

Voltammetric bienzymatic sensor for sucrose determination in honey

A.A. Kornii*, A.S. Borets, O.Y. Tananaiko**

Chemistry department, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Street, 64, 01601 Kyiv, Ukraine;
*e-mail: korniianastasiia@ukr.net; **e-mail: tananaiko@knu.ua

Received: February 22, 2021; Accepted: May 09, 2021

DOI: 10.17721/moca.2021.61-70

An electrochemical sensor based on nanostructured planar carbon electrodes (nanoSPCE) modified with a SiO₂ biocomposite film containing MnO₂ particles and enzymes glucose oxidase and invertase was developed. MnO₂ particles obtained by electrochemical deposition possessed electrocatalytic activity toward hydrogen peroxide. Glucose oxidase (GOx) and invertase (Inv) were encapsulated into SiO₂ film by method of electroassisted deposition. The electrode modified with biocomposite film nanoSPCE/MnO₂/GoX/Inv/SiO₂ was electroactive toward sucrose. The indicator reaction was oxidation of H₂O₂ – the product of bienzymatic reaction which was catalyzed by MnO₂ on the electrode surface. The linearity range of the calibration graph for the voltametric determination of sucrose using developed modified electrode is 0.017-0.342 mg/ml, the detection limit is 0.006 mg/ml. The obtained nanoSPCE/MnO₂/GoX/Inv/SiO₂ electrode demonstrated satisfactory stability of the analytical signal during one month of operation. The developed method was used for sucrose determination in the honey samples. The 50-fold molar excess of glucose and fructose does not interfere the determination of sucrose.

Keywords: screen printed nanostructured carbon electrode, manganese dioxide, glucose oxidase, invertase, hydrogen peroxide, sucrose, electrochemical sensor, biosensor, cyclic voltammetry, SiO₂ film

Вольтамперометричний біензимний сенсор для визначення сахарози в меді

A.A. Корній *, A.C. Борець, O.Y. Тананайко**

Хімічний факультет, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01601 Київ, Україна, ; *e-mail: korniianastasiia@ukr.net; **e mail: tananaiko@knu.ua.

Надійшла: 22 лютого 2021 р; Прийнята: 09 травня 2021 р

DOI: 10.17721/moca.2021.61-70

Розроблено вольтамперометричний сенсор для визначення сахарози на основі наноструктурованих планарних вугільних електродів (наноПВЕ), модифікованих MnO₂ і біокомпозитною плівкою SiO₂-глюкозооксидаза-інвертаза. Частинки MnO₂ одержані електроосадженням, а глюкозооксидаза та інвертаза інкапсульовані у плівці SiO₂, що нанесена на поверхню наноПВЕ/MnO₂ методом електроіндукованого осадження. Методом циклічної вольтамперометрії доведено, що наноПВЕ/MnO₂, модифікований біокомпозитною плівкою, електроактивний до сахарози. Індикаторною реакцією є окиснення гідроген пероксиду - продукту біферментативної реакції, що каталізується MnO₂ на поверхні електроду. Модифікований електрод демонструє задовільну стабільність аналітичного сигналу протягом місяця роботи. Діапазон лінійності градувального графіка для визначення сахарози за розробленою методикою: 0.017-0.342 мг/мл, межа виявлення становить 0.006 мг/мл. Методику було апробовано при визначенні сахарози у зразках меду. Визначенню сахарози не заважають 50-кратні молярні надлишки глюкози і фруктози.

Ключові слова: планарний вугільний наноструктурований електрод, діоксид мангану, глюкозооксидаза, інвертаза, гідроген пероксид, сахароза, електрохімічний біосенсор, циклічна вольтамперометрія, плівка SiO₂

Одним із важливих завдань сучасної аналітичної хімії є розробка простих та експресних методів аналізу та скринінгу якості продуктів харчування. Мед є природним джерелом енергії та цукрів для людини. До основних компонентів меду належать вуглеводи, вміст яких сягає 70-80 %, вода - 10-20 %, окрім того до складу меду входять білки, фенольні сполуки, мінерали, вітаміни та органічні кислоти згідно ДСТУ 4497-2005. Україна – один з п'яти найбільших у світі експортерів меду, саме тому важливим завданням є розробка надійних

і простих у використанні методик контролю його якості. Відомі випадки фальсифікації меду шляхом додавання сторонніх речовин, окрім того споживання бджолами промислових цукрів, знижує якість кінцевого продукту [1]. Важливим показником якості меду є вміст сахарози, який має становити не більше, ніж 3.5 та 6.0 % для зразків вищого та перших ґатунків відповідно. Для контролю вмісту цукрів у меді використовують: ВЕРХ [2], газову хроматографію [3], методи ІЧ- та Раман-спектроскопії [4], капілярний електрофорез

[5], а також ферментативні методи [6]. Недоліком хроматографічних методів є складне апаратне оформлення та висока вартість аналізу. Спектроскопічні методи є швидкими у виконанні, але характеризуються недостатньою селективністю. Ферментативні методи характеризуються високою селективністю завдяки селективному зв'язуванню субстрата з активним центром фермента і недорогим обладнанням. Зазвичай для визначення сахарози використовується біензимна система на основі ферментів гідролази та оксидоредуктази. Інвертаза каталізує процес гідролізу сахарози на глюкозу та фруктозу [7], глюкозооксидаза каталізує окиснення β -D-глюкози до D-глюконо- δ -лактону, що супроводжується утворенням гідроген пероксиду [8]. Недоліком методик визначення сахарози із застосуванням розчинів ферментів є їх низька стабільність і висока вартість препаратів ферментів. Альтернативою є застосування іммобілізованих ферментів. Активність більшості іммобілізованих ферментів залишається незмінною, або навіть зростає, а стабільність покращується [9]. Окрім того, іммобілізовані ферменти можна використовувати багаторазово. Біосенсиори на основі іммобілізованих інвертази та глюкозооксидази використовуються для визначення цукру у соках [10] та фруктах [11]. В основу індикаторних реакцій покладено детектування гідроген пероксиду - продукту перетворення глюкози [12]. Визначенню заважають відновники, що можуть бути присутні у досліджених об'єктах і окиснюються на електродах при тому ж потенціалі, що і H_2O_2 .

