

УДК 621.382:681.586

МІКРОЕЛЕКТРОННІ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧНІ БІОСЕНСОРИ

М. Ф. СТАРОДУБ¹М. І. КАНЮК¹О. М. ШМИРЄВА²¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ²Національний технічний університет України «КПІ», Київ*E-mail: starodub@biochem.kiev.ua*

Проаналізовано відомі біосенсорні методи визначення концентрації глюкози, сахарози і лактози; розглянуто основи та принципи розроблення амперометричних біосенсорів з використанням нових типів полімерів і наноелектродів для створення біохімічних елементів. Наведено експериментальні результати власних розробок мікроелектронних мультипараметричних інтегральних біосенсорів.

Ключові слова: мікроелектронні біосенсори, амперометрія, термометрія, мультипараметричне визначення вмісту глюкози, сахарози та лактози.

У біотехнологічній, фармацевтичній, харчовій, переробній та хімічних галузях промисловості є великий попит на автоматизований контроль та керування системами виробничого процесу протягом усього робочого циклу. Для цього потрібні надійні, придатні для довгострокового використання інструментальні аналітичні пристрої. Біосенсори якраз і відповідають таким вимогам. Це — новий клас приладів, які розвиваються на стику біології й електроніки і поєднують виняткову селективність біологічних об'єктів до речовин, що визначаються, з високою чутливістю сучасної мікроелектроніки до реєстрації генерованого фізико-хімічного сигналу.

Основні складнощі під час розроблення біосенсорів полягають у необхідності створення нової конструкції чутливого елемента та перетворювача для кожної нової аналізованої речовини. Разом з тим конкурентоспроможність на ринку біосенсорів на сьогодні визначається такими вимогами практики: собівартістю пристрою та окремого вимірювання; стабільністю результатів; наявністю можливостей електронного оброблення даних; якістю результатів, що передбачає вибірковість та чутливість аналізу; швидкістю відгуку; кількістю матеріалу, необхідного для дослідження; можливістю проведення аналізу цілого набору різних речовин за допомогою чутливих однотипних елементів (чи навіть того самого чутливого елемента). За всіма переліченими вище показниками розроблювані біосенсори мають найвигіднішим чином відрізнятися від тих інструментальних аналітичних засобів, які вже

створено, а крім того, якомога повніше наближатися за параметрами до всього комплексу суворих вимог практики.

Незважаючи на те, що біосенсори належать до пристроїв безперервного контролю речовин у природних умовах, тільки відносно мала їх кількість має комерційний успіх. Часто функціонування біосенсорів стрімко знижується впродовж дослідження через забруднення та псування електродної поверхні, а також старіння біологічного матеріалу.

Вимірювання одного параметра з урахуванням складності й багатофакторності біохімічних процесів принципово не може забезпечити створення біосенсора, який відповідав би сукупності таких необхідних характеристик, як стабільність, відтворюваність результатів, стійкість до забруднення, тривалий час життя біоелемента, селективність, чутливість, температурна стійкість та ін.

Для деяких галузей промисловості, зокрема переробної, харчової та фармацевтичної, нині гостро постала проблема експресного електронного методу визначення концентрації глюкози, сахарози та лактози.

У зв'язку з цим метою даної роботи є аналіз особливостей амперометричного принципу визначення низки біохімічних показників, його конструктивних рішень та узагальнена характеристика сучасних амперометричних аналізаторів. Особливу увагу приділено відомим біосенсорним методам визначення концентрації глюкози, сахарози і лактози, зокрема тим, що використовують саме амперометричний підхід. Виходячи з наведених даних запропоновано новий інтегральний

мультипараметричний мікроелектронний біосенсор, який поєднує одночасно амперометричний та термометричний способи визначення біохімічних параметрів, та охарактеризовано роботу цього типу інструментального засобу.

Методи вимірювання концентрації глюкози, сахарози та лактози

Основні характеристики існуючих способів визначення концентрації глюкози, лактози та сахарози наведено в табл. 1 [1–17].

Загальний недолік усіх відомих біосенсорів — це обмежений час життя іммобілізованого ферменту під час використання його як чутливого елемента, що зменшує кількість вимірювань та час експлуатації пристрою. Найзручніше проводити вимірювання за допомогою ферментних електродів в амперометричному режимі, тобто вимірювати силу струму (потік електронів) через поверхню електрода. Сила струму, як показник швидкості реакції, може бути однозначно пов'язана з концентрацією вимірюваного компонента.

Таблиця 1. Порівняльна характеристика методів вимірювання концентрації глюкози, сахарози і лактози

Метод вимірювання	Вимірюваний параметр	Переваги	Недоліки	Чутливість/діапазон вимірювання	Джерело
Амперометричний	Сила струму, який проходить через електроди	Простота виготовлення приладу, висока чутливість та селективність, можливість вимірювання малих концентрацій	Чутливість до побічних речовин	1–10 нА/мМ	[1–3]
Потенціометричний	Потенціал на електродах	Простота виготовлення приладу, порівняно малі розміри, відтворюваність результатів, низька вартість в умовах масового виробництва	Чутливість до буферної ємності розчину, недостатньо висока селективність	<= 90 мВ/рН	[1, 2]
Кондуктометричний	Провідність між електродами	Простота виготовлення приладу, висока чутливість та селективність, можливість вимірювання низьких концентрацій	Чутливість до побічних речовин	–	[1, 2]
Датчики на основі ІСПТ*	Зміна потенціалу на затворі ІСПТ*	Простота виготовлення приладу, можливість роботи в диференційному режимі, малі розміри, відтворюваність результатів, низька ціна в умовах масового виробництва, можливість зміни біоплівки	Недостатньо висока селективність через складнощі виготовлення біошару, чутливість до буферної ємності розчину	<= 45 мВ/рН	[4–6]
Термометричний	Тепло, яке виділилося під час реакції	Можливість проведення <i>on-line</i> аналізу з високою точністю та селективністю	Висока температурна інерція, недостатньо висока чутливість	0,5–20 мМ та рівень відповіді $5 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}$	[7–11]
Оптичний	Реєстрація оптичної активності	Можливість використання одного й того самого чутливого елемента та трансдюсера для аналізу широкого класу речовин, найвища чутливість	Складність конструкції, висока ціна, нестабільність результатів	10^{-7} M	[12–13]
Хемілюмінесцентний	Визначення сигналів хемілюмінесценції в разі зміни вмісту аналізованої речовини	Висока чутливість і селективність, простота виконання та низька вартість аналізу	Необхідність враховувати ефект фонові люмінесценції від допоміжних матеріалів	0,1–7 мМ із межею чутливості 10^{-5} M	[14–17]

*ІСПТ — іонселективний польовий транзистор.

Амперометричні біосенсори надійні, відносно дешеві, високочутливі до впливу довкілля. Починаючи з публікацій Кларка та Ліона [2] розроблення їх стало одним із найбільш популярних і перспективних напрямів у біохімії. Вражаючим є те, що кількість присвячених цьому щорічних публікацій у 1980 році становила понад 150, а в 1995 — близько 2 000 [16, 18].

