

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 577. 15; 573. 6

ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ НА ОСНОВІ ПЛАНАРНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

*В. М. Архипова¹, А. Л. Бережецький¹, О. А. Шульга²,
Ж.-М. Шовелон³, О. П. Солдаткін¹, С. В. Дзядевич¹*

¹ Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, вул. Заболотного, 150, Київ 03143, Україна, тел.: 044 526 07 49, факс: 044 526 07 59, E-mail: dzyad@yahoo.com

² Інститут хемо- та біосенсорики, Мюнстер, Німеччина

³ Університет Клода Бернара 1, Ліон, Франція

Анотація

ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ НА ОСНОВІ ПЛАНАРНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

*В. М. Архипова, А. Л. Бережецький, О. А. Шульга,
Ж.-М. Шовелон, О. П. Солдаткін, С. В. Дзядевич*

В роботі за допомогою імпедансної спектроскопії було досліджено характеристики тонкоплівчастих гребінчастих електродів як перетворювачів для кондуктометричних біосенсорів. Для подальшого створення ферментних біосенсорів запропоновано оптимальні матеріали для електродів і підкладинки, а також їх характеристичні розміри.

Ключові слова: кондуктометричні перетворювачі, імпедансна спектроскопія, біосенсори, тонкоплівчасті гребінчасті електроди

Abstract

INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF CONDUCTOMETRIC TRANSDUCERS BASED ON PLANAR TECHNOLOGY

*V. M. Arkhipova, A. L. Berezhetsky, O. A. Shul'ga,
J.-M. Chovelon, O. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych*

The characteristics of thin-films conductometric interdigitated electrodes as transducers were studied using impedance spectroscopy. The optimal materials for electrodes and support, the characteristic dimensions of electrodes were chosen for enzyme biosensors designing.

Keywords: conductometric transducers, impedance spectroscopy, biosensors, thin-films interdigitated electrodes

Анотация

ИССЛЕДОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПЛАНАРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

*В. Н. Архипова, А. Л. Бережецкий, А. А. Шульга,
Ж.-М. Шовелон, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич*

В работе с помощью импедансной спектроскопии были исследованы характеристики тонкопленочных гребенчатых электродов как преобразователей для кондуктометрических биосенсоров. Для дальнейшего создания ферментных биосенсоров предложены оптимальные материалы для электродов и подложек, а также их характеристические размеры.

Ключевые слова: кондуктометрические преобразователи, импедансная спектроскопия, биосенсоры, тонкопленочные гребенчатые электроды

Вступ

Постійно зростаюча необхідність охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, перевірки якості харчових продуктів і питної води, збільшення кількості клінічних тестів у медичній та ветеринарній діагностиці потребує все більш широкого використання в практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Серед них велику увагу приділяють приладам нового покоління — біосенсорам [1-3].

На сьогоднішній день опубліковано ряд оглядів [4-6], монографій [7-9], велику кількість експериментальних робіт, в яких описано різні типи біосенсорів. Але створенню кондуктометричних біосенсорів присвячено незначну частину названих праць, у деяких з них, до того ж, описано застосування даного типу перетворювачів для хроматографії та створення хімічних сенсорів по визначенню вологості повітря та концентрацій певних газів [10-12].

Незначну увагу до кондуктометричних біосенсорів у порівнянні з іншими типами датчиків можна пояснити недостатнім вивченням покладених в основу їх роботи принципів, хоча кондуктометричні датчики мають ряд значних переваг, а саме: відсутність технологічно складного електроду порівняння, використання при роботі змінної напруги малої амплітуди, що дозволяє уникнути фарадеївських процесів на електродах, відсутність світлочутливості, здатність до мініатюризації та до великого ступеню інтеграції при використанні недорогої тонкоплівчастої стандартної технології.

Загальновідомо, що класичні кондуктометричні методи мають ряд обмежень для використання. Велику роль при використанні методу

відіграє концентрація буферу та інших інгредієнтів, які можна додати до реакційної суміші. Присутність нереагуючих іонів в розчині зменшує чутливість методу. Одним з недоліків класичної кондуктометрії є також малоспецифічність, його застосування не дає змоги відрізнити одну реакцію від іншої, що може призвести до артефакту. Але у випадку кондуктометричних ферментних біосенсорів частиною цих недоліків можна знехтувати. Селективність у випадку біосенсорів досягається завдяки саме ферментам, які каталізують тільки певні реакції. Під час ферментативної реакції проходить зміна провідності розчину в приелектродній області, яка може бути поміряною за допомогою кондуктометричного перетворювача. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, зв'язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними наводками, подавляються завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань. В цьому випадку сигнал від пари електродів з неактивною мембраною, розташованої на тому ж перетворювачі, віднімається від сигналу з електродів з активною біологічною мембраною [13].

