Амперометрический биосенсор на D-сорбитол на основе модифицированного биокомпозитным покрытием стеклоуглеродного электрода

Е.А. Мазуренко[1], О.В. Шевченко[1], О.Ю. Тананайко[1], М. Этьен[2], А. Валькариус[2]

[1] Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, Украина, 01601, nadzhafova@univ.kiev.ua
[2] Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564, CNRS - Institut Jean Barriol - Nancy University, 405 rue de Vandœuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

Поступила: 30 августа 2012 г / Принята к публикации: 2 ноября 2012 г.

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

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

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, карбоновые нанотрубки, фермент D-сорбитолдегидрогеназа, сорбитол, золь-гель метод, иммобилизация.

Key words: Amperometric biosensor, carbon nanotubes, enzyme, D-sorbitol, sol-gel method, dehydrogenase.

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

В то же время, биосенсорам присущи недостатки, лимитирующие их широкое использование в аналитической химии: дороговизна чистых препаратов ферментов и их невысокая стабильность. В связи с этим, усилия исследователей направлены на поиски подходящих способов иммобилизации биомолекул, которые могли бы обеспечивать увеличение стабильности ферментов и снижение предела обнаружения аналита. Одним из таких способов иммобилизации является золь-гель метод, позволяющий получать разнообразные по своим химическим и физическим свойствам материалы на основе оксида кремния [2]. Оксид кремния имеет отличную биосовместимость, а золь-гель метод позволяет получать биокомпозитные материалы с заданными структурными характеристиками в мягких условиях синтеза [3]. Указанные преимущества обеспечивают стабильность, конформационную подвижность иммобилизированных ферментов и их доступность для молекул субстрата [4,5]. При разработке электрохимических биосенсоров особенно ценным видится применение таких материалов в виде пленочных покрытий на поверхности электродов [6,7].

Одним из классов ферментов, представители которого перспективны при разработке биосенсоров, являются дегидрогеназы. [8]. Биосенсоры на основе дегидрогеназ предложены для определения формальдегида [9], глицерина [10], лактата [11,12], этанола [13,14], а также различных ингибиторов [15]. Фермент D-сорбитолдегидрогеназа образуется в клетках печени человека и катализирует реакцию окисления D-сорбитола до D-фруктозы в присутствии кофермента никотина-

 © Е.А. Мазуренко, О.В. Шевченко, О.Ю. Тананайко, М. Этьен, А. Валькариус

мидадениндинуклеоитида ($НАД^+$), либо обратную реакцию в присутствии НАДН [16]:

D-сорбитол + $НАД^+$ ↔ D-фруктоза + НАДН

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

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

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

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методики исследований

В работе применялся тетраэтоксисилан (TEOC, 98%) фирмы Alfa Aesar. Углеродные нанотрубки, функционализированные карбоксильными группами (УНТ, >90%, 4-5нм × 0.5-1.5 мкм, 1-3 атом.% COOH-групп), были получены от “Sigma”. D-сорбитолдегидрогеназа (ДСДГ, 10 мг/мл, 100 U/мг) была предоставлена химическим факультетом университета Саарланда (Германия). В работе использовали окисленную и восстановленную формы кофермента β-никотинамидадениндинутклеотида (НАД+/НАДН) фирмы “Sigma”. Для лучшего закрепления фермента в SiO_2-пленке в золь вводился полиэлектролит полидиметилдиаллиламмоний хлорид (ПДМДА, низкая молекулярная масса, 20% раствор в воде) фирмы “Aldrich” [37]. Фосфатные буферные растворы были приготовлены из солей $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (99.5%, “Merck”) и KH_2PO_4 (99.9%, “Prolabo”). Буферный раствор Трис-HCl был приготовлен путем растворения трис-(гидроксиметил)амино-метана (98%, “Sigma”) в воде и доведения до необходимого pH раствором HCl (36%, “Prolabo”). Все растворы реагентов готовили используя бидистиллированную воду. Все другие использованные реагенты были степени чистоты “х.ч.”.

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

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

Для отбора небольших объемов аликвот использовали автоматическую микропипетку «Eppendorf» (Германия). Раствор золя SiO_2 готовили путем кислотного гидролиза TEOC согласно методике [5,37]. К аликвоте 100 мкл полученного

золя добавляли 100 мкл ПДМДА и 100 мкл раствора ДСДГ. Аликвоту готовой смеси наносили на стеклоуглеродный электрод (из расчета 25 мкл/см^2) и сушили при комнатной температуре до полного испарения воды.