На сьогодні дати повний аналіз розвитку амперометричних біосенсорів в окремій статті неможливо, і тому ми зосередимо увагу лише на основних аспектах особливостей їхньої будови та напрямів розвитку, а також наведемо наші дані щодо шляхів комбінування їх з іншими видами перетворювачів біохімічного сигналу для створення багатопараметричних біосенсорів.

Вихідний сигнал під час амперометричних вимірювань є функцією концентрації аналіту, часу вимірювання та низки інших факторів, але фактично вимірюється фарадівський струм, пропорційний концентрації відповідної речовини.

Як індикаторні електроди в амперометрії найчастіше застосовують тверді (скловуглець, срібло, платина) стаціонарні й обертові електроди різної форми, а як електроди порівняння — хлорид срібла або каломельний електрод. Ці електроди вміщують в аналізоване середовище та прикладають до них постійну напругу. Вимірюваним параметром є сила струму I . Оскільки величина I залежить від швидкості електрохімічної реакції, що відбувається на індикаторному електроді, то встановлюють такий потенціал, який відповідав би ділянці дифузійного струму (I_d) речовини. Зазвичай потенціал індикаторного електрода встановлюють на 0,1–0,3 В більш негативним (чи позитивним), ніж потенціал напівхвилі. Якщо потенціал вибрано вірно, то прямолінійна залежність дифузійного струму від концентрації зберігається в широкому діапазоні концентрацій. Якщо ж потенціал не відповідає ділянці дифузійного струму, то ця залежність має нелінійний характер.

Основними факторами, які впливають на процес вимірювання, є: наявність речовин у розчині, що можуть впливати на значення вимірюваного струму, за рівнем якого визначають концентрацію основної речовини в амперометричних біосенсорах; присутність у розчині молекул, які можуть створювати абразивний ефект на мембрану біосенсора, що призводить до виведення його з ладу; температура перебігу біохімічної реакції; виділення тепла як основними, так

і побічними речовинами; вплив продуктів реакції на активність ферменту; динаміка реакції та швидкість проходження електронів до вимірювального електрода [1]. Усі зазначені чинники слід враховувати під час створення біосенсора.

Аналіз сучасних розробок амперометричних біосенсорів

Принцип роботи таких біосенсорів базується на тому, що аналізована речовина дифундує через напівпроникну мембрану тонкого шару біологічного матеріалу, в якому відбувається реакція з утворенням відповідних електрохімічних продуктів, що піддаються окисненню або відновленню на електроді. Селективність біосенсора залежить від природи чутливого шару. Так, біосенсори електронної провідності, які виготовлено з хімічно стійких матеріалів (платини, вуглецю тощо), чутливі до хімічних процесів за участю електронів, тобто до всіх окисно-відновних процесів.

На рис. 1 наведено загальну схему вимірювального амперометричного електрода на прикладі сенсора кисню.

Діапазон лінійності концентраційної залежності для амперометричних біосенсорів становить 2–4 порядки з нижньою межею чутливості від 10^{-4} до 10^{-9} М [1, 3, 11].

Як електроди можуть бути використані вуглецеві волокна у вигляді ультрамікроелектродів чи навіть наноелектродів (~100 нм) з високою міцністю та низькою ціною [3], зокрема нанорозмірний ферментний електрод для вимірювання вмісту глюкози. Він базується на додаванні ферментів до вуглецевого конусного волоконного наноелектрода.

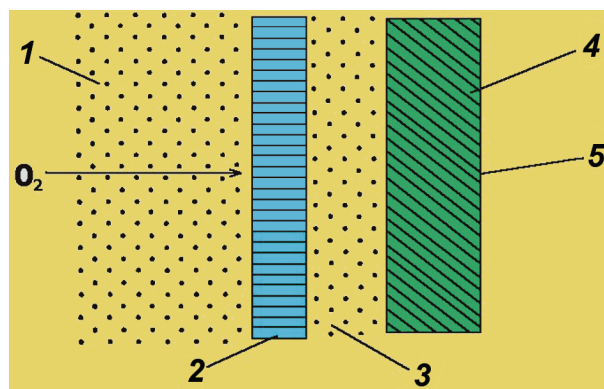


Рис. 1. Схема електрода для визначення вмісту кисню:

1 — зовнішній електроліт; 2 — пориста мембрана; 3 — внутрішній електроліт, 4 — індикаторний електрод; 5 — струмовідвід

Новий нанобіосенсор, об'єднаний з опорним мікроелектродом на Ag/AgCl, дає дуже селективну й швидку реакцію на глюкозу за низького робочого потенціалу (-0,1 В). На рис. 2 схематично зображено конструкцію цього біосенсора [3]. На кінці вуглецевого волокна (4) методом плівкової іммобілізації глюкозооксидази створено мініатюрний біохімічний електрод (1), який конструктивно розміщений у капілярі (7). Омичний контакт з вуглецевим електродом (4) здійснюється за допомогою тонкої мідної плівки (5), нанесеної на його поверхню та з'єднаної з мідним електродом (9). Порівняльний електрод (3) реалізовано на тонкій плівці срібла (6), на якій у зоні вимірювання виготовлено плівку хлориду срібла AgCl.

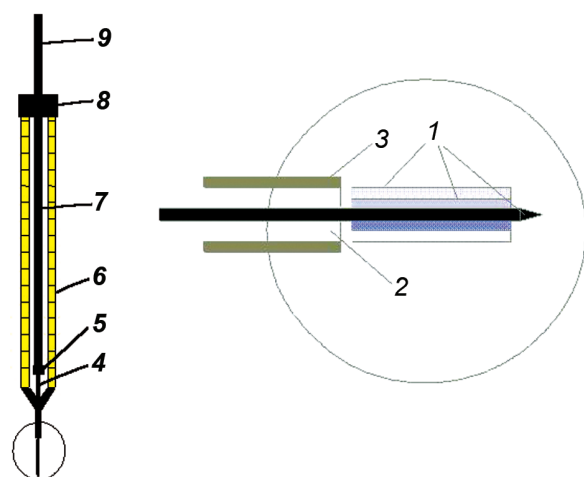


Рис. 2. Схема конструкції вуглецевого наносенсора з ферментною плівкою та інтегрованим Ag/AgCl шаром:

1 — вуглецеве волокно з іммобілізованим ферментом; 2 — внутрішня поверхня волокна; 3 — тонка плівка Ag/AgCl; 4 — вуглецеве волокно; 5 — вуглецеве волокно, зв'язане з міддю; 6 — срібна тонка плівка; 7 — скляний капіляр; 8 — шар епоксидної смоли; 9 — мідний провід

На рис. 3 подано варіант імплантованого мікромініатюрного біосенсора, що забезпечує можливість визначення вмісту глюкози у крові в режимі безперервного контролю.

