

УДК 543.068, 543.9

М.Г. Душейко, Н.В. Максимчук, В.О. Ульянова

Мікроелектронні амперометричні сенсори для біохімічних досліджень

Розглянуто проблеми вибору електродних систем для мультибіосенсорів амперометричного типу. Розроблено конструкцію планарних амперометричних електродних чіпів для мультисенсорної електрохімічної комірки. Спрощено та здешевлено технологію виготовлення електродних чіпів одноразового використання для амперометричних перетворювачів біосенсорних систем. Описано портативну біосенсорну вимірювальну систему, до складу якої входять розроблені амперометричні перетворювачі та приведені результати її тестування.

The problems of choice of electrode systems for amperometric type multibiosensors were considered. The design of planar amperometric electrode chips for multisensory electrochemical cell was developed. The manufacturing technique of disposable electrode chips for amperometric transducers of biosensory systems was simplified and its cost was reduced. The portable biosensor measurement system which includes manufactured amperometric transducers was described and the results of its testing were provided.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, планарний мультисенсорний перетворювач, електродний чіп, біохімічні дослідження, вольтамперограма.

Вступ

У біотехнологічній промисловості, медицині та екології необхідне здійснення контролю якості продукції, виявлення токсичних речовин, дослідження дії лікарських препаратів, діагностики різних захворювань, тощо. Існуючі на цей час методи контролю можна поділити на дві групи: фізико-хімічні та біосенсорні аналітичні методи. Проте фізико-хімічні методи (серологічні, методи на основі полімеразної ланцюгової реакції, рідинна та газова хроматографії, маспектроскопія, атомна абсорбційна спектрометрія, ЯМР та ін.) мають обмежене застосування: громіздкість устаткування, великі грошові витрати на проведення аналізу, недостатню чутливість, потребу в спеціальній професійній підготовці персоналу для проведення досліджень, неможливість застосування цих методів у польових умовах [1-3]. Саме тому актуальності набуває роз-

виток біосенсорних аналітичних методів завдяки їх простоті у використанні, невисокій вартості, можливості застосування у польових умовах, здатності до мініатюризації, можливості здійснювати аналіз в режимі реального часу.

Для створення біосенсорів найчастіше використовують амперометричні перетворювачі через простоту їх виготовлення, високу чутливість і селективність, лінійність характеристик, можливість вимірювати малі концентрації досліджуваної речовини [4]. В той же час, поширені електродні системи для амперометричних перетворювачів досить складні за конструкцією і виготовляються на основі благородних металів (золото, срібло, платина) або вуглецю. Наслідками є технологічні труднощі, складність утилізації відходів, трудомісткість, проблеми постійного переналаштування апаратури в умовах малосерійного виробництва різноманітних за призначенням сенсорів. Електроди на основі благородних металів мають високу вартість, а вуглецеві електроди, характеризуються нестабільністю характеристик [5]. Складність завдання полягає в поєднанні біохімічного та фізичного перетворювачів, забезпеченні повного і стабільного передавання ефекту біохімічної реакції з селективною мембраною на чутливий електрод сенсора. Найкраще це завдання вирішується при застосуванні планарних електродних систем, однак на цей час воно не вирішене. Існує також необхідність створення мультисенсорних систем типу «електронний язик» для одночасного аналізу декількох речовин. В Україні відсутні планарні багатоелектродні системи для біосенсорних досліджень.

Комерційні амперометричні мультиперетворювачі «Vino Multisens» з чотирма платиновими робочими електродами, одним допоміжним електродом з графітової пасти, та одним електродом порівняння (Ag/AgCl) виготовлені в Інституті хемо- і біосенсорики (Мюнстер, Німеччина) [6]. На робочі електроди наносяться біомембрани, строк служби яких обмежений – від тижня до місяця. Необхідність періодичної заміни мембрани викликає погіршення надійності та зростання похибки перетворювача. Такий чіп не може бути метрологічно атестованим і стає непридатним для подальших вимірювань, що особливо неви-

гідно при використанні дорогих електродних систем на основі благородних металів.

В цих умовах, для практичної реалізації мультибіосенсорних систем, перспективним є створення недорогих одноразових планарних мультиелектродних чіпів. При цьому виникає задача вибору матеріалу для виготовлення електродів, який був би дешевим та характеризувався необхідними електрохімічними властивостями і біосумісністю. За своєю конструкцією такий чіп повинен забезпечувати надійну інтеграцію з біохімічною мембраною.