Перспективними є ензимосенсиори на основі планарних друкованих електродів ПДЕ [9, 13]. Такі електроди відрізняються мініатюрністю (розмір платформи, на якій надруковано робочий, допоміжний електроди, та електрод порівняння не перевищує 2 cm^2). Зазначена особливість дає можливість, проводити визначення аналіту на місці відбору, використовуючи лише 100-200 мкл проби [9, 14]. У роботі використано наноструктуровані планарні вугільні електроди (наноПВЕ) з ефективною площею поверхні більшою порівняно з класичними вугільними електродами [15].

Для закріплення ферментів на поверхні електродів перспективним є їх інкапсулювання у плівку SiO_2 за методом золь-гель синтезу [16]. Метод ґрунтується на накладанні негативного потенціалу на електрод, занурений у золь SiO_2 , що містить білки. При цьому на робочому електроді утворюється плівка SiO_2 у результаті електрогенерації OH^- іонів - каталізаторів золь-гель синтезу. Перевагами такого методу є простота виконання, висока швидкість модифікації поверхні робочого електроду та можливість контролювати морфологію плівки завдяки варіюванню потенціалу та часу електроосадження. Такий метод дозволяє інкапсулювати у плівку білки і одержувати

біокомпозитні матеріали у м'яких умовах синтезу із заданими структурними характеристиками. Метод електроіндукованого осаження дає можливість отримувати покриття SiO_2 на поверхні робочих планарних електродів складної геометрії [17]. Раніше було показано, що інкапсульовані таким чином у плівці ферменти зберігають конформаційну рухливість і біокаталітичну активність [18, 19]. Зазначений метод раніше не застосовувався для інкапсулювання одразу двох ферментів - інвертази і глюкозооксидази, у плівці SiO_2 .

Електрохімічне детектування H_2O_2 на немодифікованих вугільних та металічних електродах має ряд проблем, а саме: високий анодний потенціал, який частково перебивається з потенціалом окиснення води та низький струм окиснення гідроген пероксиду. Це призводить до суттєвого заважаючого впливу більшості відновників які можуть бути присутні у зразку, що аналізується. Одним із можливих шляхів вирішення даної проблеми є модифікація електродів наночастинками металів або їх оксидами [20]. Наночастинки MnO_2 є одними з перспективних та доступних модифікаторів поверхні електродів. Відомо, що наноструктурований діоксид мангану на поверхні електроду проявляє електрокаталітичні властивості стосовно до гідроген пероксиду, зменшуючи потенціал його окиснення на 0.5 В [21]. Метод електрофоретичного осаження дозволяє отримати частинки MnO_2 на поверхні електроду, зануреного в розчин солі Mn(II) . Перевагами такого методу є можливість контролю розмірів частинок, рівномірності їх розподілу по поверхні електроду за рахунок регулювання величини анодного потенціалу і тривалості його прикладання, простота апаратного оформлення та відтворюваність результатів [22].

Метою даної роботи є розробка чутливого елементу вольтамперометричного біензимного сенсору на основі наноПВЕ, модифікованого частинками MnO_2 та біокомпозитною плівкою на основі SiO_2 з іммобілізованими інвертазою і глюкозооксидазою, та застосування отриманого електроду для визначення сахарози у зразках меду.

Експериментальна частина

Матеріали та методики досліджень

У роботі використовували тетраетоксисилан (TEOC), 98 %, фірми «Flucka»; Цетилтри-метиламоній бромід (ЦТАБ), фірми «Merck»; (3-амінопропіл) триетоксисилан, 99 %, фірми «SigmaAldrich»; хлоридну кислоту, гідроген пероксид, нітрат калію фірми «Merck», фосфатні буферні розчини готували з солей $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і KH_2PO_4 (99.5 %, «Merck»). Ферменти глюкозооксидаза (ГО) з *Aspergillus niger* та інвертаза (Інв) з *Candida utilis*, «SigmaAldrich» характеризувалися активністю 100.000 од/г та

300 од/мг відповідно. Усі розчини були отримані на бідистильованій воді. Наноструктуровані планарні вугільні електроди, наноПВЕ (виробник Orion Technology, Королівство Іспанія) складалися з триелектродної комірки, що була надрукована на поверхні полімерної підкладки. Робочий електрод діаметром 4 мм містив наночастинки вуглецю у вугільному чорнилі (згідно даних виробника діаметр частинок становив 20-60 нм), AgCl електрод порівняння, та допоміжний вугільний електрод.

Усі вольтамперометричні вимірювання проведено на потенціостаті EmStat 2 фірми Palm-Sens (Королівство Нідерландів). Для дослідження морфології поверхонь використовували наноПВЕ, модифіковані MnO_2 та плівкою SiO_2 . Аналіз проводили методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) та енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (EDX) було проведено наприладі Tescan Mira3 LMU скануючий електронний мікроскоп, фірми «Tescan», Чеська Республіка. Хроматографічні дослідження проводили з використанням рідинного хроматографа Agilent 1260 Infinity з рефрактометричним детектором.

