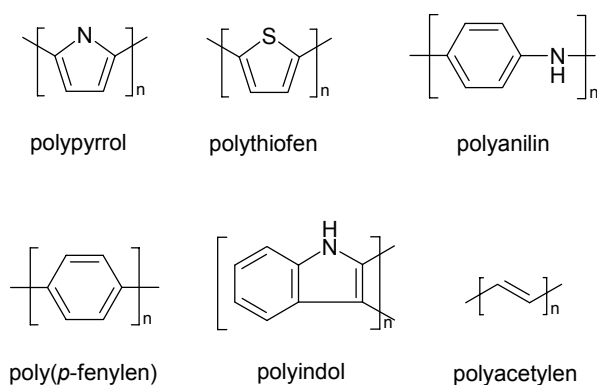
dimethylsulfátem⁶ nebo byla ponořena před aktivací glutaraldehydem do roztoku želatiny¹⁹. Později se jako membrána pro kovalentní imobilizaci enzymů rozšířila celulozoacetátová membrána²⁰. Na tyto celulozoacetátové membrány byly enzymy nejčastěji imobilizovány pomocí glutaraldehydu jako síťovadla. Nadbytek glutaraldehydu byl eliminován propláchnutím membrány 0,1 mol l⁻¹ glycinem²¹. Nověji bylo možné zakoupit řadu membrán komerčně, Mascini použil membránu²² Biodyne nylon 6-6 (adipová kyselina-hexamethylendiamin) a pyranosaoxidasi navázal na membránu pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu²². Jiným typem komerčně dostupné membrány je „Immobilon affinity membrane“²³, což je hydrofilní polyvinyliden difluoridová membrána. Triacetylcelulosová membrána²⁴ byla vytvořena pro stanovení sacharosy, glukosy, laktosy a škrobu. Odpovídající enzymy byly opět imobilizovány pomocí glutaraldehydu. K přípravě membrán pro biosenzory se osvědčil polyvinylalkohol, což je hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer. Připravuje se hydrolyzou polyvinylacetátu ve formě krátkých oligomerů, které po zesíťování vytvoří společně s enzymem konečný polymer. K zesíťování lze použít jednak tvrdé záření, které však může poškodit převodník či biomolekulu, anebo se používají triisokyanáty. Výhodnější je použití komerčně dostupného polyvinylalkoholu s 1,3% podílem styrylbipyridinových skupin²⁵ (PVA-SbQ), který polymeruje působením ultrafialového světla.

3.3. Elektropolymerace

Elektropolymerace je jednou z technik sloužících k tvorbě polymerního filmu na povrchu pracovní elektrody biosenzoru. Základní princip elektropolymerace obvykle spočívá v tom, že monomer určité sloučeniny je elektrochemicky oxidován při vhodném potenciálu za vzniku volných radikálů. Tyto radikály jsou adsorbovány na povrch elektrody a následně dojde k řadě dalších reakcí vedoucích ke vzniku polymerní sítě. Elektrosyntéza polymerních filmů na povrchu elektrody může probíhat za stálé hodnoty potenciálu (potenciostaticky), za stálého proudu (amperostaticky) nebo metodou cyklických změn potenciálu (potenciodynamicky). Pomocí dynamických metod lze dosáhnout tvorby lépe adhezních, hladkých filmů, statické metody zase umožňují lepší kontrolu tloušťky filmu. Důležitou vlastností je vodivost polymerních vrstev, která umožňuje snadnější přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami. Z tohoto pohledu lze membrány vzniklé elektropolymerací členit na vodivé a nevodivé.

3.3.1. Vodivé polymery

Vodivé polymery²⁶ nesou ve své struktuře π elektrony, které povrchu polymeru propůjčují elektrochemické vlastnosti, jako je vysoká elektrická vodivost a nízký ionizační potenciál. Přímé vytvoření polymerního filmu na povrchu pracovní elektrody za mírných podmínek dovoluje zachytit biologické komponenty, jako jsou enzymy, protilátky, fragmenty DNA a dokonce celé živé buňky. Do



Obr. 3. Příklady vodivých polymerů

polymerního filmu mohou být zakomponovány také látky, které se podílejí na biochemické reakci, jako jsou koenzymy, mediátory či stabilizátory. Vlastnosti elektrochemických biosenzorů²⁶, které obsahují vodivý polymer, jsou dány třemi základními parametry, a to podkladovým materiálem, tedy povrchem elektrody, charakterem polymeru tedy matrice a vlastnostmi imobilizované komponenty. Samotná elektroda může být zhotovena z řady materiálů, jako je platina, skelný uhlík, zlato, uhlíkové vlákno, TiO₂ či SnO₂. Na obr. 3 jsou uvedeny nejčastěji používané vodivé polymery²⁶ pro konstrukci biosenzorů. Široce využívaným polymerem pro imobilizaci enzymů, protilátek a také nukleových kyselin je polypyrrol²⁷, který lze snadno připravit z vodných pufovaných roztoků za mírných oxidačních podmínek. Polythiofen je nerozpustný ve vodě a vyžaduje vyšší potenciál pro elektropolymeraci než polypyrrol. Polyanilin vzniká podobně jako polypyrrol, ale pro tvorbu je třeba kyselého prostředí, které nemusí vždy vyhovovat vázaným biomolekulám. Imobilizace biologické složky může probíhat zároveň s tvorbou polymeru, ale také jako krok následný. Pokud je membrána elektrody připravena jako vodivý polymer²⁶, je možné dobře kontrolovat některé parametry tohoto vzniklého polymeru: tloušťku vrstvy, množství vloženého enzymu a jeho prostorovou orientaci.