Найбільш ефективним перетворювачем для створення кондуктометричних біосенсорів є гребінчастий тонкоплівчастий електрод. Тонкоплівчастий кондуктометричний перетворювач — це мініатюрний датчик на основі двох гребінчастих металевих електродів для вимірювань провідності шару розчину, який знаходиться безпосередньо біля поверхні електродів та визначається їх характеристичними розмірами. В даній роботі було досліджено характеристики таких перетворювачів з метою створення на їх основі ферментних біосенсорів.

Матеріали і методи

В роботі використовувались реактиви вітчизняного виробництва та кваліфікації “х. ч.” та “ос. ч.”.

Були досліджені та використані такі перетворювачі:

1. Кондуктометричні перетворювачі, виготовлені в Науково-дослідному Інституті “Мікроприлад” (Київ, Україна) з використанням інтегральної планарної технології. Сенсор представляв собою підкладинку із ситалу (сплавлений Al_2O_3) чи кремнію з ізолюючим шаром нітриду кремнію розміром 30 мм х 5 мм, на якій були розташовані дві однакові пари гребінчастих золотих електродів, отриманих за допомогою вакуумного напилення. Для кращої адгезії металів до підкладинки використовувався підшар титану товщиною 0,1 мкм. Ширина пальців гребінок та відстань між ними були 10 мкм, 20 мкм та 40 мкм.

2. Перетворювачі, виготовлені на Київському радіозаводі (Україна). Сенсор представляв собою ситалову підкладинку розміром 40 мм х 5 мм, на яку фотолітографією та вакуумним напиленням були нанесені електроди із золота, нікелю, міді та хрому. Як підшар для покращення адгезії використовувався хром товщиною 0,1 мкм. Ширина пальців гребінок та відстань між ними була 70 мкм.

3. Перетворювачі, виготовлені в Інституті мікроелектроніки м. Ньюшател (Швейцарія). Як підкладинка використовувався оксид кремнію, на який методом фотолітографії та вакуумного напилення було нанесено електроди із золота. Ширина пальців гребінок та відстань між ними була 0,5; 2; 5 та 10 мкм.

4. Датчики, виготовлені в Інституті хемата біосенсоріки м. Мюнстер (Німеччина). Як підкладинка використовувалося скло, на яке було нанесено електроди із платини. Ширина пальців гребінок та відстань між ними була 10 мкм.

Середня частина всіх електродів була захищена ізолюючим шаром (поліамід, фоторезист, оксид кремнія чи епоксидна смола). Кожна пара електродів представляла собою кондуктометричний перетворювач.

З метою найбільш ефективного використання кондуктометричних перетворювачів як складової частини біосенсорів за допомогою методу імпедансної (адмітансної) спектро-

скопії були вивчені характеристики тонкоплівчастих кондуктометричних перетворювачів. При цьому будувались залежності реактивної та активної компонент імпедансу (адмітансу) від частоти.

Для імпедансних вимірів використовувалась установка, основою якої був імпеданс-спектрометр фірми Schumberger (Німеччина). На електроди поступав сигнал із імпеданс-спектрометра з частотою, яка змінювалась за логарифмічним законом від 0,01 Гц до 1 МГц і вибиралася виходячі із поставленої задачі. Значення імпедансу поступали на персональний комп'ютер, де за допомогою спеціальної програми оброблювались та виводились на екран монітору у вигляді імпедансних чи адмітансних кривих, а також записувались у вигляді масиву даних.

Всі вимірювання проводились при кімнатній температурі в різних розчинах, а саме бідистильована вода та калій-фосфатний буферний розчин (KH_2PO_4 -NaOH, pH 7,4). При необхідності провідність електроліту змінювали шляхом добавлення різних аліквот 4 М розчину KCl.