Визначення методом ВЕРХ виконувалося за наступних умов: рухома фаза: ацетон:трип:вода (80:20), що попередньо фільтрували через мембранний фільтр $\varphi=0.45$ мкм; нерухова фаза: колонка Zorbax NH_2 (4.6 x 250 мм, 5 мкм), заповнена амінопропілсілілним силікагелем; рефрактометричний детектор (RID); температура детектора 30 °C; швидкість рухомої фази 2.0 мл/хв; температура колонки 25 °C; час хроматографування: 12 хв; об'єм інжекції 20 мкл.

Модифікування наноПВЕ проводили у кілька етапів. Частинки MnO_2 отримували на поверхні методом електрохімічного осадження з водних розчинів MnSO_4 та CH_3COOK , згідно методики [22]. Отримані електроди просушували у сушильній шафі при 100°C протягом 5 годин, отримували наноПВЕ/ MnO_2 . Наступним етапом було отримання золю діоксиду силіцію шляхом кислотного гідролізу ТЕОС та АПТЕС згідно [23]. Розчини ферментів глюкозооксидази (ГО) 7.5 мг/мл та інвертази (Інв) 10 мг/мл отримували шляхом розчинення наважки ферменту у бідистильованій воді. До золю SiO_2 додавали розраховану кількість ЦТАБ, водний розчин NH_3 для встановлення необхідного рН та за необхідності розчини відповідних ферментів. Аліквоту отриманої суміші об'ємом 50 мкл за допомогою мікропіпетки з дозатором наносили на поверхню наноПВЕ/ MnO_2 таким чином, щоб розчином були покриті усі три електроди та накладали на робочий електрод потенціал $E = -1.1$ В протягом 15 с. Через 1 хв електрод промивали водою і висушували протягом ночі. Одержували модифіковані електроди: наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{SiO}_2$, наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{ГО}/\text{SiO}_2$ та наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{ГО}/\text{Інв}/\text{SiO}_2$, які зберігалися у холодильнику при 4 °C.

При визначенні сахарози в меді з використанням розробленого модифікованого біферментного електрода, наважки меду масою 1.80-2.00 г розчиняли у 100 мл дистильованої води при температурі 35-40°C. До 3.8 мл бідистильованої води додавали 1 мл фосфатного буферу рН=7, 100 мкл 0.1М KNO_3 та 150 мкл розчину меду за допомогою автоматичної мікропіпетки з дозатором, розчин перемішували. Аліквоту отриманого розчину (100 мкл), наносили на поверхню наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{ГО}/\text{Інв}/\text{SiO}_2$ та проводили вимірювання методом ЦБА. Розгортка потенціалів від -1.0 В до 1.0 В, при швидкості сканування 100 мВ/с. Потенціал детектування $E = -0.5$ В. Аналогічно готували розчин меду з добавкою стандартного розчину сахарози та проводили відповідні вимірювання. Вміст сахарози у меді розраховували за методом стандартних добавок [24]. Результати визначення сахарози у меді за розробленою методикою було порівняно з результатами, отриманими методом ВЕРХ з використанням рефрактометричного детектора. При проведенні хроматографічних вимірювань за основу було взято стандартну методику визначення сахарози методом ВЕРХ [25]. Для цього наважки меду масою 2.5 г розчиняли у деіонізованій воді об'ємом 50 мл, розчин фільтрували крізь мембранний фільтр, діаметр пор - 0.45 мкм. Визначення проводили за методом зовнішнього стандарту.

Результати досліджень та їх обговорення

Електрохімічні характеристики модифікованих електродів досліджували методом циклічної вольтамперометрії (ЦБА). Вольтамперограми фонового розчину електроліту, за відсутності та у присутності гідроген пероксиду на наноПВЕ та наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{SiO}_2$ електродах опубліковані авторами раніше у [22]. На наноПВЕ/ MnO_2 електроді, спостерігається анодна хвиля при +0.6 В, і катодна при 0.2 В у фоновому розчині електроліту. Їх можна віднести до окисно-відновної пари $\text{Mn(IV)}/\text{Mn(II,III)}$, що підтверджує присутність частинок MnO_2 на поверхні наноПВЕ, отримані дані співвідносяться із даними наведеними у літературі [21, 24]. На вольтамперограмі наноПВЕ у присутності H_2O_2 спостерігається зростання струму окиснення-відновлення при $E = +1.0$ та -1.0 В, що відповідає електрохімічному окисненню-відновленню H_2O_2 . У присутності гідроген пероксиду на наноПВЕ/ MnO_2 пік окиснення при $E = 0.6$ В зростає пропорційно збільшенню концентрації H_2O_2 (рН 7-8), а пік відновлення зменшується, що свідчить про проходження каталітичної реакції між H_2O_2 і MnO_2 на поверхні наноПВЕ/ MnO_2 . Згідно літературних даних [26] на модифікованому електроді спочатку відбувається хімічне окиснення гідроген пероксиду діоксидом мангану, що супроводжується утворенням відновлених форм Mn(III) і Mn(II) . Далі має місце