Электрод, модифицированный ферментом, в дальнейшем назывался СУ-SiO_2-ДСДГ, а модифицированный углеродными нанотрубками и ферментом – СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ. Все электрохимические измерения проводились на потенциостате EmStat 2 (“PalmSens”) с использованием трехэлектродной ячейки, включающую вспомогательный платиновый электрод, насыщенный хлорсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl), и модифицированный стеклоуглеродный рабочий электрод. Амперометрические измерения проводились при потенциале + 0.5 В и постоянном перемешивании. Исследование морфологии поверхности СУ-УНТ проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа (“Hitachi” FEG S4800).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Окисление НАДН на поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками. Были исследованы вольтамперометрические характеристики окисления кофермента НАДН на немодифицированном СУ и на СУ-УНТ-электродах. На циклической вольтамперограмме СУ-УНТ электрода в присутствии НАДН можно заметить анодный пик окисления кофермента при потенциале ≈ 0.42 В, в то время как на немодифицированном электроде пик НАДН наблюдается при значительно более высоких потенциалах (0.7-0.8 В) (Рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют об электрокаталитических свойствах УНТ, способствующих уменьшению потенциала окисления кофермента НАДН более чем на 0.25 В.

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

Таким образом, электрофоретическое осаждение углеродных нанотрубок на поверхности стеклоуглеродного электрода приводит к значительному улучшению электрохимических характеристик последнего, а именно, способствует уменьшению потенциала окисления кофермента НАДН и улучшению стабильности аналитического сигнала. Известно, что увеличение длительности наложения напряжения при электрофоретическом осаждении ведет к большему количеству осажденных частичек, а значит – к увеличению толщины слоя углеродных нанотрубок [38]. Электрохимические характеристики модифицированного электрода при этом могут изменяться, поэтому нами были исследованы зависимости потенциала и величины пика окисления НАДН от времени электрофоретического осаждения углеродных нанотрубок на СУ электроде (Рис. 3).

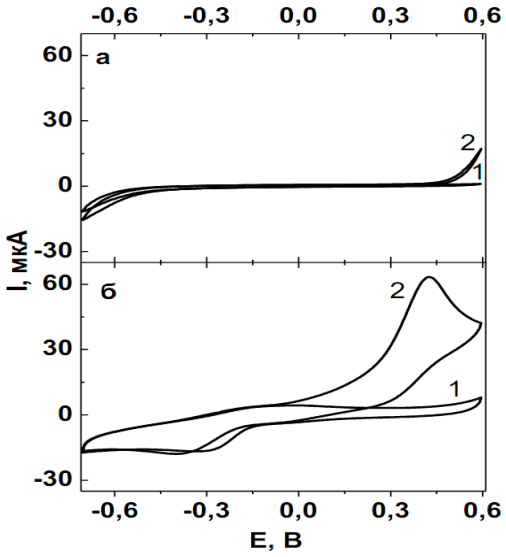

Рис. 1. Циклические вольтамперограммы немодифицированного СУ (а) и модифицированного СУ-УНТ (б) электродов в буферном растворе pH=7.5 (1) и в присутствии 5 мМ НАДН (2). Скорость развертки потенциала 20 мВ/с

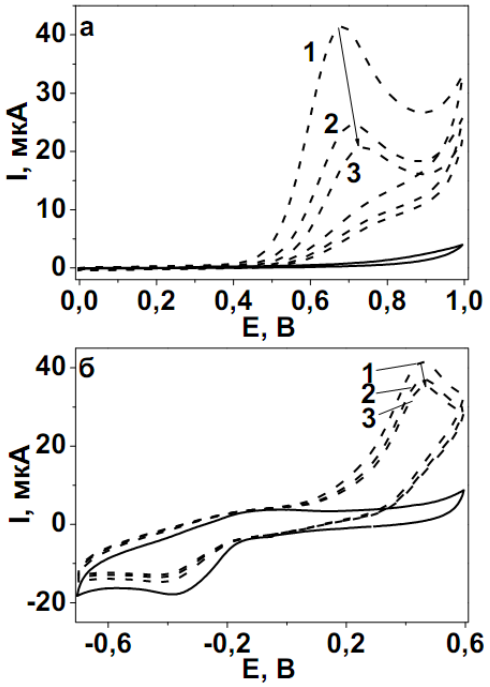

Рис. 2. Циклические вольтамперограммы немодифицированного СУ (а) и модифицированного СУ-УНТ (б) электродов в растворе НАДН (5 мМ): (1) – 1-й цикл развертки потенциала, (2) – 2-й цикл, (3) – третий цикл. Вспомогательный электролит: 0.067 М фосфатный буферный раствор (pH 7.5)