Podobně jako při imobilizování volného enzymu na membránu nebo povrch elektrody lze zvolit pro navázání biologické složky enzymu na vodivý polymer několik způsobů vazby. Enzym může být imobilizován adsorpčními silami, které vzniknou mezi polykationovou maticí oxidovaného polymeru a celkovým negativním nábojem enzymů, který je způsoben vyšší hodnotou pH, než je jeho izoelektrický bod. V takovém případě je množství enzymu, které se může navázat, malé, neboť je limitováno povrchem jedné monovrstvy na vzniklém polymerním povrchu. Tímto způsobem byly připraveny biosenzory pro stanovení glukosy^{28,29}, cholesterolu³⁰ a pyruvátu³¹. Adsorpce enzymu na povrchu může být ještě podpořena násled-

nou elektropolymerací, která však nemusí mít vždy kladný výsledek, neboť může dojít k desorpci enzymu během tohoto procesu či k denaturaci enzymu³². Na vodivý polymer může být enzym také imobilizován metodou zesílení s glutaraldehydem. Tímto způsobem byly připraveny biosenzory se salicyláthydrolasou³³, laktátdehydrogenasou³⁴ a tyrosinase³⁵. Třetím způsobem imobilizace na povrch vodivého polymeru je metoda elektrochemického dopování. Je založena na tom, že polymer má negativní náboj v prostředí, kde pH je vyšší, než je izoelektrický bod enzymu. Enzym je tak dopován do filmu během oxidačního procesu. Touto metodou byly imobilizovány například glukosaoxidasa^{29,36,37}, peroxidasa³⁸ nebo urikasa³⁹. Dalším způsobem vazby enzymu na vodivý polymer je tvorba kovalentní vazby. Zde existují dvě cesty pro vytvoření kovalentní vazby mezi enzymem a polymerem. Dvoukroková procedura je založena na zavedení funkčních skupin na povrch polymeru a následně dojde k reakci enzymu s funkčními skupinami polymeru. Druhá cesta je jednodušší a využívá monomer, který již obsahuje funkční skupiny pro tvorbu kovalentní vazby s enzymem. Polymeraci takového monomeru v přítomnosti enzymu dojde ke kovalentnímu spojení biokomponenty s polymerním povrchem. Oba způsoby byly aplikovány pro konstrukci biosenzoru s glukosaoxidase^{40–42}. Zachycení enzymu do struktury polymeru je nejvhodnějším způsobem imobilizace biokomponenty. Jedná se o elektrochemickou oxidaci monomeru v přítomnosti enzymu, kdy vzniká polymer, v němž jsou homogenně distribuovány molekuly enzymu v průběhu růstu polymerní vrstvy. Výhodou zachytu enzymu je jednoduchost provedení a reprodukovatelnost jedнокrokové procedury s možností společné imobilizace koenzymů, mediátorů a dalších látek, které jsou potřebné pro biochemickou reakci. Řada výzkumů byla zaměřena na zachycení glukosaoxidasy^{43–46}. Tento enzym byl zakorporován do struktury polyanilinového filmu i při nízkých hodnotách^{47,48} pH či v prostředí organických rozpouštědel⁴⁹, aniž by došlo k významným ztrátám aktivity enzymu. Do struktury polymeru byly zachyceny také další pro analýzu významné enzymy, jako je peroxidasa⁵⁰, cholesteroloxidasa^{51,52}, laktátoxidasa³⁶, askorbátoxidasa⁵³, polyfenoloxidasa⁵⁴, invertasa⁵⁵, urikasa⁵⁶ a další enzymy.

3.3.2. Nevodivé polymery

Hlavní předností nevodivých polymerů je jejich schopnost vytvářet membránu, která zvyšuje selektivitu stanovení ve složitých biologických směsích. Jsou součástí multivrstvých membrán biosenzorů, kde vytvářejí bariéru^{28,57,58} průchodu elektroaktivním látkám nebo sloučeninám, které na elektrodě ulpívají. Poly(1,2-diaminobenzen) je typický představitel nevodivých^{57,58,59} polymerních membrán. Za určitých podmínek další kontrolované elektrochemické oxidace polypyrrolu může dojít k vytvoření nevodivé membrány⁶⁰. Zároveň však i nevodivý film může sloužit k imobilizaci biokomponenty.

4. Ochranné membrány pro zvýšení selektivity

Stanovení významných analytů pomocí amperometrických senzorů s peroxidovou elektrodou může být v biologických vzorcích ovlivněno interferencemi, které způsobují elektroaktivní látky na povrchu elektrody a zvyšují tak analytický signál, nebo naopak ulpíváním makromolekulárních látek na povrchu senzoru, které vede k redukci signálu. Tyto jevy lze korigovat limitováním množství analytu popřípadě jeho vhodným zředěním, anebo předcházet těmto jevům vhodně zvolenou konstrukcí biosenzoru. Pokud ani vhodně zvolená metoda imobilizace biokomponenty na povrch převodníku nezabrání vzniku interferencí, je třeba předřadit imobilizovanému enzymu ještě další membránu, která zabraňuje přístupu elektroaktivních látek k povrchu elektrody.

4.1. Polymerní selektivní membrány

Zabránit přístupu makromolekul k povrchu elektrody umožní tenká selektivní membrána. Nejčastěji se k tomu účelu používá celulozoacetátová membrána²² o tloušťce asi 20 μm . Sittampalam a Wilson⁶¹ užívají hustou celulozoacetátovou membránu k odstranění vlivu většiny molekul v biologickém vzorku, zatímco peroxid vodíku touto membránou prochází. Takto hustá membrána zabraňovala přístupu molekul k elektrodovému povrchu, ale zároveň značně snižovala signál peroxidu vodíku. Zlepšení vlastností této membrány bylo dosaženo hydrolyzou. Kuhn a Weber⁶² publikovali metodu, která popisuje přípravu selektivní celulozoacetátové membrány, která zadržuje molekuly větší jak 5000 Da, ale zároveň poskytuje reprodukovatelný signál reprezentující odezvy malých molekul. Vlastnosti celulozoacetátové membrány byly porovnávány s vlastnostmi membrán⁶³ z polykarbonátu, polyuretanu a polyethersulfonátu z pohledu řešení interferencí elektroaktivních látek. Bylo zjištěno, že celulozoacetátová membrána je ze všech studovaných membrán nejméně vhodná jako selektivní membrána pro elektroaktivní sloučeniny, neboť nezabrání úplně průchodu kyseliny askorbové k elektrodě a navíc značně snižuje signál peroxidu vodíku. Její vlastnosti se navíc mění se změnou pH, nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 6, ale už hodnota pH 7,4 značně zhoršuje selektivitu membrány.