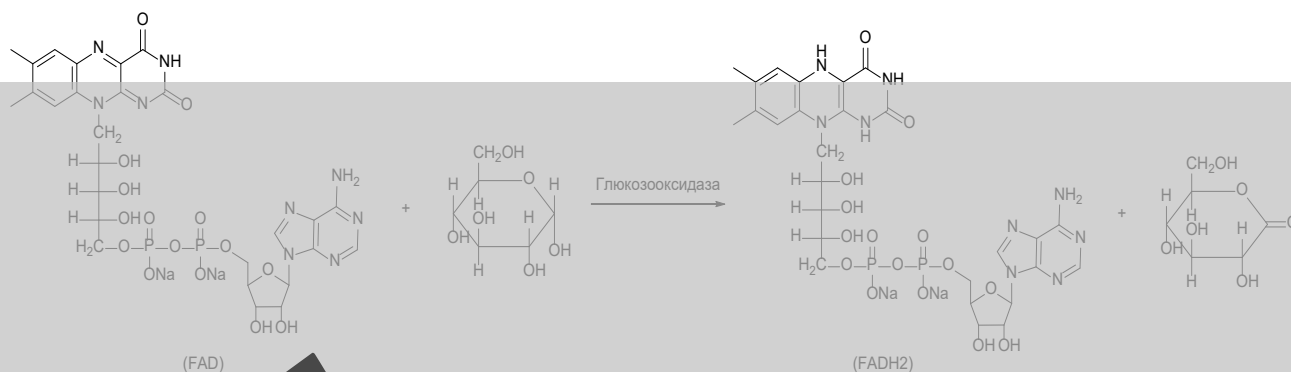


Схема 1. Ферментативне окиснення глюкози під дією глюкозооксидази.

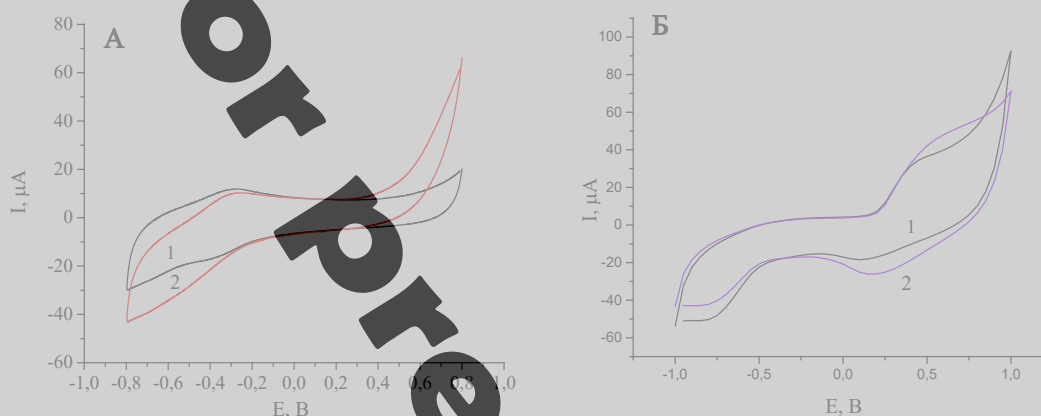


Рис. 2. ЦВА (А) наноПВЕ/ГО/SiO₂ та (Б) наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ за відсутності (1) та у присутності 0.5 мМ розчину глюкози (2). Швидкість сканування потенціалу 100 мВ/с, фоновий електроліт 0.01 М KNO₃, pH=5.0.

На наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ електроді чітко видно піки при $E = +0.5\text{В}$ та $+0.25\text{В}$, що обумовлені окисненням-відновленням MnO₂ (рис 2Б). Зменшення потенціалу окиснення-відновлення MnO₂ на наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ порівняно з наноПВЕ/MnO₂/SiO₂ може бути пов'язано з впливом білкових молекул та активного центру ГО у плівці SiO₂. У присутності глюкози в розчині анодний і катодний піки зростають, що можна пояснити окисненням-відновленням H₂O₂ – продукту ферментативного розкладу глюкози. Вплив pH розчину на силу струму аналізу наведено на рис.3. З діаграми видно, що при збільшенні pH розчину аналітичний сигнал глюкози зменшується. Оптимальне pH визначення глюкози з використанням наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ рівне 5.0, що на 0.6-0.8 одиниць нижче за значення pH для розчину ГО [28]. При меншому значенні pH стабільність сигналу модифікованого електроду зменшується.

Отримано градувальний графік для визначення глюкози на наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ за струмом окиснення при $E = 0.5\text{В}$, pH = 5.0. Діапазон лінійності знаходиться у межах 0.01-0.10 мг/мл, межа виявлення становить 0.009 мг/мл, відносне стандартне відхилення $S_r = 0.03$, при визначенні 0.05 мг/мл глюкози ($n=3$).

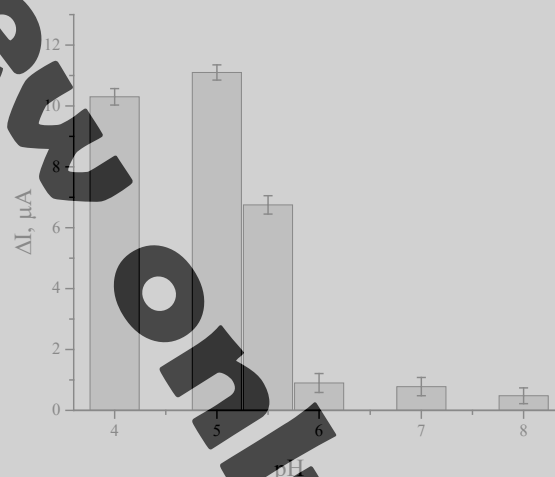


Рис.3. Залежність анодного струму наноПВЕ/MnO₂/ГО/SiO₂ від pH 1 мМ розчину глюкози, фоновий електроліт 0.01 М KNO₃.

Наступним етапом була модифікація електроду двома ферментами – глюкозооксидазою та інвертазою, інкапсульованими у плівці SiO₂. Отримували наноПВЕ/MnO₂/ГО/Інв/SiO₂. Досліджували електрокаталітичну активність модифікованого електроду в присутності сахарози.