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

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

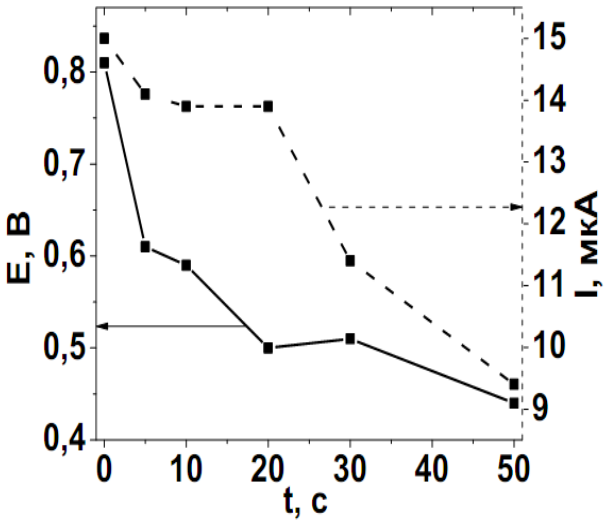

Рис. 3. Зависимость потенциала и величины вольтамперометрического пика окисления 1 мМ НАДН на СУ-УНТ электроде от длительности электрофоретического осаждения УНТ. Вспомогательный электролит: 0.067 М фосфатный буферный раствор (pH 7.5)

Иммобилизация D-сорбитолдегидрогеназы в пленке SiO_2 на поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками.

С целью получения чувствительного элемента амперометрического биосенсора для определения сорбитола нами была проведена иммобилизация фермента ДСДГ в пленку SiO_2 на поверхности СУ-УНТ электрода.

В присутствии D-сорбитола в растворе на вольтамперограмме СУ-УНТ электрода, модифицированного пленкой SiO_2-ДСДГ, заметно повышение тока при потенциале +0.5 В (Рис. 4а). Этот сигнал можно отнести к окислению НАДН, образующегося при окислении сорбитола ДСДГ, что свидетельствует о сохранении каталитической активности ДСДГ, инкапсулированной в пленку SiO_2. Наибольшая величина тока наблюдается при pH 9.0 (трис-буфер), что коррелирует с pH максимальной активности D-сорбитолдегидрогеназы в растворе [39]. Интенсивность сигнала возрастает пропорционально увеличению концентрации сорбитола в растворе. Модифицированный СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрод демонстрирует четкий стабильный амперометрический отклик при потенциале + 0.5 В в присутствии добавок D-сорбитола в растворе (Рис. 4б). СУ-SiO_2-ДСДГ электрод без слоя УНТ, при данном потенциале демонстрирует лишь незначительный сигнал. Это подтверждает каталитическое действие УНТ при окислении НАДН. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования биокомпозитного электрода СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ для разработки амперометрического биосенсора на сорбитол. Зависимость величины тока от концентрации D-сорбитола имеет характерный вид, присущий ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен (Рис. 5а) [40]. Значение константы Михаэлиса, рассчитанное с помощью графика Лайнуивера-Бэрка [40], составляет 1.2 мМ (Рис. 5б).