У табл. 2 наведено типи ферментних біосенсорів з амперометричним детектуванням [1, 3]. Амперометричні ферментні біосенсори забезпечують вимірювання концентрацій найважливіших речовин у необхідному діапазоні. Для запобігання забрудненню електрода та збільшення ресурсу біосенсора його поверхню покривають нафіоном [3], унаслідок чого час роботи таких біосенсорів збільшується в 10 разів порівняно з біосенсорами без покриття. На рис. 3 наведено схему

Таблиця 2. Ферментні біосенсори з амперометричним детектуванням [1, 3]

Субстрат	Фермент	Діапазон концентрацій, мМ
Глюкоза	Глюкозооксидаза	0,5–50
L-лактат	Лактатоксидаза	0,01–12
Сечова кислота	Урикази	0,01–3
Етанол	Алкогольоксидаза	0,02–30
Сахароза	Комплекс ферментів	0,1–80
Лактоза	P-галактозооксидаза	0,1–200
Аденозин-трифосфат	Гексокіназа	0,03–0,4
L-лізин	Лізиноксидаза	0,02–20
p-L-феніл-аланін	Оксидаза D-амінокислот	0,01–15
Холестерол	Холестеролоксидаза	0–0,2
Фенол	Поліфенолоксидаза	0–0,08
Оксалат-іон	Оксалатоксидаза	0–0,1
Піруват-іон	Піруватоксидаза	0–1
Саліцилат-іон	Саліцилатгідроксилаза	0,01–2
Ксантин	Ксантиноксидаза	0,01–0,6
Холестерол	Холестеролоксидаза	0,4–12

глюкозного біосенсора, який імплантується. Цей біосенсор складається з платинового проводу, покритого політетрафлюоретиленом, що використовується як електрод індикації. Поверх ізоляції з одного кінця намотано срібний дріт. На відстані 2 мм від іншого краю створено чутливий елемент, який охоплює внутрішню мембрану (окисно-відновний полімер), фермент глюкозооксидазу (ГОД) та зовнішню мембрану (наприклад, з нафіона) [19].

Досягнення високої точності виміру низької концентрації глюкози для електрохімічних біосенсорів є проблематичним через такі фактори:

- електрохімічно побічні речовини, які зазвичай спричиняють постійну похибку, незалежну від концентрації глюкози.

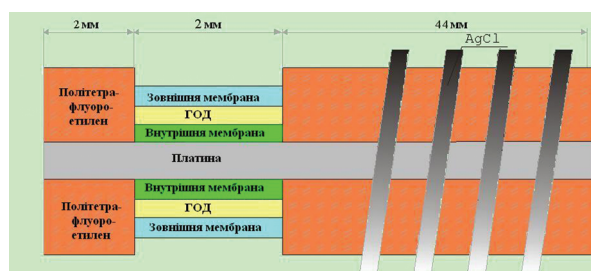


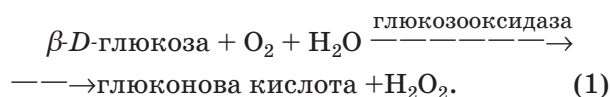
Рис. 3. Схема конструкції імплантованого біосенсора для визначення вмісту глюкози

Наприклад, якщо вплив сечової кислоти на сигнал глюкози буде на рівні 10 мг/л, то це підніме її аналізовану концентрацію з 300 мг/л до 310 мг/л, у такому разі буде невелика похибка, однак при концентрації глюкози 60 мг/л збільшення на 10 мг/л уже помітніше;

- використовуючи як фермент ГОД слід враховувати вплив кисню, оскільки він, поряд із медіатором, є відповідальним за перенесення електрона на електрод, і низька його концентрація призводить до зниження сигналу, а отже й до недовиявлення глюкози, тимчасом як високий його вміст зумовлює підсилення сигналу і переоцінку вмісту глюкози; особливо це виявляється за низьких її концентрацій.

На відміну від багатьох амперометричних пристроїв, в індикаторі FreeStyle використовується медіатор, який працює при низькому потенціалі (-0,1 В), що усуває майже всі електрохімічні впливи [20]. У цьому разі застосовують метод вимірювання, який дозволяє зменшити вплив будь-яких речовин, що можуть реагувати за дуже низького потенціалу. Індикатор FreeStyle усуває вплив кисню за допомогою використання глюкозодегідрогенази як ферментативного каталізатора в реакції з глюкозою. На відміну від ГОД, кисень не залучений у реакції глюкозодегідрогенази, і вплив його істотно зменшується. Індикатор FreeStyle показує високий рівень відтворюваності результатів зі стандартними відхиленнями в діапазоні 1,3–1,6 мг/л [20].

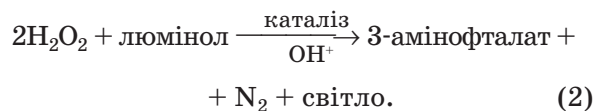
Для визначення вмісту глюкози у крові методом хемілюмінесценції теж використовують ГОД [11]. Фермент досить активний, відносно стійкий та доступний, тому його широко застосовують для розроблення калориметричних, електрохімічних та оптичних біосенсорів. За хемілюмінесцентним принципом визначення глюкози потрібно вимірювати концентрацію пероксиду водню, що утворюється при окисненні глюкози у присутності молекулярного кисню:



Запропоновано новий спосіб визначення пероксиду водню, який утворився у процесі ферментативної реакції (1), — визначення різниці сигналів хемілюмінесценції в разі зміни вмісту пероксиду водню [21].

Найширше в хемілюмінесцентних реакціях як косубстрат використовують люмінол. Як видно з рівняння (2), він окиснюється

радикалом кисню, що утворюється з пероксиду під час ферментативної реакції, яка індукує хемілюмінесценцію. Спектр її лежить у широкому діапазоні частот, а максимальна інтенсивність досягається при 425 нм.



У визначених межах інтенсивність хемілюмінесценції безпосередньо пропорційна концентрації пероксиду водню або люмінолу. Для каталізу також використовують такі іони металів, як Co^{2+} , Cu^{2+} та Fe^{3+} , або ж різні металеві комплекси. Метод хемілюмінесценції є особливо перспективним через його високу чутливість, селективність, простоту та низьку вартість аналізу [1, 21].

Імобілізація ферментів

Еліпсометричні дослідження адсорбції ГОД на золоті показали, що вона адсорбується за три стадії, що призводить до повільного розгортання та значної втрати її третинної структури [22, 23].

Одним з ефективних підходів є зв'язок окисно-відновної ділянки ГОД із гладкою поверхнею вуглецевого електрода, модифікованого амінофенілборною кислотою для безпосередньої передачі електронів [23]. Поверхня цього електрода окиснюється, а створені карбоксильні групи реагують з амінофенілборною кислотою до розчинного у воді карбодііміду. Утворені модифіковані електроди занурюють у розчин ГОД. Передавання електронів відбувається з приєднанням флавінаденіну нуклеотиду (ФАД) до ферменту.