На рис. 4 наведено типові ЦВА на наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 за відсутності та у присутності сахарози у окисненому та деокисненому розчині електроліту. На вольтамперограмах фоновому розчину проявляються піки окиснення-відновлення при потенціалах 0.5 та 0.15 В відповідно, що можна віднести до окиснення/відновлення MnO_2 на поверхні електрода.

У присутності сахарози струм окиснення при $E=0.5$ В зростає, що свідчить про появу гідроген пероксиду в розчині у результаті каскаду ферментативних реакцій (Схема 2).

Індикаторною реакцією при ферментативному визначенні сахарози є каталітичний струм H_2O_2 . Розчинений у воді кисень може вносити похибку у вольтамперометричне детектування гідроген

пероксиду. Порівняно ЦВА сахарози на наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 до та після видалення розчиненого кисню. Для видалення кисню крізь 10 мл розчину пропускали азот протягом 10 хв. У розчині після видалення розчиненого кисню потенціали струму окиснення-відновлення не змінилися, а самі піки стали дещо чіткішими (рис. 4 Б).

Оскільки ферменти чутливі до рН розчину, досліджено вплив кислотності на величину аналітичного сигналу сахарози (рис. 5). Оптимальне значення рН для визначення сахарози за допомогою наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 дорівнює 7.0, що корелює з відповідним значенням рН для сенсорів на сахарозу на основі іммобілізованої інвертази [27, 28].

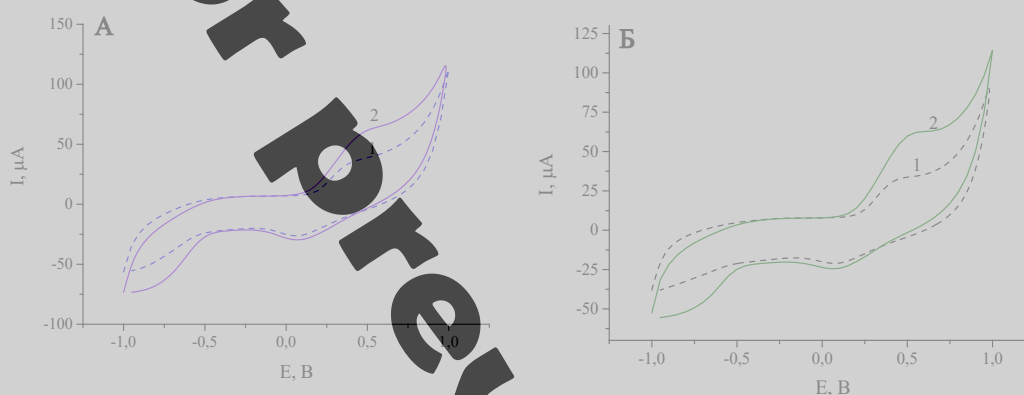
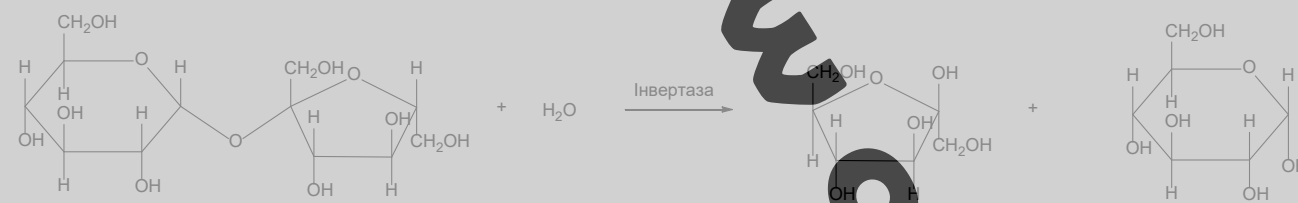


Рис. 4. ЦВА наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 за відсутності (1) та у присутності 1 мМ розчину сахарози (2) до (А) та після (Б) видалення розчиненого у воді кисню. Фоновий електроліт 0.01 М KNO_3 , рН = 7.0.

(1)



(2)



Схема 2. Біферментативна реакція визначення сахарози.

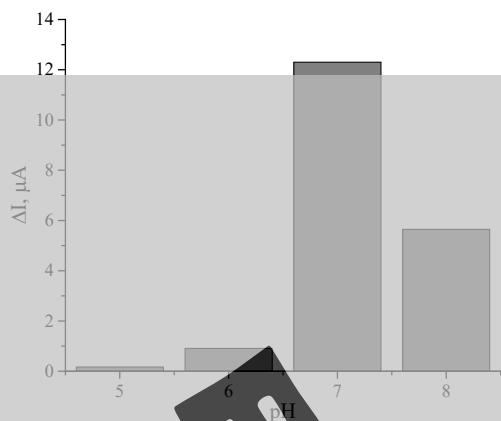


Рис. 5. Залежність анодного струму наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$ від рН 1 мМ розчину сахарози, фоновий електроліт 0.01 М KNO_3 .

Одержано калібрувальні графіки для визначення сахарози на наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$ електродах до та після видалення кисню з розчину, що описуються рівняннями: $I = (1.4 \pm 0.1) + (77.2 \pm 3.2) \cdot C$, мг/мл і $I = (1.8 \pm 0.1) + (117.2 \pm 2.5) \cdot C$, мг/мл відповідно ($E = 0.5$ В). Діапазон лінійності градувальних графіків становить 0.017–0.340 мг/мл. Після видалення кисню з розчину чутливість визначення сахарози дещо підвищується: межа виявлення до та після видалення кисню становить 0.006 і 0.004 мг/мл відповідно. Відносне стандартне відхилення (S_r) при визначенні 0.17 мг/мл сахарози на наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$ до та після видалення кисню з розчину становило 0.014 та 0.010 відповідно ($n=3$).