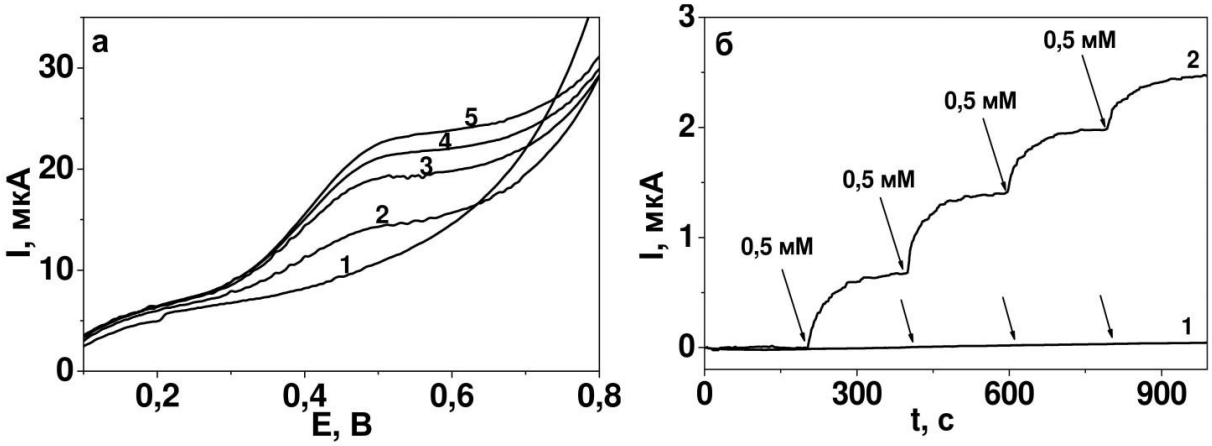

Рис. 4. (а) Линейные вольтамперограммы СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ в присутствии возрастающих концентраций D-сорбитола: 0 мМ (1), 0.5 мМ (2), 1.0 мМ (3), 1.5 мМ (4), 2.0мМ (5). (б) Амперометрический отклик (1) СУ-SiO_2-ДСДГ и (2) СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ к добавкам D-сорбитола, E = + 0.5 В. Вспомогательный электролит: 0.1 М Трис-HCl (pH 9.0), 1 мМ $НАД^+$.

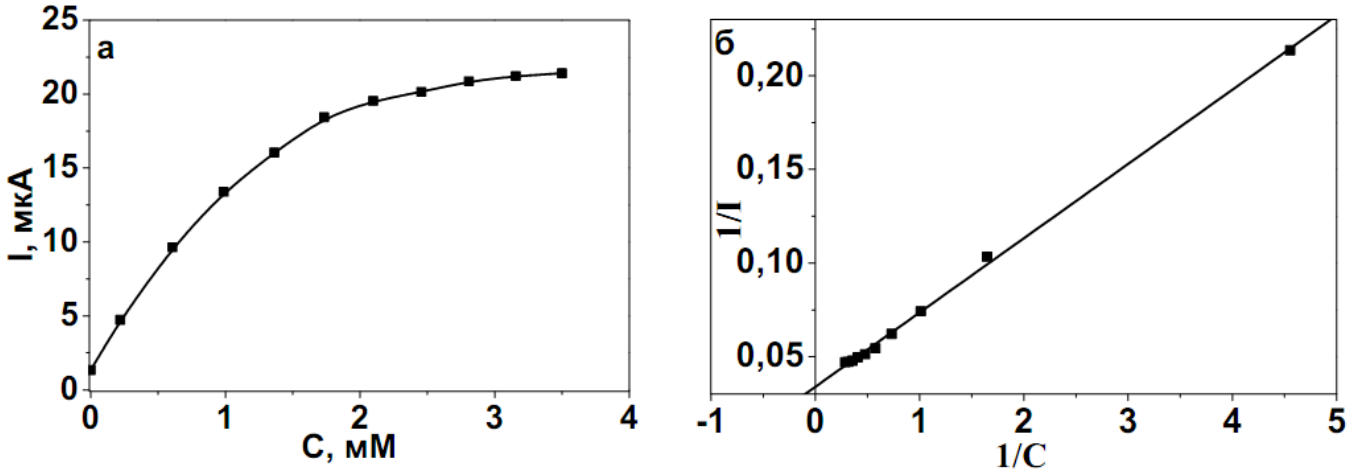

Рис.5. (а) Зависимость амперометрического сигнала СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ от концентрации D-сорбитола в растворе, E = +0.5 В. Фоновый раствор: 0.1 М Трис-HCl pH 9.0, 1 мМ $НАД^+$; (б) График Лайнуивера-Бэрка для определения константы Михаэлиса

Это меньше, чем для электрода, модифицированного ДСДГ в пленке нафион-хитозан (≈1.6 мМ) [27], и значительно меньше, чем для данного фермента в растворе (6.2 мМ). Полученные результаты свидетельствуют о высоком сродстве фермента, иммобилизированного в пленке SiO_2, к субстрату – D-сорбитолу.