Електрохімічна полімеризація є перспективним напрямом [24, 25]. Це проста процедура, відповідно до якої мономер окиснюється у присутності ферменту. Полімер, який утворився, може бути провідником чи не провідником струму, залежно від взятого мономера. Імобілізований фермент огортається шаром, що прилягає до електрода. Товщину цього шару можна легко змінювати, регулюючи прикладений потенціал. Таким чином можна створити біосенсор з одним чи декількома шарами, або з декількома ферментами в одному, або ж у декількох шарах.

Як іммобілізаційну основу часто використовують пірол, який може бути полімеризований за напруги понад 600 мВ, працюючи при фіксованому потенціалі, або із

застосуванням циклічної вольтамперометрії. Фізичні властивості шару залежать від природи використовуюваного електрода, швидкості полімеризації, присутності іонів та від рН розчину.

Власне процес іммобілізації складається з таких етапів [24]:

- створення мономерних та димерних катіонних радикалів, які формують олігомери, що, у свою чергу, осідають на електроді як полімерні ланцюги;
- маючи великий негативний заряд при рН 7, ГОД електростатично втягується в ланцюг полімеру, що дозволяє іммобілізувати фермент.

Останнє пояснюється тим, що під час адсорбування ГОД на поліпірольні плівки кількість цього ферменту зменшується у присутності конкуруючих аніонних молекул типу сульфанованого гідрофінолу та фероціаніду, тому дуже важко залучити позитивно заряджені білки. Слід також зважати на те, що впродовж процесу іммобілізації рН біля електрода зменшується, а відтак для запобігання денатурації ферменту потрібна присутність буферного розчину.

Для іммобілізації ферменту можна використовувати й інші провідні полімери, такі як політіофен, полііндол та поліанілін [23–25]. Однак ці електрополімери мають істотні недоліки. Перші потребують протонних розчинників, останні, у більшості випадків, — сильнокислого розчину (рН близько 1).

У разі використання непровідних полімерів, таких як поліфеноли, плівки виходять тонкими (50–100 нм), гідрофобними й ізолювальними [23–25]. Ці тонкі плівки дозволяють швидко поширювати субстрат і продукт, демонструючи при цьому селективність до сторонніх компонентів. Полімеризація фенолів подібна до полімеризації поліпіролу. Як показала ферофериціанідна вольтамперометрія, плівки виходять безперервними та бездефектними. Непровідні плівки також утворюються з 1,2-діамінобензолу.

Іншим способом іммобілізації ферменту є ковалентне зв'язування. Найпоширеніший метод — з використанням реактивних силанів [24]. Поряд із цим відомі й інші методи: модифікування електрода хлоридом ціансечовини, застосування спирту або аміну. Вуглецеві поверхні можуть бути функціоналізовані після поверхневого окиснення. Одержані карбоксильні групи можна активувати хлоридом тіонілу або карбодімідами, які потрібні для фіксування біомолекул.

Перспективним напрямом є створення біодатчика, в якому буде полімерна матриця з іммобілізованими ферментом та медіатором [24, 25]. Для цього використовують різні окисно-відновні полімери, де молекули пришиті до полімерних ланцюгів. У такому разі електрод (платина) та окисно-відновний фермент (ГОД) електрично зв'язані через окисно-відновний полімер, і заряд може передаватися з електрода на фермент.

Самі окисно-відновні полімери бувають трьох категорій, відповідно до типу контакту окисно-відновних центрів з основою полімеру: ковалентні, координативні або електростатичні.

Як полімерний медіатор можна використовувати полівінілфероцен, осад якого утворюють на дискових електродах та гальванічно окиснюють у розчині ГОД для іммобілізації ферменту [25].

Застосування полісилоксанів із гнучкими ланцюгами через низьку обертальну енергію виявилось ефективним для окисно-відновних реакцій. Однак ці полімери розчинні тільки в органічних середовищах, і тому потрібно здійснити два різних етапи формування полімеру та включення в нього ферменту на поверхні електрода [26].

Амперометричні електроди для визначення глюкози з іншими полімерами, наприклад фероценом, приєднаним до полі-*L*-лізіну, виготовляли одночасною іммобілізацією полімеру та ферменту за допомогою напівпроникної мембрани [26, 27].

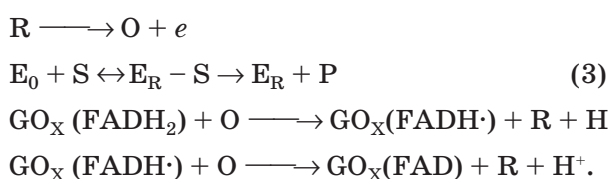
Окрім того, окисно-відновними медіаторами можуть слугувати розчинні окисно-відновні гідрогелі, зокрема модифіковані полівінілпіридиновим комплексом осмію. Фермент ГОД спочатку іммобілізується у двовимірній структурі через електростатичне комплексоутворення у процесі електродного або ковалентного зв'язування з осадом тирозину. Цей полімер ефективно каталізує окиснення глюкози під час адсорбування на графітовий електрод [25, 26].

У разі використання ліпоксиду як сполучного засобу будуються тривимірні мережі, які електрично з'єднують окисно-відновні центри ферменту з електродами. На цьому етапі відбувається утворення комплексу шляхом змішування ферменту та окисно-відновного розчину полімеру. І на решті для ковалентного зв'язку потрібно додавати ліпоксид. Це дозволяє одержувати великі питомі величини струму у присутності вільнорозповсюдженого субстрату в анаеробних умовах. Додаванням шару

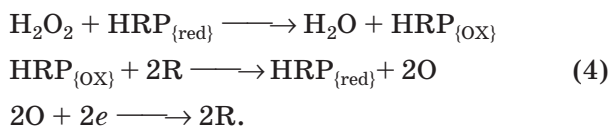
імобілізованої пероксидази можна усунути вплив аскорбату, урату та ацетоамінофену [27–29].

Полівінілімідазол — окисно-відновний полімер, який використовують для створення селективного електрода для підшкірної імплантації з метою визначення вмісту глюкози [19]. Такий датчик не містить жодних унікальних компонентів і виявляє високу стабільність у необхідному діапазоні концентрацій.

Каталітичний цикл ферменту для анаеробного окиснення субстрату глюкози (S) у присутності ко-субстрата, який зв'язаний з полімером (O), та за наявності гідрогелю, можна зобразити рівнянням (3) [24, 30]:



У цьому разі досягається прямий електричний зв'язок між новим акрилово-акриламідним кислотним фероценовим співполімером та ГОД. Окисно-відновний полімер ефективно функціонує з пероксидазою хрому відповідно до реакції (4):



Пошарове самозбирання окисно-відновного катіонного полімеру та ГОД є інтегрованою хімічною системою для конструювання біосенсорів [30]. Золоті електроди спочатку модифікують тіолом із наступним нанесенням фероценового полімеру та ферменту, що дозволяє сформувати багатопшарову структуру.