Отримані результати, свідчать про незначний вплив розчиненого кисню на аналітичний сигнал сахарози. З огляду на те, що видалення кисню з розчину шляхом барботуванням азоту ускладнює процес пробопідготовки у подальшому визначення сахарози проводили без цієї процедури.

Стабільність роботи наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$ перевіряли одразу та через місяць після модифікування електроду. Через місяць тангенс кута нахилу калібрувальної залежності зменшується в 1.5 рази, що призводить до зменшення чутливості у 2 рази та звуження лінійного діапазону. Це може бути пов'язано з усиханням плівки SiO_2 та зміною конформації інкапсульованих білкових молекул. У той же час прецизійність результатів визначення не змінюється і є задовільною. Слід зазначити, що водні розчини досліджених ферментів стабільні лише протягом тижня. Таким чином розроблений модифікований електрод є перспективним чутливим елементом біосенсора.

Досліджено вплив потенційних заважаючих компонентів [31], що можуть бути присутні у меді, на величину аналітичного сигналу сахарози, а саме: глюкози, фруктози. ЦВА сахарози та суміші глюкози, фруктози і сахарози наведено на рис. 6. В присутності п'ятидесятикратного

молярного надлишку глюкози та фруктози, відносна похибка визначення сахарози становить 6%. Таким чином, зазначені моносахариди не заважають визначенню сахарози за розробленою біоферментативною методикою (табл.2).

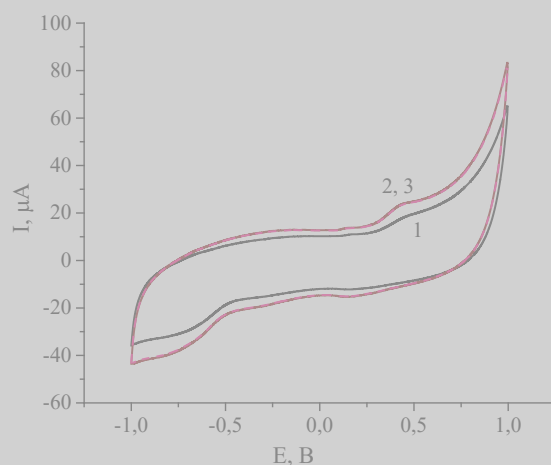


Рис. 6. ЦВА наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$ за відсутності (1) у присутності 0.05 мМ сахарози (2) та суміші глюкози, фруктози і сахарози (3), молярне співвідношення фруктоза:глюкоза:сахароза=50:50:1. Фоновий електроліт фосфатний буфер, рН=7.0.

Це може бути результатом відмінності оптимального рН визначення глюкози (4.5-5.0) і сахарози (7.0), а також стеричними перешкодами при інкапсуляції ферментів. Молекули глюкози, що утворюються при гідролізі сахарози, знаходяться значно ближче до активних центрів інкапсульованої ГО, ніж глюкоза в розчині. Це пояснює, чому ферментативного перетворення у першу чергу зазнає глюкоза, що утворюється у результаті гідролізу сахарози. Окрім того, при інкапсулюванні одразу двох ферментів, кількість ГО у плівці менша порівняно з плівкою, що містить лише один фермент. Це призводить до зменшення доступних для глюкози активних центрів іммобілізованої ГО у біоферментній плівці $\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$.

Таблиця 2. Результати визначення добавок стандартного розчину сахарози у фосфатному буфері, та у модельному розчині методом ЦВА з використанням наноПВЕ/ $\text{MnO}_2/\text{GO}/\text{In}_2\text{S}_3/\text{SiO}_2$; рН=7.0 ($n=3$, $P=0.95$).

Об'єкт	Концентрація сахарози, мг/мл		S_r
	введено	знайдено ($x \pm \Delta x$)	
Бідистильована вода	0.017	0.017 ± 0.001	0.02
Модельний розчин*	0.017	0.016 ± 0.001	0.04

Примітка: *Склад модельного розчину, мг/мл: фруктоза – 0.450; глюкоза – 0.450.

Електрод наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 було застосовано для визначення сахарози у зразках меду. Детальна методика електрохімічного та хроматографічного проведення аналізу зразків меду на вміст сахарози наведена у розділі Матеріали та методика досліджень. Отримані результати наведено у табл. 3.

Результати визначення сахарози методом ЦВА та ВЕРХ корелюють між собою для зарзків 1 і 3. Для зразка 2 спостерігається незначні розбіжності між отриманими результатами, проте величина відносної похибки не перевищує 6.3%, що

лежить у межах допустимої похибки методу. Вміст сахарози у перших двох зразках не перевищує 6% (мас.), що характерно для меду першої категорії. Зразок із приватної пасіки містить сахарози менше 3.5% (мас.), що відповідає вимогам для меду вищого ґатунку згідно ДСТУ 4497-2005. Розроблений у роботі модифікований електрод може бути перспективним для скринінгу вмісту сахарози при встановленні якості меду.

У табл.4 порівняно характеристики вольтамперометричних сенсорів на сахарозу на основі біензимних електродів.

Таблиця 3. Результати визначення сахарози у зразках меду вольтамперометричним методом та ВЕРХ. Характеристика проб: 1- квітковий мед фірми «Асканія», 2 – мед з мережі кафе «Балувана Галя», 3 - мед з приватної пасіки. n = 3; P = 0.95.