Был получен градуировочный график для амперометрического определения D-сорбитола с помощью биокомпозитного электрода СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ. Уравнение прямой имеет вид: I(мкА) = (1.8 ± 0.5) + (12.2 ± 0.8)·C(мМ) (R^2 = 0.99). Диапазон линейности составляет 0.2 – 1.2 мМ, а предел обнаружения, рассчитанный по 3S-критерию, – 0.1 мМ сорбитола. Такой предел обнаружения сопоставим с описанными в литературе амперометрическими биосенсорами для определения сорбитола на основе иммобилизированной ДСДГ [20,28,29]. В то же время разработанная методика позволяет детектировать сорбитол в более широком концентрационном диапазоне, чем описанные ранее методики [20,27,30]. Учитывая то, что чаще всего сорбитол входит в состав объектов в качестве макрокомпонента, при выборе методики анализа решающую роль играет именно широкий диапазон концентраций, а не предел обнаружения.

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

Отклик биосенсора оставался стабильным при использовании на протяжении одного месяца при соблюдении температуры хранення 4°C. Таким образом, разработанный биокомпозитный электрод СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ является перспективным элементом амперометрического биосенсора для определения сорбитола.

Определение сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрода

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

Исследовано мешающее влияние веществ, которые могут входить в состав объектов пищевой и косметической промышленности, на результаты определения D-сорбитола с помощью модифицированного СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрода. Показано, что определению 1мМ сорбитола не мешают эквимолярные концентрации углеводов и многоатомных спиртов (Табл. 1), в том числе стереоизомер сорбитола – маннитол, что свидетельствует о высокой селективности разработанной методики. Мешающее влияние оказывает аскорбиновая кислота, которая окисляется на электроде при рабочем потенциале + 0.5 В, что приводит к завышению аналитического сигнала. Влияние аскорбиновой кислоты устраняли путем введения в раствор пятикратного избытка Fe(III). (Табл. 1). Присутствие анионных ПАВ (ДДСН) приводит к снижению стабильности сигнала и занижению результатов анализа (Табл. 1).

Методика определения D-сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрода была испытана при анализе реальных образцов. Определение проводили по методу стандартных добавок [41].

Таблица 1. Мешающее влияние изученных веществ на результаты амперометрического определения D-сорбитола с помощью СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрода ($C_{сорб}$ = 1 мМ)

Вещество (X)	Молярное соотношение концентраций (C_X:$C_{сорб}$)	Мешающее влияние
Сахароза	1 : 1	+ (10% уменьшение сигнала)
Глюкоза	1 : 1	не мешает
Мочевина	1 : 1	не мешает
Маннитол	1 : 1	не мешает
Глицерин	1 : 1	не мешает
Аскорбиновая к-та	1 : 10	+ (10% увеличение сигнала)
	1 : 1	+ (60 % увеличение сигнала)
Fe(III)	5 : 1	не мешает
Аскорбиновая к-та + Fe(III) (1:5)	1 : 10	не мешает
ДДСН	1 : 10	+ (уменьшение сигнала)

Таблица 2. Результаты амперометрического определения D-сорбитола в образцах пищевой и косметической промышленности с помощью СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрода. (n = 3, P = 0.95)

Объект	Содержание D-сорбитола, мг/мл		
	Введено	Найдено	S_r
Зубная паста для детей “Oral B Stages”	0	3.6 ± 0.6	0.06
	9.1	12.6 ± 1.0	0.04
Жевательная резинка “Orbit”	0	7.2 ± 0.6	0.03
	9.1	16.4 ± 1.6	0.04
Диабетическое печенье “Харьковская бисквитная фабрика”	0	4.4 ± 0.4	0.04
	9.1	13.5 ± 0.4	0.01

Навески соответствующих образцов пищевой и косметической промышленности (Зубная паста для детей “Oral B Stages berry bubble”, Германия; жевательная резинка “Орбит”, Россия; печенье “Диабетическое”, Украина) отбирали на аналитических весах, с таким расчётом, чтобы концентрация сорбитола в растворе после соответствующей пробоподготовки находилась в диапазоне 20-50 мМ.

Навески измельчали в ступке вручную, переносили в стакан на 100 мл, добавляли 50 мл бидистиллированной воды (в случае печенья использовали 200 мл воды и стакан на 250 мл) и перемешивали в течение одного часа на магнитной мешалке. В аликвоты суспензий вводили добавки стандартного раствора сорбитола. Суспензии без добавок и с добавками стандартного раствора сорбитола фильтровали через бумажный фильтр (красная лента). Аликвоты фильтратов (50 мкл) отбирали микропипеткой с дозатором и вводили в электрохимическую ячейку содержащую 5 мл Трис-буферного раствора (pH 9.0), погружали в нее СУ-УНТ-SiO_2-ДСДГ электрод, вспомогательный и электрод сравнения, затем измеряли значения тока при потенциале +0.5 В. Результаты анализа представлены в Табл. 2.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрирована перспективность использования электрофоретически-осажденных углеродных нанотрубок на поверхности СУ электрода для получения биосенсоров на основе $НАД^+$-зависимых дегидрогеназ.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Эггинс Б.Р. Химические и биологические сенсоры, Москва: Техносфера, 2005. С. 336.