Метою даної роботи є розробка конструкції та здешевлення технології виготовлення планарного мультисенсорного перетворювача для реалізації амперметричних біосенсорів.

Конструкція та технологія виготовлення амперметричного сенсора

Для реалізації амперметричного сенсора вибрано конструкцію, подібну до розробленої в Інституті хемо- і біосенсорики (Мюнстер, Німеччина), яка зображена на рис.1. З метою здешевлення та спрощення технології отримання таких перетворювачів, було застосовано інший

матеріал для виготовлення електродної системи – нікель. Витрати на матеріали для виготовлення електродів амперметричних перетворювачів з нікелю можна скоротити у 2630 разів порівняно з витратами на матеріали для виготовлення електродів із золота, та у 4300 разів - з платини. Оскільки вартість матеріалів для виготовлення електродів є ціноутворюючою складовою собівартості, то останню можна значно зменшити.

Нікель характеризується необхідними для електродів електрохімічними властивостями: низькою хімічно активністю, високою корозійною стійкістю та біосумісністю. Як показали проведені нами експериментальні дослідження, на основі нікелю можна виготовляти електродні чіпи з ідентичними характеристиками перетворення для різних зразків та по окремим каналам в межах одного зразка. Для мультисенсорних амперметричних приладів, що працюють в диференціальному режимі, не є обов'язковим використання електроду порівняння на основі Ag/AgCl. Також можливо використання нікелю для допоміжного електроду при умові збільшення його поверхні.

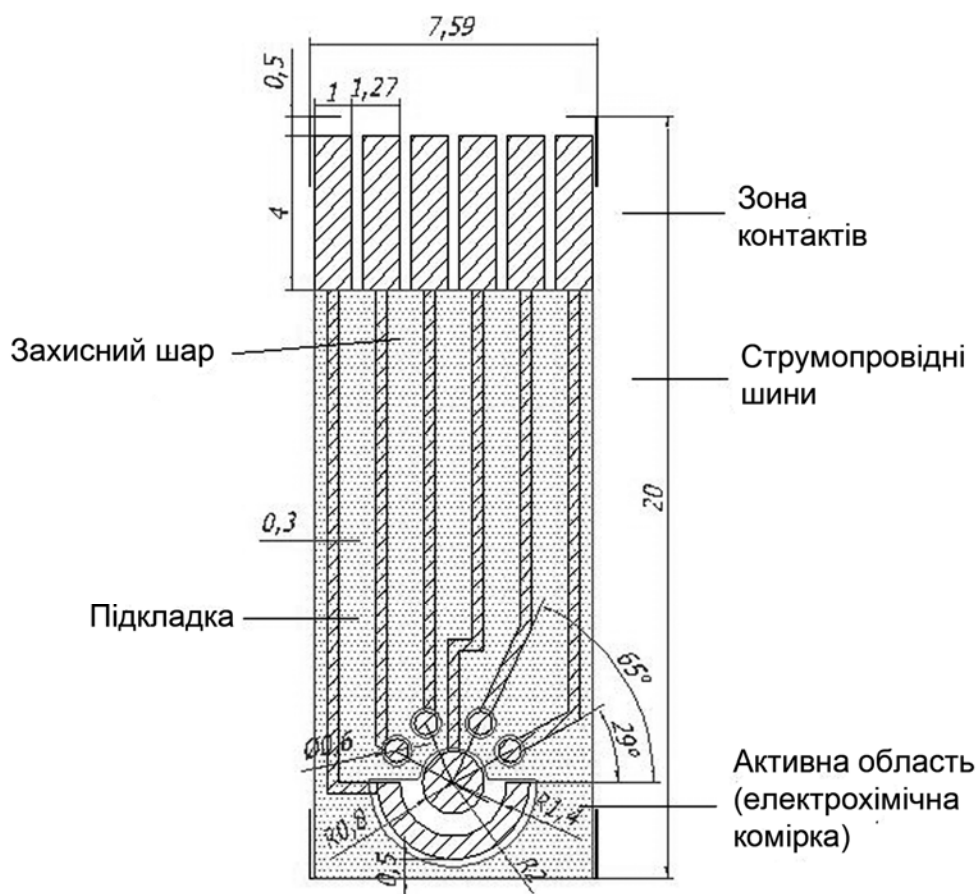


Рис. 1. Конструкція амперметричного перетворювача

Розроблена електродна система складається з шести нікелевих електродів: чотирьох робочих, порівняльного та допоміжного. Кожен робочий електрод відповідає одному з вимірювальних каналів, тому за допомогою такого сенсора можна вимірювати одразу 4 параметра досліджуваного розчину.