Зразок	Вольтамперометрія				ВЕРХ	
	Концентрація сахарози в розчині, мг/мл		Вміст сахарози, г/100 г меду	RSD, %	Вміст сахарози, г/100 г меду	RSD, %
	Введено	Знайдено ($\bar{x} \pm \Delta x$)				
1	0	0.024±0.007	4.50±0.20	1.8	4.80±0.10	0.83
	0.017	0.038±0.020				
	0.034	0.610±0.010				
2	0	0.03±0.007	5.87±0.20	1.2	5.20±0.10	0.6
	0.017	0.048±0.007				
	0.034	0.065±0.003				
3	0	0.034±0.007	1.15±0.20	5.7	1.10±0.10	3.7
	0.017	0.051±0.007				
	0.034	0.068±0.003				

Таблиця 4. Хіміко-аналітичні характеристики вольтамперометричних методик визначення сахарози у продуктах харчування з використанням ензимосенсорів.

Електрод	Чутливий шар	E, V	ЛД*, мг/мл	МВ**, мг/мл	Об'єкт	Посилання
наноПВЕ	MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2	+0.5	0.017-0.34	0.007	Мед	Ця робота
Pt	GoX, INV	+0.7	-	-	Моделльні розчини	[32]
Pt	GoX, INV, MUT	+0.7	0.34-13.7	-	Газовані напої	[33]
Вугільно-пастовий електрод	SP, PGM, G-6PDH, Osphendione	+0.15	0.34-5.13	0.31	Фруктові соки	[34]
Вугільно-пастовий електрод	INV, MUT, GDH, Osphendione	+0.15	0.34-4.1	0.034	Фруктові соки, молоко	[35]
Плівковий вугільний електрод	GoX, INV, MUT	+0.6	0.034-0.85	-	Фруктові соки	[10]

Примітки: *ЛД - лінійний діапазон; **МВ - межа виявлення; GoX- глюкоза оксидаза, INV-інвертаза; MUT-мутаратаза; SP-сахароха; PGM-фосфоглюкомутаза; G-6PDH – глюкоза-6-фосфат 1-дегідрогіназа; Osphendione - Осмій(4,4%-диметил-2,2%-біпіридин)-2-(1,10-фенантролін-5,6-діон), GDH – D-глюкоза дегідрогеназа.

Розроблена методика характеризується нижчою межею виявлення і ширшим лінійним діапазоном, порівняно з описаними у літературі. Окрім того, розроблений спосіб закріплення ферментів на поверхні електрода є простим та швидким. Планарний електрод зручний у користуванні і може бути застосований поза межами лабораторії. Отриманий модифікований планарний електрод наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 - перспективний чутливий елемент вольтамперометричного сенсора на сахарозу.

Висновки

Метод електроіндукованого осадження - перспективний для закріплення одночасно двох ферментів у плівці SiO_2 на поверхні електрода.

Література

1. Naila, A.; Flint, S. H.; Sulaiman, A. Z.; et al. Classical and Novel Approaches to the Analysis of Honey and Detection of Adulterants. *Food Control* **2018**, 90, 152–165.
2. Kamal, M. A.; Klein, P. Determination of Sugars in Honey by Liquid Chromatography. *Saudi J. Biol. Sci.* **2011**, 18 (1), 17–21.
3. Aljohar, H. I.; Maher, H. M.; Albaqami, J.; et al. Physical and Chemical Screening of Honey Samples Available in the Saudi Market : An Important Aspect in the Authentication Process and Quality Assessment. *Saudi Pharm. J.* **2018**.
4. Topcu, A. Rapid Analysis of Sugars in Honey by Processing Raman Spectrum Using Chemometric Methods and Artificial Neural Networks. *Food Chem.* **2013**, 136 (1–4), 1444–1452.
5. Cheng, X.; Zhang, S.; Zhang, H.; et al. Determination of Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection at a Nano-Nickel Oxide Modified Carbon Paste Electrode. *Food Chem.* **2008**, 106, 830–835.
6. Taylor, P.; Gómez-díaz, D.; Navaza, J. M.; et al. Physicochemical Characterization of Galician Honeys. *Int. J. Food Prop.* **2011**, 15 (August 2012), 37–41.
7. Kulshrestha, S.; Tyagi, P.; Sindhi, V.; et al. Invertase and Its Applications e A Brief Review. *JOPR J. Pharm. Res.* **2013**, 7 (9), 792–797.
8. Wong, C. M.; Wong, K. H.; Chen, X. D. Glucose Oxidase : Natural Occurrence , Function , Properties and Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 78, 927–938.
9. Electrodes, S.; Application, T. Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application. *Sensors (Basel)* **2016**, 16 (10), 1–16.
10. Krisztina Majer-Baranyi, N. A. & M. V. Investigation of a Multienzyme Based Amperometric Biosensor for Determination of Sucrose in Fruit Juices.

Інкапсульовані ферменти зберігають свою каталітичну активність протягом місяця, що утричі більше, ніж у розчині.

На основі наноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 отримано чутливий елемент біензимного сенсора для вольтамперометричного визначення сахарози, діапазон лінійності 0.017-0.340 мг/мл, межа виявлення 0.006 мг/мл. Індикаторною є реакція визначення гідроген пероксиду – продукту біферментативної реакції, що каталізується MnO_2 , іммобілізованим на поверхні наноПВЕ. Визначенню не заважають 50-кратні надлишки глюкози та фруктози. НаноПВЕ/ MnO_2 /ГО/Інв/ SiO_2 електрод застосований для скринінгу вмісту сахарози у зразках меду.

Eur. Food Res. Technol. Vol. **2008**, 228, 139–144.