4.2. Nevodivé polymery jako selektivní membrány

Protože úpravou povrchu platinové elektrody pomocí výše uvedených polymerů bylo dosaženo jen částečných úspěchů, byla zde snaha o vytvoření takových membrán, které by elektroaktivní látky eliminovaly úplně a zároveň přitom nesnižovaly analytický signál, jinak řečeno nezabraňovaly difuzi enzymově vzniklého peroxidu vodíku k povrchu elektrody. Vodivé elektropolymerační membrány, které se používají k imobilizaci enzymů, tyto problémy obvykle neřeší.

Novější nevodivé membrány⁶⁴, které vznikají rovněž elektropolymerací, mají podobné vlastnosti jako vodivé

polymery, navíc ještě nabízejí vysokou selektivitu a reprodukovatelnost. Stejně jako vodivé polymery mohou být matricí pro imobilizaci enzymů. Hlavní výhodou těchto filmů je schopnost eliminovat elektrochemické interference způsobené látkami, jako je kyselina askorbová, močovina, kyselina močová, acetaminofen a řada dalších látek. Semipermeabilní membrána současně zabraňuje ulpívání makromolekul na povrchu elektrody. Nevodivé polymery jsou charakterizovány vysokým měrným odporem, růst polymeru je limitován, vznikající film je tenčí než u vodivého polymeru a dosahuje tloušťky v řádech desítek nanometrů, což ulehčuje difuzi peroxidu vodíku k elektrodě a také difuzi substrátů a produktů k a od imobilizovaného enzymu.

Nevodivé filmy⁶⁴ vznikají elektropolymerací fenolů⁶⁵ a jejich derivátů, fenyldiaminů a úplnou oxidací pyrrolu. Tabulka I uvádí přehled různých nevodivých polymerů a jejich použití pro konkrétní stanovení. Vedle fenolů může dojít také k polymerizaci dalších fenolových derivátů⁶⁴ jako např. 3-nitrofenolu, pyrogallolu, 4-hydroxybenzensulfonové kyseliny a bromfenolové modři. Bartlett udává⁶⁶, že elektropolymerizací fenolu na platinové elektrodě vzniká tenký film o tloušťce 38 nm. Součástí vodného roztoku fenolu byla glukosaoxidasa, vzniklý nevodivý film zaručoval difuzi substrátu a produktu k a od enzymu a zároveň zabraňoval interferencím elektroaktivních látek. Nakabayashi testoval pět různých derivátů⁶⁷ fenolu, z nichž se jako nejvhodnější pro stanovení glukosy osvědčil nevodivý film vzniklý polymerací 3-aminofenolu. Pokud se k polymeraci zvolí monomery s určitými funkčními skupinami, může být enzym během polymerace kovalentně imobilizován do struktury nevodivého filmu. Glukosaoxidasa může být kovalentně navázána⁶⁸ na volné aminoskupiny polytyraminového filmu pomocí 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu hydrochloridu a *N*-hydroxysukcinimidu.

Další skupina nevodivých polymerů vzniká elektropolymerací fenyldiaminů. Nejčastěji je k elektropolymeraci volen 1,2-diaminobenzen^{69,70}. Film poly(1,2-diaminobenzenu) byl využit při konstrukci biosenzoru⁷¹ pro *in vivo* stanovení L-laktátu a glukosy v mozku krys. Jedním z hlavních problémů, které vznikají u implantovatelných biosenzorů⁷², je tvorba fibrinu při kontaktu zařízení s krví. Tento problém lze řešit společnou imobilizací glukosaoxidasy a heparinu do struktury nevodivého poly(1,2-diaminobenzenu). Daily⁷³ pokryl elektrodu tenkým filmem poly(1,3-diaminobenzenu), aby nedocházelo k nánosům makromolekulárních látek na povrchu elektrody. Elektroda byla chráněna od interferencí v prostředí plasmy, krevního séra či moče, ne však v plné krvi. Pro zachycení glukosaoxidasy byla zvolena polymerní nevodivá matrice, která vznikla elektropolymerací 1,4-diaminobenzenu⁷⁴. Nevodivý polymer, který vzniká elektropolymerací *p*-chlorfenylaminu⁷⁵, významně redukuje vliv elektroaktivních sloučenin.

Polypyrrolové filmy se řadí mezi vodivé polymery, jejich další oxidací⁷⁶ na elektrodě vznikají nevodivé filmy v literatuře označované „overoxidized pyrrol“. Vodivý