Результати та їх обговорення

Дуже важливим моментом при виробництві перетворювачів є підбір оптимального матеріалу самих гребінок. З одного боку, він повинен бути дешевим, а з другого — мати необхідну чутливість до зміни провідності аналізованого розчину. Виходячі з цього, використовуючи метод імпедансної спектроскопії, було проведено серію експериментів, в яких порівнювались датчики, гребінки яких були виготовлені з різних металів. Досліджувався ряд структур із золота, нікелю, хрому, міді, платини, титану та алюмінію. На Рис. 1. представлено залежності реальної частини адмітансу електрохімічної комірки від частоти струму у бідистильованій воді та 1 мМ розчині солі KCl для електродів із золота, нікелю, хрому та міді з однаковими характеристичними розмірами структур.

Із рисунка добре видно, що адмітансні криві всіх структур мають подібну форму. При збільшенні провідності середовища відбувається збільшення загального адмітансу системи та, відповідно, збільшується його реальна частина — провідність. При цьому для всіх електродів

форма кривих та взаємне розташування зберігаються. Із цього ряду випадають тільки мідні електроди, тому що на їх поверхні дуже швидко утворюється шар окислу, який призводить до появи високої ємності окислу та зміни форми адмітансної кривої. Це також веде до зменшення чутливості датчика. Однак, на високих частотах (від 20 кГц), коли електродними процесами можна знехтувати, реальні частини адмітансу всіх зразків практично однакові.

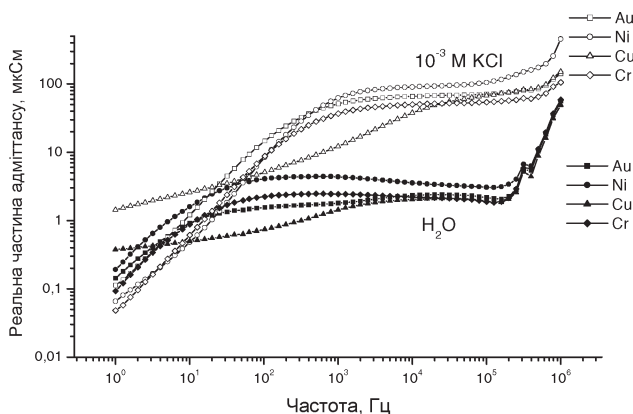


Рис. 1. Залежність реальної частини адмітансу від частоти струму для електродів із різних матеріалів.

Далі було проведено експерименти, в яких досліджувалась чутливість електродів, виготовлених з різних матеріалів, до зміни провідності розчину (концентрації КСІ), при цьому моделювалась зміна провідності під час ферментативної реакції [14]. На Рис. 2 представлено залежності активної складової адмітансу перетворювача на основі платинових електродів від частоти для різних концентрацій КСІ у розчину. З рисунку добре видно, як на великих частотах змінюється величина реальної частини адмітансу, тобто провідність. Подібні експерименти було проведено для всіх перетворювачів, що досліджувались. Форма кривих для всіх випадків була подібна. Дані, отримані для частоти змінного струму 100 кГц було перебудовано в залежність відгуку кондуктометричного перетворювача від концентрації КСІ в бідистильованій воді для електродів, виготовлених з різних металів (Рис. 3).

З Рис. 3 видно, що найбільшу чутливість до зміни концентрації КСІ мають електроди, виготовлені із платини. Чутливість золотих, мідних та нікелевих електродів трохи менша та подібна для всієї групи, тоді як хромові та титанові, а особливо алюмінієві електроди показують значно меншу (на порядок) чутливість.

Вони досягають повного насичення по провідності вже при концентрації 5-10 мМ КСІ. Це робить неможливим їх використання в ролі кондуктометричних перетворювачів при розробці ферментних біосенсорів, тому що з останніми планується працювати в біологічних рідинах, які, як правило, мають велику фонову провідність.

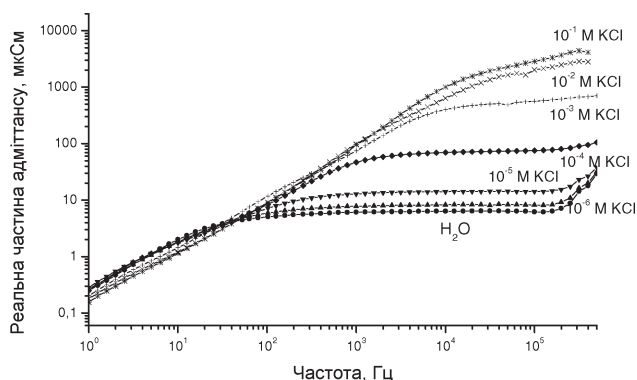


Рис. 2. Залежності реальної частини адмітансу від частоти струму для різних концентрацій КСІ.