Ідею керованого просторового розташування моношарів ферменту взято з технології імобілізації «антиген–антитіло», коли каталітична реакція оцінювалася з використанням розчинного окиснювально-відновлювального медіатора. Техніка «антиген–антитіло» показала чудові результати стосовно відгуку каталітичної реакції та стабільності системи. Цю процедуру було розширено до 10 ферментних моношарів [31].

Розробляючи амперометричні біосенсори, можна застосовувати послідовні ферментні реакції. Для створення цих мультиферментних сенсорів імобілізують кілька ферментів

у плівках окисно-відновного полімеру, приєднаного до твердого електрода. У більшості таких біосенсорів використовують зв'язану пероксидазу та декілька оксидаз, наприклад β -галактозооксидазу, етанолоксидазу або ГОД. З'являються також нові чотиришарові структури датчиків глюкози та лактози з використанням зв'язаної термостійкої пероксидази сої та окисно-відновного полімеру з осмієм як медіатором. За таких умов можна одержати стійкий вихідний сигнал при 37 °C упродовж декількох днів [32, 33].

Джерела похибок амперометричного перетворення

Як правило, вимірюють наднизький струм, який виникає внаслідок окиснювання-відновлювання електрохімічно активних речовин на поверхні робочого електрода під час подання напруги між робочим електродом та електродом порівняння. Це дозволяє вимірювати концентрацію не лише іонів, але й розчинених газів, оскільки для амперометрії достатньо, щоб на електроді відновлювався або окиснювався хоча б один із реагентів чи продукт реакції.

Вважають, що концентрація реагенту лінійно зменшується в приелектродному шарі від значення концентрації (C) на відстані (L) від електрода до нуля на самому електроді, де він відновлюється або окиснюється. Іони рухаються внаслідок дифузії, яка характеризується коефіцієнтом D , і кожен іон переносить z електронів до електрода.

Товщина шару (L) вважається постійною. Для виділення одного виду іона застосовують іонселективні мембрани.

Граничний струм дифузії визначають за формулою Коттрела [16]:

$$I_d = z F A_e DC / L,$$

де A_e — площа електрода, F — константа Фарадея.

Таким чином, дифузійний струм є пропорційним концентрації речовини.

Під час процесу дифузії струм наростає вкрай повільно. Аби збільшити швидкість електрохімічної реакції, перемішують аналіт або обертають електроди, унаслідок чого зменшується товщина дифузійного шару (L). Це вкрай важливо в разі використання речовин із малими швидкостями дифузії. Силу дифузійного струму (I_d) для в'язких органічних сполук визначають за формулою:

$$I_d = k v^{-5/6},$$

де k — коефіцієнт вимірювального приладу, який залежить від площини робочої поверхні вимірювального електрода, показника дифузії іонів, рН та температури, v — коефіцієнт в'язкості речовини.

Перенесення електронів можна прискорити, збільшивши різницю потенціалів між електродами, однак істотно підвищувати його небезпечно через можливий електролітичний розпад самого аналіту. Ефективнішим є використання медіаторів (посередників у перенесенні електронів). Для збільшення швидкості дифузії також застосовують мікроелектроди, у яких дифузія відбувається не через плоский шар, а радіально через сферу, центр якої міститься на електроді. Через це швидкість реакції збільшується і вона стабілізується. Зазначені модифікації електродів відкривають нові можливості в галузі створення біосенсорних систем. У біологічних препаратах присутні речовини, які впливають на вихід продукту реакції H_2O_2 (аскорбінова кислота, сечова кислота тощо). Для зведення до мінімуму цього ефекту іноді мембранам електродів надають заряд, який відштовхує побічні речовини. Слід враховувати, що концентрація глюкози у пробі крові за 2 год знижується на 20%. З метою стабілізації вмісту глюкози пробу крові піддають гемолізу (руйнуванню еритроцитів сольовим розчином унаслідок осмотичного тиску).

Мікроелектронний біосенсор для визначення вмісту глюкози, сахарози та лактози

До сьогодні залишаються практично не дослідженими процеси взаємодії продуктів біохімічної реакції з біологічною матрицею, не встановлено причини зниження активності ферментів у датчиках у процесі роботи та зберігання, а також не розроблено технологічні методи їх точного дозування. У зв'язку зі складністю вирішення цього завдання слід створювати мікроелектронні мультипараметричні сенсори для вимірювання різноманітних сигналів, що виникають під час перетворення продуктів біохімічної реакції, а саме: провідності (кондуктометричним методом), струму (амперометричним способом), величини заряду — за допомогою іонселективних польових транзисторів, кількості тепла — тонкоплівковими терморезисторами та визначення маси в разі застосування генераторів на поверхневих акустичних хвилях. Усі перелічені сенсори виготовляють на одній підкладці за мікро-

електронною технологією і розташовують під єдиною біохімічною матрицею. Для оброблення вихідних сигналів використовують мікропроцесор, який за технологією виготовлення повністю збігається з вищезазначеними сенсорами. Такий підхід до проектування біосенсорів дасть змогу з великою достовірністю визначати концентрацію речовини з урахуванням впливу багатьох побічних факторів, а інтегральні лінійки таких сенсорних комплексів з використанням відповідних біохімічних матриць забезпечать реєстрацію концентрації різноманітних речовин.

Основні характеристики промислових амперометричних аналізаторів наведено в табл. 3 [34], з них випливає необхідність подальших розробок біосенсорів з метою підвищення стабільності та точності виміру. Запропонований нами біосенсор складається з двох секцій. Амперометрична секція містить ланцюжок планарних мікроелектродів, за допомогою яких здійснюють вимірювання сили струму і визначають його середнє значення за результатами показників із трьох електродів. А вимірювання кількості тепла, яке виділяється під час біохімічної реакції, виконується тонкоплівковими датчиками температури диференційного типу. Вихідні сигнали інтегрального біосенсора обробляються мікропроцесором за допомогою електронного блока.

У роботі реалізовано два варіанти мультипараметричного біосенсора, виготовленого за мікроелектронною технологією. В одному варіанті плівкові датчики температури сформовано на основі платини, а в другому — на базі тонких плівок напівпровідникового матеріалу — оксиду церію, які були розташовані на одній підкладці з платиновими електродами амперометричної секції.

На рис. 4 подано варіант реалізації мікроелектронного біосенсора для визначення вмісту лактози, сахарози та глюкози. Амперометрична секція створена на основі одного срібного та трьох платинових електродів. Порівняльним є срібний електрод, покритий $AgCl$. Три платинових електроди виконують функцію вимірювальних.

Принцип роботи такої системи описано вище. Відмінність полягає в тому, що тут для підвищення точності виміру використовують не один, а три електроди.