Tabulka I

Aplikace amperometrických biosenzorů založených na nevodivých polymerech

Typ monomeru	Aplikace – komentář	Lit.
<i>Fenolové filmy</i>		
Fenol	elektropolymerace na Pt-elektrodě, eliminuje interference elektroaktivních látek	77
Fenol	elektropolymerace 25 mmol l ⁻¹ fenolu, potenciál v rozsahu 0,00–0,95V, vodné prostředí v přítomnosti GOD, tloušťka filmu 38 nm, stanovení glukosy, eliminuje interference elektroaktivních látek	66
3-Aminofenol	elektropolymerace v přítomnosti GOD, senzor minimalizuje interference kyseliny močové, kyseliny askorbové	67
Fenol Acetaminofen 1,2-DHB 1,3-DHB 1,4-DHB 4-Aminofenol 1,3,5-THB 1,2,3-THB	elektropolymerace na Pt-elektrodě, selektivní a rychlá odezva, současná imobilizace enzymu	78
Fenol+tyramin	současná polymerace fenolu a monomeru, který má funkční skupiny – tyraminu, zavedení funkčních skupin umožní kovalentní vazbu mezi enzymem a maticí, vazba pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu hydrochloridu a <i>N</i> -hydroxysukcinimidu	68
Fenol Dopamin	elektroda byla pokryta filmem v prostředí 5 mmol l ⁻¹ fenolu nebo 5 mmol l ⁻¹ dopaminu při polarizačním napětí +0,65 V po dobu 1–2 h, byly studovány interference askorbátu a 4-aminofenonu glukosový senzor vznikl imobilizováním GOD na vzniklý film pomocí glutaraldehydu, interference paracetamolu byly potlačeny	79
<i>Fenylendiaminové filmy</i>		
1,2-DAB	stanovení glukosy v lidském krevním séru, GOD byla imobilizována s BSA glutaraldehydem na povrch filmu, dobrá opakovatelnost stanovení, antiinterferenční vlastnosti se zhoršují s časem v důsledku špatné stability polymeru, senzor je stabilní 45 dní při denním použití	80
1,2-DAB	stanovení glukosy v plné krvi <i>in vivo</i> monitoring, enzym zachycen v polymerní matici, vnější membrána nafion, interference nejsou úplně uspokojivé, čas odezvy: 33±13 s	81
1,2-DAB	stanovení glukosy a laktátu v mozku krysy, <i>in vivo</i> , interference proteinů a elektroaktivních látek byly eliminovány	71
1,2-DAB	stanovení glukosy v krevním séru, enzym byl zachycen v sol-gelu na povrchu 1,2-DAB a stabilizován glutaraldehydem, askorbát a urát byly eliminovány z 99,6 %, doba odezvy 15 s, linearita do 2 mmol l ⁻¹ glukosy	82
1,2-DAB	stanovení laktátu v krevním séru, jedнокroková příprava, vliv 0,1 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,08 mmol l ⁻¹ cysteinu, 0,5 mmol l ⁻¹ urátu a 0,2 mmol l ⁻¹ paracetamolu byl eliminován, doba odezvy 4–5 s	83
1,2-DAB	stanovení glutamátu v mikrodialyzátu z mozku, detekční limit 0,3 μmol l ⁻¹ , lineární odezva do 30 μmol l ⁻¹ , eliminuje interference 0,5 mmol l ⁻¹ askorbátu	84
1,3-DAB	stanovení glukosy v puftru, moči, krevním séru a v krvi, eliminace interferencí, ne však v plné krvi	73
1,3-DAB	stanovení glukosy v krevním séru, film 1,3-DAB vznikl v přítomnosti GOD a nafionu, pro dosažení selektivity byla vytvořena druhá vrstva 1,3-DAB, vnější membrána PVC, stanovení glukosy do 2,7 mmol l ⁻¹ , eliminace interferencí do 0,125 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,33 mmol l ⁻¹ urátu a 0,13 mmol l ⁻¹ paracetamolu, doba odezvy 37 s	85

Tabulka I
pokračování

Typ monomeru	Aplikace – komentář	Lit.
1,3-DAB	monitorování laktátu <i>in vivo</i> , LO zachycena v polymeru, vnější membrána polyuretan, stanovení laktátu do 0,3 mmol l ⁻¹ , eliminace interferencí askorbátu, cysteinu, urátu a paracetamolu ve fyziologických koncentracích, doba odezvy 20 s	86
1,3-DAB	stanovení laktátu v krevní plasmě, LO byla zachycena v polymeru, vnější membrána PVC, stanovení do 0,3 mmol l ⁻¹ laktátu, eliminace interferencí do 0,125 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,33 mmol l ⁻¹ urátu a 0,13 mmol l ⁻¹ paracetamolu, doba odezvy 60 s	87
1,3-DAB	stanovení kreatininu v krevním séru, kreatinasa a sarkosinoxidasa byly zachyceny v polymeru, vnější membrána HEMA/naftion – ochrana před makromolekulami, doba odezvy 1 min, eliminace vlivu 0,16 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,16 mmol l ⁻¹ paracetamolu	88
1,3-DAB/resorcinol	stanovení galaktosy v krevním séru, limit detekce 0,1 mmol l ⁻¹ , elektroda nejprve pokryta naftionem, pak elektropolymerace, enzym imobilizován pomocí glutaraldehydu, doba odezvy 18 s, bylo eliminováno 99,82 % interferencí askorbátu, 99,97 % urátu a 99,89 % paracetamolu	89
1,3-DAB/resorcinol	stanovení hypoxantinu ve zředěném rybím extraktu, enzym byl imobilizován na elektrodě pomocí glutaraldehydu, pak byla provedena polymerace, doba odezvy 2 minuty, lineární rozsah: 5–300 μmol l ⁻¹ , eliminace interferencí urátu	90
1,4-DAB	stanovení glukosy, GOD zachycena v polymeru, lineární rozsah do 6 mmol l ⁻¹ , doba odezvy méně jak 4 s, byly eliminovány interference laktátu, sacharosy a močoviny	74
<i>p</i> -Chlorfenylamin	stanovení glukosy, senzor eliminuje interference elektroaktivních látek, vnitřní vrstva naftionu navíc zvyšuje stabilitu, lineární rozsah do 10 mmol l ⁻¹ , stanovení s korelačním koeficientem 0,9988	75
<i>„Overoxidized pyrrol“</i>		
PPY _{ox}	stanovení glukosy v krevním séru, polypyrrol vznikl v 10 mmol l ⁻¹ KCl ve vodném roztoku (tloušťka 0,67 μm) a pak dále oxidován ve fosfátovém pufru, doba odezvy 4 s, senzor eliminuje běžné interference	91
PPY _{ox}	stanovení glukosy v živém králíku, senzor připraven stejným způsobem jako v [91], eliminace interferencí do 0,5 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,1 mmol l ⁻¹ cysteinu a 0,4 mmol l ⁻¹ urátu, kontinuální stanovení pomocí implantované elektrody	92
PPY _{ox}	stanovení glukosy v nealkoholických nápojích, senzor připraven jako [91], lineární rozsah do 500 mmol l ⁻¹ byl zajištěn druhou imobilizací volného enzymu ve vnější vrstvě	93
PPY _{ox}	stanovení glukosy v krevním séru, zachycení GOD v PPY _{ox} v přítomnosti glutaraldehydu a BSA, doba odezvy 1,2±0,4 s, byl eliminován vliv askorbátu (0,1 mmol l ⁻¹), cysteinu (0,08 mmol l ⁻¹), urátu (0,5 mmol l ⁻¹) a paracetamolu (0,2 mmol l ⁻¹)	76
PPY _{ox}	stanovení cholesterolu ve zředěném séru, polypyrrolový film vznikl ve fosfátovém pufru s KCl, pH 7,0 a pak jeho další oxidací ve fosfátovém pufru, signál askorbátu a urátu se snížil na 20 resp. 15 % původního signálu	52
PPY _{ox}	stanovení fruktosy v dietních potravinách, D-fruktosodehydrogenasa byla zachycena v polymerním filmu společně s mediátorem na Pt-elektrodě, druhá vrstva byla vytvořena bez mediátoru s pomocí glutaraldehydu a BSA, doba odezvy 8–15 s, lineární rozsah 0,1–0,8 mmol l ⁻¹ , při stanovení 0,198 mmol l ⁻¹ fruktosy byl vliv 0,2 mmol l ⁻¹ askorbátu 10 %	94