Вибрана геометрія робочих електродів дозволяє вимірювати малі значення струмів (від десятків пА), які виникають при протіканні біохімічних процесів, при мінімальних витратах дорогих біоматеріалів.

Струмопровідні шини за виключенням активної області та зони контактів закрито захисним шаром, в якості якого використано фоторезист ФП383 з товщиною 1,5 - 2 мкм. Поверхневий опір струмопровідних шин складає 0,13 - 0,15 Ом/□, що забезпечує опір доріжки від контактної області до активної зони не більше 30 Ом.

В якості підкладки використано ситал односторонньої поліровки марки СТ-50-І-0,6 з класом поліровки робочої поверхні – 13 - 14.

Підкладки СТ-50-І-0,6 очищено від жирового та іншого органічного забруднення шляхом кип'ятіння в перекисно-аміачній суміші наступного складу: $H_2O_2 : NH_4 : 3H_2O$ ($T = 80^\circ C$, $t = 10$ хв.) з наступною відмивкою в проточній дистильованій воді з питомим опором не менше 800 кОм/см. Сушка підкладок проведена шляхом скидання вологи на центрифугі. Контроль якості очистки пластин проводився шляхом короточасного занурення підкладки в дистильовану воду, при контролі часу утримки плівки води на поверхні підкладки.

Металізацію пластин проведено методом магнетронного розпилення на установці вакуумного наплення «Катод-1М». В якості провідної системи використовувались плівки $Ti - Ni$. Для формування адгезійного підшару Ti використано мішень марки ВТ1-00. Поверхневий опір плівки підшару складає 150-200 Ом/□. Плівки підшару сформовано при наступних технологічних параметрах: температура підкладки – $200^\circ C$, тиск робочого газу $Ar - 8 \cdot 10^{-3}$ мм. рт. ст., напруга на мішені – 450 В, $I = 2A$, час формування плівки – 45 с.

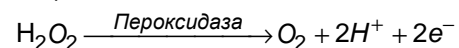
Для формування основного провідного шару використано плівки Ni марки НВК, які формувались при тиску робочого газу $8 \cdot 10^{-3}$ мм.рт. ст., температура підкладки – $200^\circ C$, $U_{роб} = 500V$, $I = 1,5A$, час формування плівки – 25 хв. Поверхневий опір плівки Ni складає $R_s \leq 0,15 \text{ Ом}/\square$.

Для формування топології сенсора та захисту струмопровідних шин використано два процеси фотолітографії. За допомогою першої фотолітографії сформовано топологію сенсора.

Друга фотолітографія використана для формування захисної плівки струмопроводів.

Дослідження характеристик амперометричного перетворювача

Робота амперометричного перетворювача ґрунтується на визначенні кількісного співвідношення між виходом електродної реакції за речовиною та зарядом, що пройшов крізь електрод [4]. Для визначення чутливості використано пероксид водню, оскільки цей розчин характеризується окиснювально-відновлювальними властивостями та присутній у більшості біохімічних реакцій.



Амперометричний перетворювач підключається до вимірювального модуля з 4-х канальним потенціостатом, розробленого в Інституті електродинаміки Національної академії наук України [7], який під'єднується до комп'ютера (рис. 2).