Термометричну секцію було створено на основі двох терморезисторів (термоопорів) із платини у вигляді змійки, де один є вимірювальним, а другий — порівняльним.

Вимірювальний термістор та вимірювальні електроди покриті чутливим біохімічним

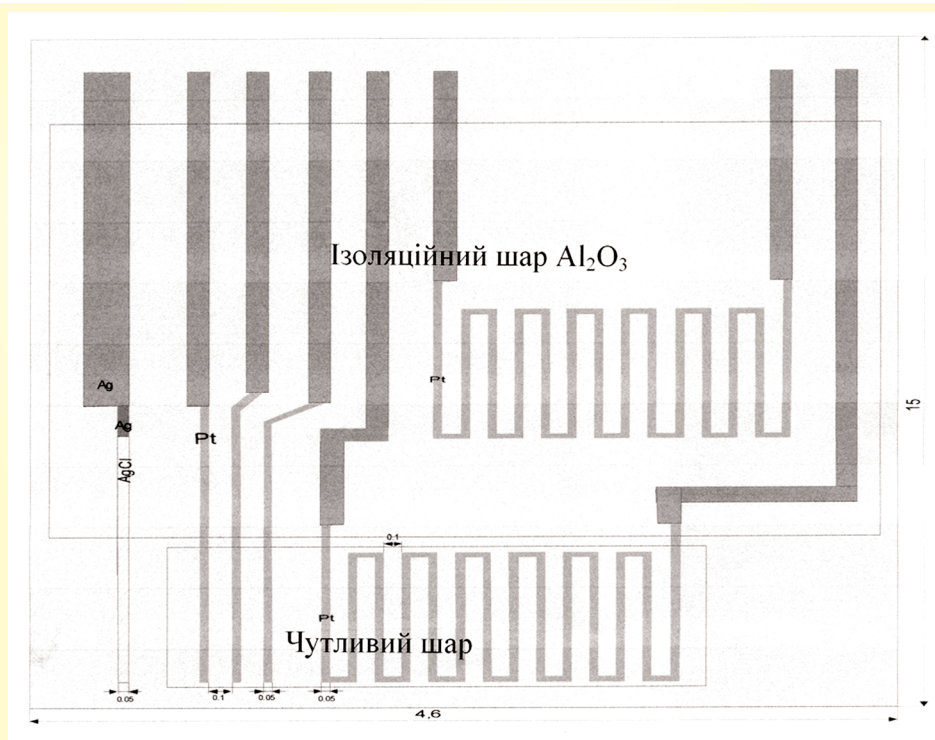


Рис. 4. Топологія елемента тонкошарового інтегрального біосенсора для визначення вмісту глюкози, сахарози та лактози

Таблиця 3. Амперометричні аналізатори різних виробників для визначення вмісту глюкози [34]

Фірма, прилад	Діапазон концентрацій, мМ	Об'єм проби, мкл	Частота вимірювання, проб/год	Похибка, %	Стабільність
Неавтоматизовані аналізатори					
«Ексан-Г» (Росія, Литва)	0,5–30	50	60	5	–
Yellow Springs Instruments (США), модель 23А	0,5–50	25	40	2	300 вимірювань
Seres (Франція), Enzymat	1–22	200	60	–	500 вимірювань
Solea-Tacussel (Франція), глюкозний електрод	0,0001–1,0	–	–	2	1000 вимірювань
Hoffman la Roshe (Швейцарія), глюкозоаналізатор 5410*	2,5–27,5	100	60	1,5	8 тижнів
Fuji Electric (Японія), Gluco 20А	0-27	20	20	3	500 вимірювань
Analytical Instruments (Японія), Glucorder-E	0–55,5	20-40	120–150	2,0	–
Автоматичні проточні аналізатори					
Daiichi (Японія), Auto&Stat GA1110	1–40	100–250	–	1,0	–
Карлов університет (Чехія)	0,006–5,0	–	60	3,5	30 днів
Прилади безперервної дії					
Life Science Instr., Div. Miles (США), біостатор GCIS	до 27,5	–	2 хв	5	50 год
Університет м. Осака (Японія)	2,85–22,0	–	–	–	3 дні

* Додатково застосовується медіатор для перенесення електронів. У всіх аналізаторах глюкози використовували фермент глюкозооксидазу (ГОД).

шаром, що його підбирають для кожної вимірюваної речовини.

Опір платинової змійки розраховують за формулою:

$$R = \rho_s \frac{l}{W},$$

де R — опір термістора, Ом;

ρ_s — питомий поверхневий опір, Ом/□;
для платини $\rho_s = 0,29$ Ом/□;

l — довжина термоопору, мм;

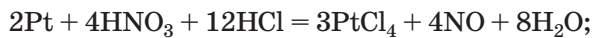
W — ширина термоопору, мкм.

У нашому випадку $l = 87,3$ мм, $W = 50$ мкм, отже

$$R = 0,29 \frac{87,3 \cdot 10^{-3}}{50 \cdot 10^{-6}}.$$

Технологія виготовлення такого датчика передбачає:

- хімічне очищення підкладки;
- резистивне напилювання плівки платини, що виконувалось методом термічного випарювання при тиску в камері $5 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст., нагрітій до 200 °С підкладці та температурі випарника $1\ 800$ °С за 4 хв;
- фотолітографію резисторів та електродів з використанням для протравлення платини «царської» суміші:



- резистивне напилювання плівки срібла (при температурі 900 °С), аналогічно до напилювання шару платини;
- фотолітографію для формування порівняльного електрода та контактів; для травлення срібла використовували розчин: 10% -й тринатрійфосфат та 10% -й калій заліzosиньородистий (в об'ємному співвідношенні 1:1);
- виготовлення шару AgCl методом електродічного травлення;
- електронно-променевого випарювання захисного шару Al_2O_3 виконували при тиску в камері $5 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст., нагрітій до 200 °С підкладці за такого режиму напилювання оксиду алюмінію:

$$I_e = 120 \text{ мА}, T_{II} = 170 \text{ °С}, U = 12 \text{ кВ},$$

час напилювання ($3 \pm 0,2$) хв;

- нанесення чутливого біохімічного шару.