Tabulka I
pokračování

Typ monomeru	Aplikace – komentář	Lit.
<i>Jiné nevodivé polymery</i>		
5-Amino-1-naftol	stanovení glukosy, elektropolymerace v 5 mmol l ⁻¹ 5-amino-1-naftolu (rozpuštěný v 0,1 mol l ⁻¹ NaCl, pH 1, upraveno koncentrovanou HCl) při potenciálu +0,65 V proti Ag/AgCl elektrodě po dobu 30 min, na tuto membránu aplikována elektropolymerací další imobilizační membrána GOD v 1,3-DAB, senzor má vysokou citlivost k H ₂ O ₂ a eliminuje interference elektroaktivních látek (kyselina askorbová, acetaminofen)	95
2,3-DAN 1,5-DAN 1,8-DAN 5-Amino-naftol	byla sledována odezva H ₂ O ₂ na elektrodě potažené vrstvou polymeru a vliv interference 0,1 mmol l ⁻¹ askorbátu, 0,1 mmol l ⁻¹ acetaminofenu a 0,3 mmol l ⁻¹ urátu, elektropolymerace byla prováděna v 5 mmol l ⁻¹ roztocích monomerů v dusíkové atmosféře při konstantním potenciálu +0,65 V proti Ag/AgCl po dobu 15 min, tyto filmy měly nižší průchodnost pro interference než polyfenylenové membrány	96
Eugenol	stanovení dopaminu v přítomnosti kyseliny askorbové, Pt elektroda byla pokryta filmem polyeugenolu metodou cyklické voltametrie v alkalickém prostředí	97
Eugenol	stanovení NO, selektivní membrána byla připravena elektropolymerací eugenolu v alkalickém prostředí cyklickou voltametrií, selektivita vůči nitritu, askorbátu, dopaminu při potenciálu 830 mV vůči Ag/AgCl	98

DHB – dihydroxybenzen, THB – trihydroxybenzen, DAB – diaminobenzen, PPY_{ox} – „overoxidized pyrrol“, DAN – diaminonaftalen, GOD – glukosaoxidasa, LO – laktát oxidasa, Pt – platina, BSA – hovězí sérový albumin, PVC – polyvinylchlorid

film polypyrrolu slouží k imobilizaci enzymů, stejně jako „overoxidized pyrrol“, který navíc zlepšuje selektivitu konstruovaného biosenzoru. Tento nevodivý film umožňuje stanovení glukosy v mikromolárních koncentracích za přítomnosti fyziologických koncentrací askorbátu, urátu, cysteinu a acetaminofenu.

Substituované sloučeniny naftalenu⁹⁶ jsou také schopné vytvářet nevodivé filmy, které mohou poskytnout ochranu před vlivem elektroaktivních látek. Byla zkoumána celá řada derivátů: 2,3-diaminonaftalen, 1,5-diaminonaftalen, 1,8-diaminonaftalen, 5-amino-1-naftol. Polymery těchto derivátů snižují analytický signál na elektrodě, a to jak peroxidu vodíku, tak i interferenčních látek: askorbátu, urátu či acetaminofenu. Selektivní vrstva na Pt elektrodě vznikne také elektropolymerací 4-allyl-2-methoxyfenolu (eugenolu) v alkalickém prostředí cyklickou voltametrií. Takto modifikovaný povrch slouží pro stanovení dopaminu⁹⁷ v přítomnosti kyseliny askorbové či stanovení oxidu dusnatého^{98,99}.

5. Difuzní membrány a biokompatibilita

Konstrukce amperometrických biosenzorů je obvykle multivrstvá, kromě biorekogniční vrstvy nesoucí enzym a ochranné vrstvy, která zabraňuje přístupu elektroaktivních látek k elektrodě, jsou biosenzory navíc často překryty ještě vnější membránou. Substráty přistupují

k membránovému systému konvenční difuzí z analyzovaného roztoku. Rychlost tohoto přístupu závisí převážně na rychlosti a způsobu míchání, nebo na rychlosti průtoku měřicí celou. Přes vnější membránu do prostoru enzymové matrice procházejí substráty a vystupují produkty enzymové reakce difuzí. Koncentrace analytu v enzymové matrici je odlišná od koncentrace v měřeném vzorku a je ovlivněna difuzí, tedy vlastnostmi vnější membrány. Na výsledný analytický signál má tedy vliv jak rychlost enzymové reakce, tak difuze, která určí, jaká část analytu se dostane do enzymové matrice. Vnější membrána musí být kompatibilní s prostředím, ve kterém má biosenzor pracovat. Jiné nároky jsou kladeny na vlastnosti vnější membrány, pokud bude pracovat ve vodném prostředí a jiné, pokud bude implantována do živého organismu. Při implantování biosenzoru do živého organismu může nastat nepříznivá reakce organismu na povrchovou vrstvu zařízení. V organismu tím může dojít k zánětlivé reakci, zarůstání zařízení do tkáně. Tyto jevy zatěžují organismus a na druhé straně také poškozují a znehodnocují vlastní stanovení.