2. Brinker C.J., Scherer G.W. Sol-Gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing, San Diego: Academic Press, 1990. С. 912.

3. Gupta R., Chaudhury N.K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosens Bioelectron*. 2007, 22(11), 2387–2399.

4. Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem Mater.* 1994, 6(10), 1605–1614.

5. Nadzhafova O., Etienne M., Walcarius A. Direct electrochemistry of hemoglobin and glucose oxidase in electrodeposited sol–gel silica thin films on glassy carbon. *Electrochem Commun*. 2007, 9(5), 1189–1195.

6. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol–gel materials. *J Mater Chem.* 2006, 16(11), 1013–1030.

7. Рожанчук Т.С., Тананайко О.Ю., Мазуренко Е.А., Егоров О.А. Углеситалловый электрод, модифицированный пленкой SiO2–Гемоглобин–Золото, как перспективный чувствительный элемент биосенсора. *Журн. Аналит. Химии*. 2012, 67(2), 191.

8. Bartlett P.N. Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications, *Chippenham: John Wiley & Sons, Ltd*, 2008. С. 494.

9. Солдаткін О.О., Сосовська О.Ф., Бенілова І.В., Гончар М.В., Корпан Я.І. Ензимний кондуктометричний сенсор для визначення концентрації формальдегіду у модельних зразках. *Біополім і Клін.* 2005, 21(5), 425–432.

10. Иванова Е.В., Шуман В., Рябов А.Д. Безреагентные ферментные сенсоры для on-line определения глицерина на основе электродов из углеродной пасты, содержащих рутениевые медиаторы. *Журн. Аналит. Химии*. 2009, 64(4), 421–427.

11. Agüí L., Eguílaz M., Peña-Farfal C., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on an Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode. *Electroanal*. 2009, 21(3-5), 386–391.

12. Di J., Cheng J., Xu Q., Zheng H., Zhuang J., Sun Y., et al. Direct electrochemistry of lactate dehydrogenase immobilized on silica sol-gel modified gold electrode and its application. *Biosens Bioelectron.* 2007, 23(5), 682–7.

13. Liu S., Cai C. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. *J Electroanal Chem.* 2007, 602(1), 103–114.

14. Shkotova L., Soldatkin A., Gonchar M., Schuhmann W., Dzyadevych S.V. Amperometric biosensor for ethanol detection based on alcohol oxidase immobilised within electrochemically deposited Resydrol film. *Mater Sci Eng C.* 2006, 26(2-3), 411–414.

15. Жмаева Е.В., Шеховцова Т.Н. Ферментативный метод определения неорганических и органических ингибиторов алкогольдегидрогеназы. *Журн. Аналит. Химии.* 2000, 55(8), 869–879.

16. Schauder S., Schneider K.H., Giffhorn F. Polyol metabolism of Rhodobacter sphaeroides: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology*. 1995, 141(8), 1857–1863.

17. Feng L., Liu Y., Tan Y., Hu J. Biosensor for the determination of sorbitol based on molecularly imprinted electrosynthesized polymers. *Biosens Bioelectron.* 2004, 19(11), 1513–1519.

18. Islam M.S., Sakaguchi E. Sorbitol-based osmotic diarrhea: possible causes and mechanism of prevention investigated in rats. *World J Gastroenterol*. 2006, 12(47), 7635–7641.

19. Yamamoto A., Ohmi H., Matsunaga A., Ando K., Hayakawa K., Nishimura M. Selective determination of D-sorbitol and D-mannitol in foodstuffs by ion chromatography with polarized photometric detection. *J Chromatogr A.* 1998, 804(1-2), 305–309.

20. Saidman S.B., Lobo-Castañón M.J., Miranda- A., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco P. Amperometric detection of D-sorbitol with NAD+-D-sorbitol dehydrogenase modified carbon paste electrode. *Anal Chim Acta.* 2000, 424(1), 45–50.