11. Juices, F. Biosensor for Determination of Glucose and Sucrose in Fruit Juices by Flow Injection Analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, 89, 171–181.
12. Rahman, M. M.; Ahammad, A. J. S.; Jin, J. H.; et al. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors* **2010**, 10 (5), 4855–4886.
13. Taleat, Z.; Khoshroo, A. Screen-Printed Electrodes for Biosensing: A Review (2008 – 2013). *Microchim. Acta* **2014**, 865–891.
14. Laschi, S.; Mascini, M. Planar Electrochemical Sensors for Biomedical Applications. *Med. Eng. Phys.* **2006**, 28 (10), 934–943.
15. Arduini, F.; Zanardi, C.; Cinti, S.; et al. Chemical Sensors and Biosensors in Italy: A Review of the 2015 Literature. *Sensors* **2017**, 17, 868.
16. Sayen, S.; Walcarius, A. Electro-Assisted Generation of Functionalized Silica Films on Gold. *Electrochem. commun.* **2003**, 5 (4), 341–348.
17. Rozhanchuk, T.; Tananaiko, O.; Mazurenko, I.; et al. Electroanalytical Properties of Haemoglobin in Silica-Nanocomposite Films Electrogenerated on Pyrolytic Graphite Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, 625 (1), 33–39.
18. Wang, Z.; Etienne, M.; Pöller, S.; et al. Dehydrogenase-Based Reagentless Biosensors: Electrochemically Assisted Deposition of Sol-Gel Thin Films on Functionalized Carbon Nanotubes. *Electroanalysis* **2012**, 24 (2), 376–385.
19. Nadzhafova, O.; Etienne, M.; Walcarius, A. Direct Electrochemistry of Hemoglobin and Glucose Oxidase in Electrodeposited Sol-Gel Silica Thin Films on Glassy Carbon. *Electrochem. commun.* **2007**, 9 (5), 1189–1195.
20. Song, H.; Zhao, H.; Zhang, X.; et al. A Hollow Urchin-like α - MnO_2 as an Electrochemical Sensor for Hydrogen Peroxide and Dopamine with High Selectivity and Sensitivity. *Microchim. Acta* **2019**, 186 (4), 1–12.
21. Ali, G. A. M.; Yusoff, M. M.; Chong, K. F. Electrochemical Properties of Electrodeposited MnO_2

Nanoparticles. *Adv. Mater. Res.* **2015**, 1113, 550–553.

22. Kovalyk, A.; Tananaiko, O.; Borets, A.; et al. Voltammetric and Microscopic Characteristics of MnO₂ and Silica-MnO₂ Hybrid Films Electrodeposited on the Surface of Planar Electrodes. *Electrochim. Acta* **2019**, 306, 680–687.

23. Walcarius, A.; Sibottier, E.; Etienne, M.; et al. Electrochemically Assisted Self-Assembly of Mesoporous Silica Thin Films. *Nat. Mater.* **2007**, 6, 602–608.

24. Osnovy` Analiticheskoy Khimii. V 2 t. T. 1: Ucheb. Dlya Stud. Uchrezhdenij Vyssh. Prof. Obrazovaniya/ [T.A. Bol'shova i Dr.]; Pod Red. Yu.A. Zolotova. - 5-e Izd. Ster. - M.: Izdatel'skiy Czentr "Akademiya", 2012.- 384 S.; Moskva.

25. Ng, C. M.; Reuter, W. M. Analysis of Sugars in Honey Using the PerkinElmer Altus HPLC System with RI Detection. *PerkinElmer, Inc.* **2015**, 1–5.

26. Beyene, N. W.; Kotzian, P.; Schachl, K.; et al. (Bio)Sensors Based on Manganese Dioxide-Modified Carbon Substrates: Retrospections, Further Improvements and Applications. *Talanta* **2004**, 64 (5 SPEC. ISS.), 1151–1159.

27. Yoo, E.; Lee, S. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors (Basel)* **2010**, 10 (5), 4558–4576.

28. Biochem, J.; Natsuaki, O.; Ohashi, K. Purification, Glucose Properties, from and Molecular Niger Features of Oxidase Aspergillus. *J Biochem* **1975**, 78 (4), 835–843.

29. Ozalp, V. C.; Bayramoglu, G.; Arica, M. Y. Fibrous Polymer Functionalized Magnetic Biocatalysts for Improved Performance. *Nanoarming Enzym. with Carbon Nanotub. Magn. Nanoparticles* **2020**, 630, 111–132.

30. Molecules, B. Reactive Ceramic Nanocomposites with Organic and Bio-Organic Phases. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*; 1998; pp 1–10.

31. Ball, D. W. The Chemical Composition of Honey. *J. Chem. Educ.* **2007**, 84 (10), 1643–1646.

32. Gıılce, H.; Celebi, S. S. Amperometric Enzyme Electrode for Sucrose Determination Prepared from Glucose Oxidase and Invertase Co-Immobilized in Poly (Vinylferrocenium). *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* **1995**, 397 (2), 217–223.

33. Surareungchai, W.; Worasing, S.; Sritongkum, P. Dual Electrode Signal-Subtracted Biosensor for Simultaneous Flow Injection Determination of Sucrose and Glucose. *Anal. Chem.* **1999**, 380, 7–15.

34. Maestre, E.; Katakis, I.; Domı, E. Amperometric Flow-Injection Determination of Sucrose with a Mediated Tri-Enzyme Electrode Based on Sucrose Phosphorylase and Electrocatalytic Oxidation of NADH. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16 (0956), 61–68.

35. Maestre, E.; Katakis, I.; Dom, E. A Multianalyte Flow Electrochemical Cell: Application to the Simultaneous Determination of Carbohydrates Based on Bioelectrocatalytic Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 774–781.