Pokud má mít biosenzor dlouhou životnost při analýze biologických směsí, musí být překryt vnější membránou, která zamezí ulpívání makromolekul na svém povrchu. Při konstrukci biosenzoru je vhodné zvolit pro vnější membránu takový materiál, který by bránil růstu mikroorganismů na svém povrchu. Přítomnost mikroorganismů často vede ke spotřebování kyslíku v okolí membrány a tím i k nedostatečné difuzi kyslíku do enzymové vrstvy,

což může mít za následek ovlivnění enzymové reakce.

Aplikace vnější membrány při konstrukci biosenzoru zlepšuje jeho linearitu a prodlužuje životnost¹⁰⁰. Vnější membrána také zajišťuje preventivní ochranu před interferencemi a prodlužuje operační stabilitu při kontinuálním monitorování. Pro přípravu vnější membrány byla často volena polyuretanová vrstva¹⁵, která má hydrofóbní biokompatibilní charakter. Nověji se pro přípravu vnější membrány použil hydrofilní polyuretan¹⁰¹, který je navíc vhodný také pro imobilizaci biomolekul. Jako vnější membrána se osvědčily další materiály, jako je naftion¹⁰², polykarbonát¹⁰³, silikonový kaučuk¹⁰⁴, silikonová porézní membrána¹⁰⁵ či perfluorkarbonát¹⁰⁶. Han vytvořil nové typy vnějších membrán¹⁰⁰ pro stanovení glukosy jak v pufrovaném roztoku, tak také v krevním séru. Nové membrány vznikly smícháním hydrofilního polyuretanu (HPU) s kopolymerem polyvinylalkohol/vinylbutyralu (PVAB) v různých poměrech. Jako optimální poměr HPU:PVAB byl pro stanovení glukosy v krevním séru nalezen poměr 3:2.

Největší komplikace při stanovení látek nastávají, pokud se analyzuje plná krev. Tyto biosenzory mají obvykle životnost pouze několik dní a dobu odezvy pár minut¹⁰⁷. Matuszewski upravil vnější membránu¹⁰⁸ při analýze v plné krvi ponořením polypropylenové membrány do směsi různých polyoxyethylenetherů (Triton X-100).

6. Závěr

Od zkonstruování prvního biosenzoru uplynulo víc jak padesát let. Na počátku byl enzym a převodník, tento základ zůstává, jen dnešní biosenzory jsou mnohem inteligentnější, přesnější, selektivnější, rychlejší a miniaturnější. Všude kolem v přírodě, v rostlinách a živých organismech působí tisíce enzymů, které katalyzují veškeré projevy života. Z této zásobárny enzymů čerpáme, pokud zamýšlíme konstruovat konkrétní biosenzor pro stanovení konkrétní látky. Podle průběhu a typu analytické reakce, kterou enzym katalyzuje, je pak volen optimální převodník. Zkušenosti víc jak padesátileté nám dnes nabízejí nejrůznější metody imobilizace biorekogniční vrstvy, ochrany před vlivem interferencí a volby optimálních podmínek pro difuzi látek. Pro široké uplatnění biosenzorů v praxi bylo zapotřebí zajistit dostatečnou dostupnost levných systémů pro jejich produkci. Vycházelo se především ze zkušeností elektronického průmyslu, kde výroba obdobných součástek byla dobře zvládnuta. Konstrukce amperometrických biosenzorů je velmi blízká této oblasti.

Dnes se při konstrukci biosenzorů začíná uplatňovat mikrosystémová technologie, která zahrnuje výrobu miniaturních zařízení rozměrů menších jak 1 mm. Do popředí zájmu se dostává při konstrukci biosenzorů také nanotechnologie. V budoucnu lze očekávat integrované systémy, které budou na jediném čipu obsahovat několik různých biosenzorů, včetně průtokového systému, kalibrátorů a vyhodnocovacího systému.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM 6198959216.

LITERATURA

- Gülce H., Gülce A., Yildiz A.: *Anal. Sci.* 18, 147 (2002).
- Moatti-Sirat D., Reach G., Velho G.: *Biosens. Bioelectron.* 7, 345 (1992).
- Kost G. J., Nguyen T. H., Tang Z.: *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 1128 (2000).
- Curulli A., Palleschi G.: *Proceedings of The 2nd Workshop on Chemical Sensors and Biosensor*, 2000, s. 439–444.
- Anzai J., Takeshita H., Kobayashi Y., Osa T., Hoshi T.: *Anal. Chem.* 70, 811 (1998).
- Petřivalský M., Skládal P., Macholán L., Volc J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 1126 (1994).
- Park K.-Y., Kim H.-J., Kim W.-Y., Jeong Y.-S., Lee Y.-S.: *Bull. Korean Chem. Soc.* 22(9), 1049 (2001).
- Macholán L., Chmelíková B.: *Anal. Chim. Acta* 185, 187 (1986).
- Crombliss A. L., Stonehuerner J., Henkens R., O'Daly J. P., Zhao J.: *New. J. Chem.* 18, 327 (1994).
- Ellerby L. M., Nishida C. R., Nishida F., Yamanaka S. A., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I.: *Science* 255, 1113 (1992).
- Glezer V., Lee O.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2533 (1993).
- Besombes J. L., Labbé P., Reverdy G.: *Journées d'automne de la Société Française de Chimie, Lyon, France* (1993).
- Poyard S., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Cosnier S., Labbe P., Besombes J. L.: *Sens. Actuators*, B 33, 44 (1996).
- Liu Z., Liu B., Zhang M., Kong J., Deng J.: *Anal. Chim. Acta* 392, 135 (1999).
- Chen X., Hu Y., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 17, 1005 (2002).
- Peter J., Hutter W., Stöllnberger W., Hampel W.: *Biosens. Bioelectron.* 11, 1215 (1996).
- Cosnier S., Szunerits S., Marks R.S., Novoa A., Puech L., Perez E., Rico-Lattes I.: *Talanta* 55, 889 (2001).
- Kumar H., Kumar A., Kumari P., Jyotirmai S., Tulsani N. B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30, 231 (1999).
- Švitel J., Čurilla O., Tkáč J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 153 (1998).
- Mutlu M., Piskin E.: *Proc. Ist National Macromolecules Symposium, Ankara* (1983).
- Esti M., Volpe G., Massignan L., Compagnone D., La Notte E., Palleschi G.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 4233 (1998).
- Mascini M., Mazzei F., Moscone D., Calabrese G., Benedetti M. M.: *Clin. Chem.* 33, 591 (1987).
- Scarciglia L., Compagnone D., Federici G., Palleschi