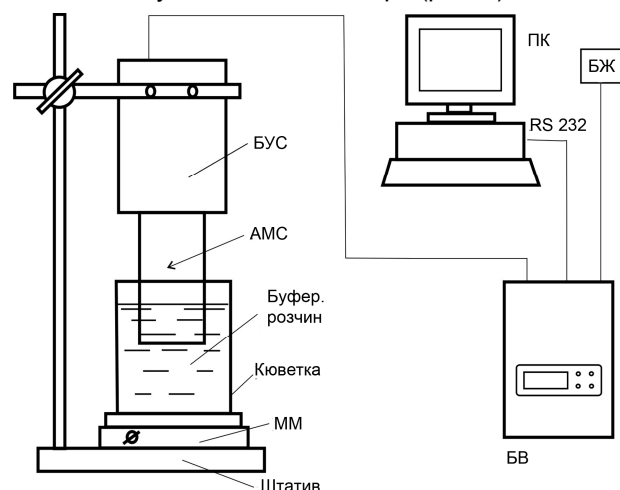


Рис. 2. Схема біосенсорного амперометричного комплексу

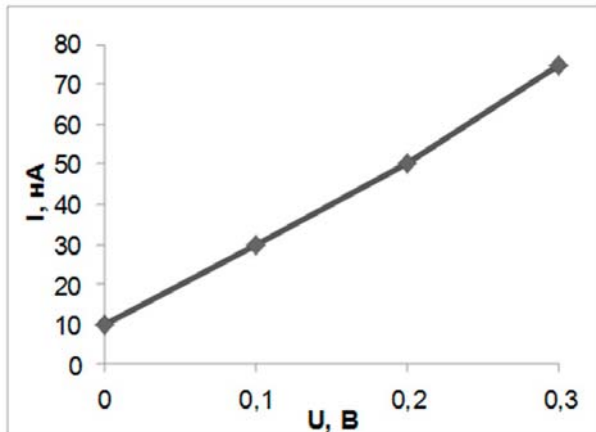
До складу вимірювальної системи входять блок утримувача сенсорів БУС з планарним амперометричним мультисенсором АМС, вимірювальний блок ВБ, портативний персональний комп'ютер ПК і магнітна мішалка ММ.

Мультисенсорну електрохімічну комірку встановлено в роз'ємі сенсорного блоку, що закріплено на штативі, і з'єднаний кабелем з вимірювальним блоком. Комірку занурено в досліджуваний розчин, який знаходився в реакторній кюветі, що встановлена на мішалку. Вимірювальний блок складався з уніфікованої частини - базового модуля та потенціостата, через який підключено електрохімічну комірку. ВБ було з'єднано з комп'ютером за допомогою інтерфейсного кабелю через COM-порт або USB-порт.

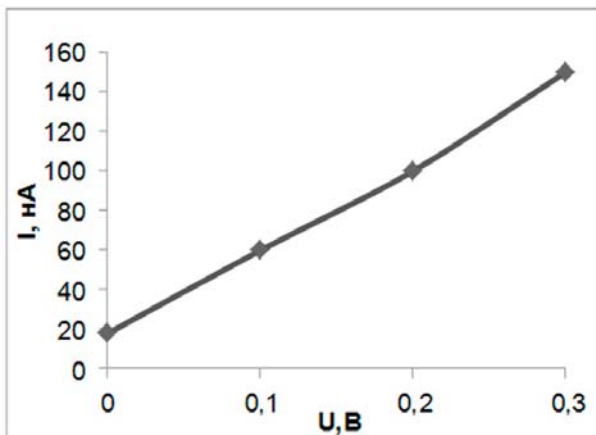
Для тестування роботи амперометричних перетворювачів реєструвалась залежність

струму в електрохімічній комірці від прикладеної до неї напруги з використанням деіонізованої води, у якій в малих концентраціях присутні електроактивні речовини (рис. 3, а).

Для перевірки чутливості розроблених робочих зразків використано 10 ppm розчин перекису водню на основі деіонізованої води та визначено залежність струму в електрохімічній комірці від прикладеної напруги $I(U)$ (рис. 3, б), яка була лінійною в зазначеному діапазоні напруг, причому додавання 10 ppm перекису водню збільшило сигнал сенсора в 2 рази.



а



б

Рис. 3. Залежність струму від прикладеної напруги в статичному режимі у деіонізованій воді (а) і у розчині перекису водню (б)

Оскільки для вивчення продуктів перетворення електрохімічних реакцій важливо знати кінетику їх протікання, нами також знято циклічні вольтамперограми у 20 мл 5 мМ буферного розчину при температурі 21-22°C (рис. 4).