21. Miwa I., Kanbara M., Wakazono H., Okuda J. Analysis of sorbitol, galactitol, and myo-inositol in lens and sciatic nerve by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*.1988,173(1), 39–44.

22. Sim H.-J., Jeong J.-S., Kwon H.-J., Kang T.H., Park H.M., Lee Y.-M., et al. HPLC with pulsed amperometric detection for sorbitol as a biomarker for diabetic neuropathy. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009, 877(14-15),1607–11.

23. Horwitz W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th ed., Aoac International, 2005.

24. Девятин В.А. Методы химического анализа в производстве витаминов, Москва: Медицина, 1964. С. 360.

25. ГОСТ 25268-82. Изделия кондитерские. Методы определения ксилита и сорбита. 2004.

26. Bergmeyer H.U., Gruber W., Gutmann I. Methods of Enzymatic Analysis, V. 3, Verlag Chemie, 1974.

27. Šefčovičová J., Filip J., Tomčík P., Gemeiner P., Bučko M., Magdolen P., et al. A biopolymer-based carbon nanotube interface integrated with a redox shuttle and a D-sorbitol dehydrogenase for

robust monitoring of D-sorbitol. *Microchim Acta*. 2011, 175(1-2), 21–30.

28. Filip J., Sefčovičová J., Tomčík P., Gemeiner P., Tkac J., Šefčovičová J. A hyaluronic acid dispersed carbon nanotube electrode used for a mediatorless NADH sensing and biosensing. *Talanta.* 2011, 84(2), 355–361.

29. Hassler B.L., Kohli N., Zeikus J.G., Lee I., Worden R.M. Renewable dehydrogenase-based interfaces for bioelectronic applications. *Langmuir.* 2007, 23(13), 7127–7133.

30. Campbell C.E., Rishpon J. NADH Oxidation at the Honey-Comb Like Structure of Active Carbon: Coupled to Formaldehyde and Sorbitol Dehydrogenases. *Electroanal.* 2001, 13(1), 17–20.

31. Blaedel W.J., Jenkins R.A. Electrochemical oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Chem.* 1975, 47(8), 1337–1343.

32. Wang J., Angnes L., Martinez T. Scanning tunneling microscopic probing of surface fouling during the oxidation of nicotinamide coenzymes. *Bioelectrochem Bioenerg.* 1992, 29(2), 215–221.

33. Lin Y., Yantasee W., Wang J. Carbon nanotubes (CNTs) for the development of electrochemical biosensors. *Front Biosci.* 2005, 10(1-3), 492–505.

34. Rubianes M.D., Rivas G.A. Enzymatic Biosensors Based on Carbon Nanotubes Paste Electrodes. *Electroanal.* 2005, 17(1), 73–78.

35. Wang J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanal.* 2005, 17(1), 7–14.

36. Zhang M., Smith A., Gorski W. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. Anal Chem. 2004, 76(17), 5045–5050.

37. Wang Z., Etienne M., Kohring G.W., Walcarius A. Critical Effect of Polyelectrolytes on the Electrochemical Response of Dehydrogenases Entrapped in Sol-Gel Thin Films. *Electroanal.* 2010, 22(17-18), 2092–2100.

38. Cho J., Konopka K., Rozniatowski K., Garcialecina E., Shaffer M., Boccaccini A.R. Characterisation of carbon nanotube films deposited by electrophoretic deposition. *Carbon.* 2009, 47(1), 58–67.

39. Wang Z., Etienne M., Kohring G.-W., Bon-Saint-Côme Y., Kuhn A., Walcarius A. Electrochemically assisted deposition of sol–gel bio-composite with co-immobilized dehydrogenase and diaphorase. *Electrochim Acta.* 2011, 56(25), 9032–9040.

40. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии, Москва: Мир, 1981. С. 534.

41. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии, Москва: Высшая школа, 2002. С. 351.

42. Reynolds E.C. Contents of toothpaste - safety implications. *Aust Prescr.* 1994, 14(2), 49–51.

43. Birkhed D., Edwardsson S., Wikesjö U., Ahldén M.-L., Ainamo J. Effect of 4 Days Consumption of Chewing Gum Containing Sorbitol or a Mixture of Sorbitol and Xylitol on Dental Plaque and Saliva. *Caries Res.* 1983, 17(1), 76–88.

44. ГОСТ Р 53766-2009. Продукция соковая. Определение сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. 2009.