- G.: *Analysis* 26, 219 (1998).
24. Watanabe E., Takagi M., Takei S., Hoshi M., Shu-Gui C.: *Biotechnol. Bioeng.* 38, 99 (1991).
 25. Mizutani F., Yabuki S., Iijima S.: *Electroanalysis* 13, 370 (2001).
 26. Vidal J.-C., Garcia-Ruiz E., Castillo J.-R.: *Microchim. Acta* 143, 93 (2003).
 27. Vernitskaya T. V., Efimov O. N., : *Russ. Chem. Rev.* 66, 443 (1997).
 28. Dicks J. M., Cardosi M. F., Turner A. P. F., Karube I.: *Electroanalysis* 5, 1 (1993).
 29. Mu S. L., Xue H. G.: *Sens. Actuators, B* 31, 155 (1996).
 30. Kumar A., Rajesh, Chaubey A., Grover S. K., Malhotra B. D.: *J. Appl. Polym. Sci.* 82, 3486 (2001).
 31. Gajovic N., Habermuller K., Warsinke A., Schuhmann W., Scheller F. W.: *Electroanalysis* 11, 1377 (1999).
 32. Hämmerle M., Schuhmann W., Schmidt H.-L.: *Sens. Actuators, B* 6, 106 (1992).
 33. Milagres B. G., Neto G. O., Kubota L. T., Yamanaka H.: *Anal. Chim. Acta* 347, 35 (1997).
 34. Chaubey A., Gerard M., Singhal R., Singh V. S., Malhotra B. D.: *Electrochim. Acta* 46, 723 (2000).
 35. Mc Ardle F. A., Persaud K. C.: *Analyst* 118, 419 (1993).
 36. Trojanowicz M., Geschke O., Krawczynski V., Krawczyk T.: *Sens. Actuators, B* 28, 191 (1995).
 37. Rüdél U., Geschke O., Cammann K.: *Electroanalysis* 8, 1135 (1996).
 38. Yifei Y., Shaolin M.: *J. Electroanal. Chem.* 432, 71 (1997).
 39. Shaolin M., Jinqing K., Jianbing Z.: *J. Electroanal. Chem.* 334, 121 (1992).
 40. Schuhmann W.: *Synth. Met.* 41-43, 429 (1991).
 41. Yon Hin B. F. Y., Smolander M., Crompton T., Lowe C. R.: *Anal. Chem.* 65, 2067 (1993).
 42. Yon Hin B. F. Y., Lowe C. R.: *J. Electroanal. Chem.* 374, 167 (1994).
 43. Vidal J. C., Garcia E., Castillo J. R.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 371 (1998).
 44. Sung W. J., Bae Y. H.: *Anal. Chem.* 72, 2177 (2000).
 45. Habermuller K., Schuhmann W.: *Electroanalysis* 18, 1281 (1998).
 46. Reiter S., Habermuller K., Schuhmann W.: *Sens. Actuators, B* 79, 150 (2001).
 47. Cooper J. C., Hall E. A. H.: *Biosens. Bioelectron.* 7, 473 (1992).
 48. Skinner N. G., Hall E. A. H.: *J. Electroanal. Chem.* 420, 179 (1997).
 49. Compagnone D., Federici G., Bannister J. V.: *Electroanalysis* 7, 1151 (1995).
 50. Tatsuma T., Gondaira M., Watanabe T.: *Anal. Chem.* 64, 1183 (1992).
 51. Trettnak W., Lioni I., Mascini M.: *Electroanalysis* 5, 753 (1993).
 52. Vidal J. C., Garcia E., Castillo J. R.: *Anal. Chim. Acta* 385, 213 (1999).
 53. Uchiyama S., Hasebe Y., Tanaka M.: *Electroanalysis* 9, 176 (1997).
 54. Xue H. G., Shen Z. Q.: *Talanta* 57, 289 (2002).
 55. Kizilyar N., Akbulut U., Toppare L., Ozden M. Y., Yagci Y.: *Synth. Met.* 104, 45 (1999).
 56. Dobay R., Harsanyi G., Visy C.: *Anal. Chim. Acta* 385, 187 (1999).
 57. Vidal J. C., Garcia E., Castillo J. R.: *Sens. Actuators, B* 57, 219 (1999).
 58. Vidal J. C., Garcia E., Castillo J. R.: *Electroanalysis* 13, 229 (2001).
 59. Vidal J. C., Garcia E., Mendez S., Yarnoz P., Castillo J. R.: *Analyst* 124, 319 (1999).
 60. Palmisano F., Centonze D., Malitesta C., Zambonin P. G.: *Anal. Chem.* 67, 2207 (1995).
 61. Sittampalam G., Wilson G. S.: *Anal. Chem.* 55, 1608 (1983).
 62. Kuhn L. S., Weber S. G., Ismail K. Z.: *Anal. Chem.* 61, 303 (1989).
 63. Alp B., Mutlu S., Mutlu M.: *Food Res. Int.* 33, 107 (2000).
 64. Yuqing M., Jianrong C., Xiaohua W.: *Trends Biotechnol.* 22, 227 (2004).
 65. Nakabayashi Y., Yoshikawa H.: *Anal. Sci.* 16, 609 (2000).
 66. Bartlett P. N., Cooper J. M.: *J. Electroanal. Chem.* 362, 1 (1993).
 67. Nakabayashi Y., Wakuda M., Imai H.: *Anal. Sci.* 14, 1069 (1998).
 68. Situmorang M., Gooding J. J., Hibbert D. B., Barnett D.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 953 (1998).
 69. Jang D. H., You Y. S., Oh S. M.: *Bull. Korean Chem. Soc.* 16, 392 (1995).
 70. Somasundrum M., Aoki K.: *J. Electroanal. Chem.* 530, 40 (2002).
 71. Yao T., Yano T., Nanjyo Y., Nishino H.: *Anal. Sci.* 19, 61 (2003).
 72. Wang J., Chen L., Hocevar S. B., Ogorevc B.: *Analyst* 125, 1431 (2000).
 73. Daly D. J., Sullivan C. K. O., Guilbault G. G.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 89 (2000).
 74. Ekinici E., Karagözler A. A., Karagözler A. E.: *Synth. Met.* 79, 57 (1996).
 75. Xu J.-J., Yu Z.-H., Chen H.-Y.: *Anal. Chim. Acta* 463, 239 (2002).
 76. Guerrieri A., De Benedetto G. E., Palmisano F., Zambonin P. G.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 103 (1998).
 77. Carelli I., Chiarotto I., Curulli A., Palleschi G.: *Electrochim. Acta* 41, 1793 (1996).
 78. Eddy S., Warriner K., Christie I., Ashworth D., Purkiss C., Vadgama P.: *Biosens. Bioelectron.* 10, 831 (1995).
 79. Christie I. M., Vadgama P.: *Anal. Chim. Acta* 274, 191 (1993).
 80. Sasso S. V., Pierce R. J., Walla R., Yacynych A. M.: *Anal. Chem.* 62, 1111 (1990).