При прикладенні потенціалу від -1 В до -0,3 В відбувається рух електронів з електрода на Ох-частинку, внаслідок чого зростає швидкість її відновлення і, відповідно, струм. Збільшення струму не триває нескінченно, оскільки концентрація Ох-частинок на катоді зменшується. В ре-

зультаті, на вольтамперограмі спостерігається пік відновлення і подальше зменшення струму. Струм у максимумі кривої зростає пропорційно концентрації окисненої форми частинок. Коли в процесі відновлення кількість Ох-частинок на поверхні електрода починає зменшуватися, їх місце займають Red-частинки. У разі зміни напрямку прикладеного до електрода потенціалу на протилежний спостерігається зворотній ефект.

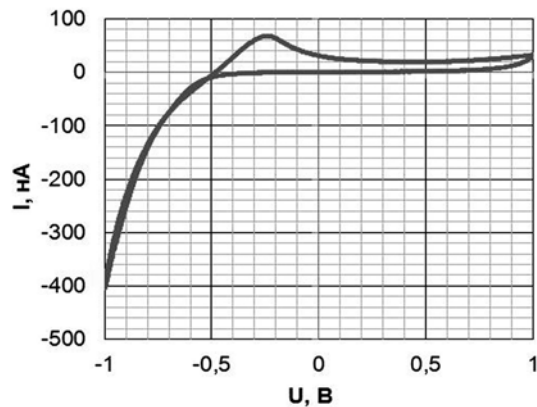


Рис. 4. Циклічна вольтамперограма у буферному розчині

Після досягнення редокс-потенціалу Red-частинки починають переокиснюватися до Ох-частинок. Струм збільшується у зворотному (окиснювальному) напрямку, доки не досягається пік окиснення.

Такі ж процеси протікають у реакціях, в яких беруть участь каталітичні компоненти, зокрема ферменти. У такій системі відновлена форма частинок може бути регенована ферментом.

Висновки

Запропоновані та розроблені планарні амперометричні перетворювачі характеризуються значно меншими витратами на матеріали для виготовлення електродних чіпів (у 2630 разів або на 99,98% менше, порівняно з витратами на матеріали для виготовлення електродних чіпів амперометричних перетворювачів з золота, та у 4300 разів або на 99,995% менше - з платини) простішою технологією виготовлення та порівняною чутливістю (на рівні одиниць-десятих ppm електроактивних речовин в розчині) з чіпами на основі благородних металів. Запропоновані і реалізовані електродні системи дозволяють вимірювати параметри відразу чотирьох біохімічних реакцій, розширюють можливості амперометричного перетворювача та універсализують біосенсор.

Результати роботи були використані при виконанні проекту «Портативний аналізатор на ос-

нові амперометричних ферментних біосенсорів для контролю за якістю напоїв у виноробстві. Розробка прототипів електронних вимірювальних каналів портативного амперометричного аналізатора» № держреєстрації 0107U003159, що виконувався в Інституті електродинаміки НАНУ.

Література

1. *Donham K.J., Berg J.W., Sawin R.S.* // Am. J. Epidemiol. – 1980. – V.112. – P.80-92.
2. *Гулюкин М.И., Замораева Н.В., Иванова Л.А., Грек К.П., Симонов А.В., Баркова Н.В.* // Ветеринарная газета.–2001.–№12.–С.1-2.
3. *Пирогова Л.В., Артюх В.П., Стародуб М.Ф., Нагаева Л.І., Добросол Г.І.* Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби // Укр. биохим. журн.–2002.–№4.– С.53-58
4. *Дзядевич С.В., Солдаткін О.П.* Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. – К.:Наукова думка. – 2006. – 255 с.
5. *Dzyadevich S.V., Schuvailo O.M., Danileiko L.V. et al.* Development of amperometric enzyme biosensors based on carbon fibre microelectrode for in vivo determination of glucose, choline and ecetylcholine // Book of the 16th European Conference on Solid-State Transducers. – Prague (Czech Republic),–2002.–P.1159–1162.
6. *Senslab GmbH, Leipzig, Germany* (<http://www.senslab.de>).
7. *Василенко А.Д., Шкотова Л.В., Мельник В.Г., Семенычева Л.Н., Дзядевич С.В.* Многоканальный измерительный комплекс для электрохимических исследований // Сенсорна мікроелектроніка і мікросистемні технології.– 2009. – № 1. – С.64-75.