Шар біологічного матеріалу формували у три етапи: наносили полівінілхлорид, потім суміш ферменту з глутаровим альдегідом та нітроцелюлозу. На ділянку детекції біодатчика наносили 2% -й розчин формвару в двохлористовому етилені. Потім упродовж 20 хв давали можливість стекти надлишку розчину

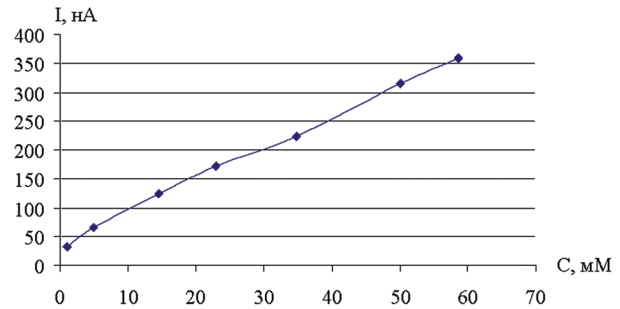


Рис. 5. Залежність вихідного сигналу амперометричної секції від концентрації лактози

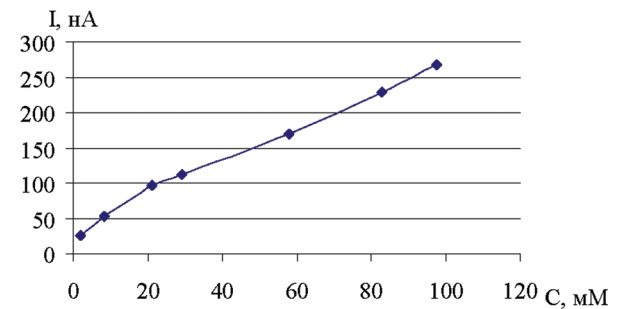


Рис. 6. Залежність вихідного сигналу амперометричної секції від концентрації глюкози

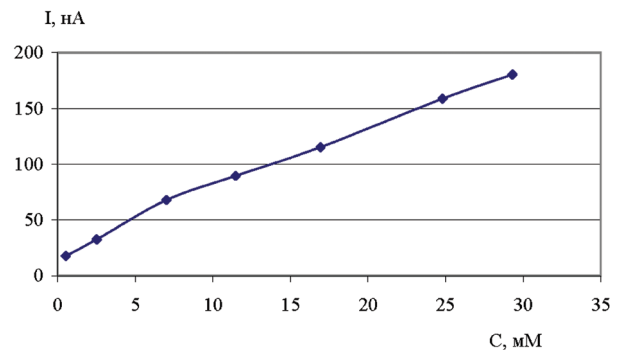
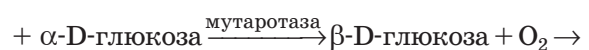
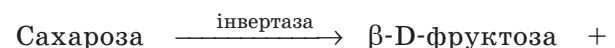
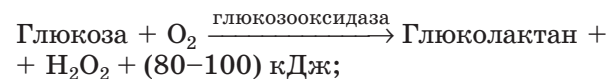
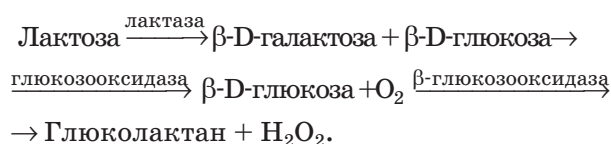


Рис. 7. Залежність вихідного сигналу амперометричної секції від концентрації сахарози

в атмосфері пари цього розчинника. Після цього конструкцію тримали в пересиченій парі для створення пористості протягом 2–3 хв.

Практичну перевірку термобіосенсорної та амперометричної систем проводили з використанням таких реакцій:





У наведених реакціях для визначення концентрації глюкози, сахарози та лактози використовували відповідні ферменти: глюकोзооксидазу, інвертазу та лактазу. Вимірювання проводили в реакторній кюветі, в яку постійно надходив розчин речовини, концентрацію якої потрібно визначити. У кюветі розміщено інтегральний біосенсор.

Термодинамічна рівновага у вимірювальній комірці встановлювалась за 2–3 хвилини. Інформація з вимірювального блока надходила до комп'ютера, де оброблення даних здійснювали за спеціальною програмою. Потім результати вимірювання змін теплового потоку на диференційному термосенсорі та сили струму на амперометричному сенсорі виводились у графічному зображенні на екран дисплея. На рис. 5–7 наведено результати експериментів із зазначеними вище біохімічними реакціями для амперометричного аналізу. Характер залежностей вихідного сигналу для амперометричної та термометричної сенсорних систем збігається з точністю $\pm 0,1\%$.

На цих графіках показано характер зміни сили струму (I) від концентрації (C) аналізованої речовини. Чутливість розроблених біосенсорів визначали за формулою:

$$\gamma = \frac{\Delta I}{\Delta C},$$

де: γ — чутливість біосенсора; ΔI — зміна сили струму, нА; ΔC — зміна концентрації вимірюваної речовини, мМ.

Проведені дослідження та одержані результати дають можливість зробити такі висновки.

Аналіз наявних підходів до вимірювання концентрації глюкози, сахарози та лактози показав, що вони базуються на застосуванні амперометричних, потенціометричних, кондуктометричних, оптичних, хемілюмінесцентних методів та тих, що використовують іонселективні польові транзистори. Зазначені методи забезпечують визначення концентрації вищенаведених речовин з точністю 2–5%, однак вони не можуть враховувати вплив побічних факторів, що знижують достовірність та стабільність аналізу.

Вимірювання одного параметра з урахуванням складності й багатofакторності біохімічних процесів принципово не може забезпечити створення біосенсора, який має відповідати повному комплексу таких необхідних характеристик, як: стабільність, відтворюваність результатів, стійкість до забруднення, тривалий час життя біологічного елемента, селективність, чутливість, температурна стійкість та ін.

Одним із напрямів вирішення цієї складної проблеми є створення інтегральних мультипараметричних сенсорів, які перетворюють на електричні сигнали різні продукти біохімічних реакцій в єдиній біохімічній матриці.

У ході виконаних експериментальних досліджень одержано характеристики мікроелектронних мультипараметричних біосенсорів під час визначення вмісту глюкози, лактози та сахарози з використанням термометричного та амперометричного методів, які переконливо показали перспективність розроблених датчиків для визначення концентрації глюкози, сахарози та лактози з підвищеною чутливістю й вірогідністю, що якнайповніше відповідає вимогам практики.

ЛІТЕРАТУРА

1. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Васелов М. Р. Основы современного электрохимического анализа. — М.: Мир — Бином ЛЗ, 2003. — 592 с.
2. *Електроаналитические* методы в контроле окружающей среды: Пер. с англ. / Под ред. Е. Я. Неймана — М.: Химия, 1990. — 238 с.
3. Xueji Zhang, Joseph Wang, Bozidar Ogorevc *et al.* Glucose Nanosensor Based on Prussian-Blue Modified Carbon-Fiber Cone Nanoelectrode and Integrated Reference Electrode // *Electroanalysis*. — 1999. — V.11, N13. P. 945–949.
4. Ho N. J., Kratochvil J., Blackburn G. F., Janata J. Encapsulation of polymeric membrane-based ion-selective field effect transistors // *Sens. and Actuators*. — 1983. — N4. — P.13–21.
5. Ogrodzki J., Opalski L. Modeling of semiconductor pH sensors for CAD // *Proc. of the 7 th International Conf. Mixed Design of Integrated Circuits and Systems*. — 2000. — P. 259–264.
6. Grattarola M., Massobrio G., Mattinoia S. Modelling HC sensitive FET's with SPICE // *IEEE Trans. Electron Devices*. — 1992. — V.39, N4. — P. 813–819.
7. Towe B. C., Guilbeau E. J. A vibrating probe thermal biochemical sensor // *Biosens. Bioelectronics*. — 2001. — V. 11, N3. — P. 247–252.