81. Moussy F., Harrison D. J., O'Brien D. W., Rajotte R. V.: *Anal. Chem.* **65**, 2073 (1993).
82. Yao T., Takashima K.: *Biosens. Bioelectron.* **13**, 67 (1998).
83. Palmisano F., Centonze D., Zambonin P. G.: *Biosens. Bioelectron.* **9**, 471 (1994).
84. Berners M. O. M., Boutelle M. G., Fillenz M.: *Anal. Chem.* **66**, 2017 (1994).
85. Abdel-Hamid I., Atanasov A., Wilkins E.: *Anal. Chim. Acta* **313**, 45 (1995).
86. Marzouk S. A. M., Cosofret V. V., Buck R. P., Yang H., Cascio W. E., Hassan S. S. M.: *Talanta* **44**, 1527 (1997).
87. Yang Q., Atanasov P., Wilkins E.: *Biosens. Bioelectron.* **14**, 203 (1999).
88. Madaras M. B., Buck R. P.: *Anal. Chem.* **68**, 3832 (1996).
89. Manowitz P., Stoecker P. W., Yacynych A. M.: *Biosens. Bioelectron.* **10**, 359 (1995).
90. Nguyen A.-L., Luong J. H. T., Yacynych A. M.: *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 729 (1991).
91. Centonze D., Guerrieri A., Malitesta C., Palmisano F., Zambonin P. G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **342**, 729 (1992).
92. Palmisano F., Centonze D., Guerrieri A., Zambonin P. G.: *Biosens. Bioelectron.* **8**, 393 (1993).
93. Centonze D., Zambonin C. G., Palmisano F.: *J. AOAC Int.* **80**, 829 (1997).
94. Garcia C. A. B., de Oliveira Neto G., Kubota L. T.: *Anal. Chim. Acta* **374**, 201 (1998).
95. Chung T. D.: *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 291 (2003).
96. Murphy L. J.: *Anal. Chem.* **70**, 2928 (1998).
97. Ciszewski A., Milczarek G.: *Anal. Chem.* **71**, 1055 (1999).
98. Hrbáč J., Gregor Č., Machová M., Králová J., Bystroň T., Číž M., Lojek A.: *Bioelectrochemistry* **71**, 46 (2007).
99. Patel B. A., Arundell M., Parker K. H., Yeoman M. S., O'Hare D.: *Anal. Chem.* **78**, 7643 (2006).
100. Han J. H., Taylor J. D., Kim D. S., Kim Y. S., Kim Y. T., Cha G. S., Nam H.: *Sens. Actuators, B* **123**, 384 (2007).
101. Cho Y. A., Lee H. S., Cha G. S., Lee Y. T.: *Biosens. Bioelectron.* **14**, 435 (1999).
102. Sun L.-X., Xu F., Okada T.: *Talanta* **47**, 1165 (1998).
103. Maines A., Ashworth D., Vadgama P.: *Anal. Chim. Acta* **333**, 223 (1996).
104. Schüler R., Wittkamp M., Chemnitz G.-C.: *Analyst* **124**, 1181 (1999).
105. Piechotta G., Alberts J., Hintsche R.: *Biosens. Bioelectron.* **21**, 802 (2005).
106. Matsumoto T., Ohashi A., Ito N., Fujiwara H., Matsumoto T.: *Biosens. Bioelectron.* **16**, 271 (2001).
107. Genshaw M. A.: *Clin. Chem.* **34**, 1717 (1988).
108. Matuszewski W., Trojanowicz M., Lewenstam A.: *Anal. Sci.* **10**, 423 (1994).

L. Zajoncová and K. Pospíšková (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Membranes for Amperometric Biosensors**

Biosensors consist of a biological entity that recognizes the target analyte and the transducer that translates the biorecognition event into an electrical signal. The use of biological materials as recognizing elements imparts to biosensors the ability to specifically respond to the analyte of interest, distinguishing it from structurally similar compounds. Amperometric biosensors are based on measurements of the electric current resulting from the oxidation or reduction of an electroactive species, by keeping a constant potential at the working electrode. Enzymes can be immobilized in a thin layer on the transducer surface. Besides the reactive layer or membrane many biosensors contain one or several inner or outer membranes with different functions. The protective inner membrane may decrease the influence of interfering species. The outer membrane serves as a diffusion-limiting barrier to the enzyme substrate. Biosensors are considered biocompatible if their implantation does not affect normal functioning of the host medium and, vice versa, the host medium does not materially affect their normal operation. The present review focuses on the immobilisation techniques and preparation and utilization of protective inner and outer diffusion-limiting membranes of amperometric biosensors.