8. Xie B., Ramanathan K., Danielsson B. Mini/micro thermal biosensors and other related devices for biochemical/clinical analysis and monitoring // *Anal. Chem.* — 2000. — V.19, N5. — P.339–349.
9. Ramanathan, K., Rank, M., Svitel et al. The Development and Applications of Thermal Biosensors for Bioprocess Monitoring // *TIBTECH.* — 1999. — N17. — P. 499–505.
10. Xie B., Ramanathan K., Danielsson B. Principles of Enzyme Thermistor Systems: Applications to Biomedical and Other Measurements // *Adv. in Biochem. Engin.* — 1999. — V. 64. — P. 1–33.
11. Pirvutoiu S., Surugiu I., Dey E. S. et al. Flow injection analysis of mercury based on enzyme inhibition and thermometric detection // *Analyst (Cambridge, U. K.)*. — 2001. — V. 126, N9. — P. 1612–1616.
12. Окоси Т. Волоконно-оптические датчики. — Л.: Энергоатомиздат, 1991. — 256 с.
13. Фрайден Дж. Современные датчики: Справочник. — М.: Техносфера, 2005. — 588 с.
14. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. — М.: Техносфера, 2005. — 336 с.
15. Ермаков О. Прикладная оптоэлектроника. — М.: Техносфера, 2004. — 414 с.
16. Биосенсоры: Основы и приложения / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. — 614 с.
17. Blum L. J., Gautier S. M., Coulet P. R. Fiber-optic biosensors based on luminometric detection // *Food Sci. Technol.* — 1994. — N60. — P. 612–621.
18. Laurinavicius V., Kurtinaitiene B., Razumienie J. et al. Biosensors and Analyzers for the Determination of Metabolites in Biological Samples // *Biomedicine.* — 2001. — V. 1, N1. — P. 27–32.
19. Ward W. K., Lawrence B., Lansen et al. A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo-evaluation // *Biosens. Bioelectronics.* — 2002. — V. 17. — P. 181–189.
20. Geoff Mc Garraugh and Jennifer Putz. Freestyle™ Accuracy at Low Glucose Concentration // TheraSense, Inc. — 2002. — P. 1–2.
21. Sang Hak Lee, Sang Seob Choi. Determination of Glucose in Whole Blood by Chemiluminescence's Method // *J. Korean Chem. Soc.* — 2001. — V. 45, N3. — P. 223–229.
22. Navratil M., Tkac J., Svitel J. et al. Danielsson B. and Sturdik E. Monitoring of the bio-conversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized Gluconobacter oxydans using thermometric flow injection analysis // *Proc. Biochem.* — 2001. — V. 36. — P. 1045–1052.
23. Calvo E. J., Danilowicz C. Amperometric Enzyme Electrodes // *J. Braz. Chem. Soc.* — 1997. — V. 8, N 6. — P. 563–574.
24. Hale P. D., Boguslavsky L. I., Inagaki T. et al. Amperometric glucose biosensors based on redox polymer-mediated electron transfer // *Anal. Chem.* — 1991. — V. 63. — P. 677–682.
25. T. J. Ohara, Rajagopalan R., Heller A. Glucose electrodes based on cross-linked bis(2,2'-bipyridine)chloroosmium(+2) complexed poly(1-vinylimidazole) films // *Ibid.* — 1993. — V 65. — P. 3512–3517.
26. Ohara T. J., Rajagopalan R., Heller A. «Wired» Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose or Lactate in the Presence of Interfering Substances // *Ibid.* — 1994. — V. 66. — P. 2451–2457.
27. Gregg B. A., Heller A. Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications // *Ibid.* — 1990. — V. 62. — P. 258–263.
28. Gregg B. A., Heller A. Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone // *J. Physic. Chem.* — 1991. — V. 95. — P. 5970–5975.
29. Gregg B. A. Heller A. Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes // *Ibid.* — 1991. — V. 95. — P. 5976 — 5980.
30. Lumley-Woodyear T., Rocca P., Lindsay J. et al. Polyacrylamide-Based Redox Polymer for Connecting Redox Centers of Enzymes to Electrodes // *Anal. Chem.* — 1995. — V. 67. — P. 1332 — 1338.
31. Абелев Г. И. Основы иммунитета // Соросовский образовательный журнал. — 1996. — № 5. — С.4–10.
32. Kenausis G., Chen Q., Heller A. Electrochemical Glucose and Lactate Sensors Based on «Wired» Thermostable Soybean Peroxidase Operating Continuously and Stably at 37 C // *Anal. Chem.* — 1997. — V. 69. — P. 1054–1060.
33. Garguilo M. G., Huynh N., Proctor A. et al. Amperometric sensors for peroxide, choline, and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer // *Ibid.* — 1993. — V. 65. — P. 523–528.
34. Surugiu I., Svitel J., Ye Lei et al. Development of a flow injection capillary chemiluminescent ELISA using an imprinted polymer instead of the antibody // *Ibid.* — 2001. — V. 73, N17. — P. 4388–4392.

**МИКРОЭЛЕКТРОННЫЕ
МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ
БИОСЕНСОРЫ**

*Н. Ф. Стародуб¹, М. И. Канюк¹,
А. Н. Шмырева²*

¹*Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев*

²*Национальный технический университет
Украины «КПИ», Киев*

E-mail: starodub@biochem.kiev.ua

Проанализированы известные биосенсорные методы определения концентрации глюкозы, сахарозы и лактозы, рассмотрены основы и принципы разработки амперометрических биосенсоров с использованием новых типов полимеров и нанoeлектродов для создания биохимических элементов. Приведены экспериментальные результаты собственных разработок микроэлектронных мультипараметрических интегральных биосенсоров.

Ключевые слова: микроэлектронные биосенсоры, амперометрия, термометрия, мультипараметрическое определение содержания глюкозы, сахарозы и лактозы.

**MICROELECTRONIC
MULTI-PARAMETRICAL
BIOSENSORS**

*M. F. Starodub¹, M. I. Kanyuk¹,
O. M. Shmyryeva²*

¹*A. V. Palladin Institute of Biochemistry of
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

²*National Technical University of Ukraine
«KPI», Kyiv*

E-mail: starodub@biochem.kiev.ua

The known biosensors methods for the determination of concentration of glucose, sucrose and lactose are analyzed. Moreover, the bases and principles of amperometric biosensors construction are considered with the use of new types of polymers and nanoelectrodes. The experimental data of own developments of microelectronic multi-parametrical integral biosensors are described.

Key words: microelectronic biosensors, amperometry, thermometry, multi-parametrical determination of glucose, sucrose and lactose.