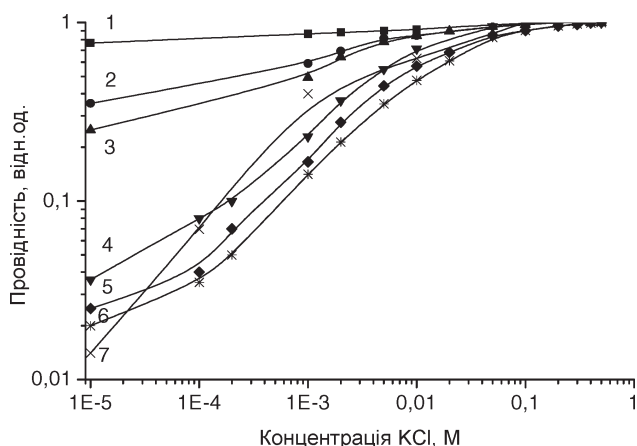


Рис. 3. Залежність відгуку сенсору від концентрації КСІ в бідистильованій воді для електродів, виготовлених з різних металів: 1 — алюміній, 2 — титан, 3 — хром, 4 — нікель, 5 — золото, 6 — мідь, 7 — платина.

Однак для виготовлення кондуктометричних ферментних біосенсорів також цілком придатні неблагородні дешеві матеріали (нікель, мідь), тому що перетворювачі на їх основі в цілому мають аналітичні характеристики, аналогічні таким на основі благородних металів. Але у випадку використання мідних електродів необхідно враховувати фактор часу роботи датчиків, тому що відбувається дуже швидке окислення поверхні електроду, і відповідно, зниження їх чутливості.

Таким чином, можна скласти ряд пріоритетності використання різних матеріалів, що досліджувались для створення кондуктометричних біосенсорів, який має такий вигляд: платина > золото > нікель > мідь > хром > титан > алюміній.

Наступним важливим моментом при розробці перетворювача є вибір матеріалу підкладки. Було проведено експерименти для дослідження структур, виготовлених на різних підкладках. Досліджувались датчики із золотими електродами, нанесеними на скло, ситал та оксид кремнію. На Рис. 4. представлено результати дослідження провідності розчинів різної іонної сили за допомогою перетворювачів, виготовлених на різних підкладках.

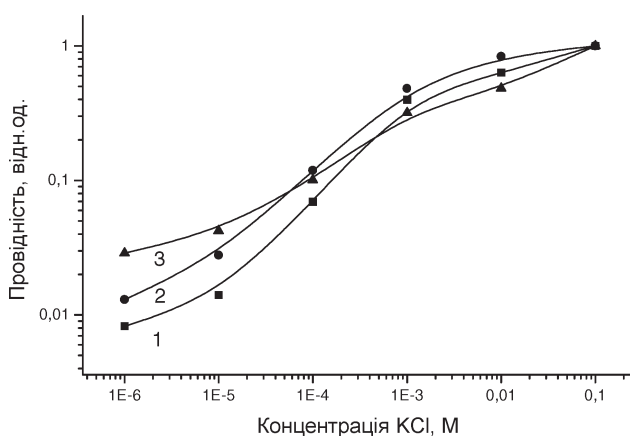


Рис. 4. Залежність відгуку сенсору від концентрації KCl для електродів, виготовлених на різних підкладках (1 — скло, 2 — оксид кремнію, 3 — ситал).

Із рисунка видно, що матеріал підкладки не впливає на чутливість датчика до зміни провідності середовища (датчики мають подібну чутливість до зміни провідності). Основна вимога, що повинна пред'являтися до матеріалу підкладки при виготовленні кондуктометричного перетворювача — це його електропровідність. З технологічної точки зору найбільш зручно використовувати скло, тому що це, з одного боку, найбільш дешевий матеріал, а з другого, — найменш крихкий.

Після вибору матеріалу гребінок та підкладки перетворювачів важливою задачею було визначитись з характеристичними розмірами електродів, тому було проведено експерименти по дослідженню впливу розмірів пальців гребінок та відстані між ними на чутливість датчиків. Вивчались дві групи датчиків: перша включала в себе електроди з характер-

стичними розмірами 70, 40 та 20 мкм і активною площею 2,25 мм², друга — електроди з характеристичними розмірами 10, 5, 2 та 0,5 мкм і активною площею 1,5 мм². На Рис. 5 представлено адмітансні криві цих датчиків.

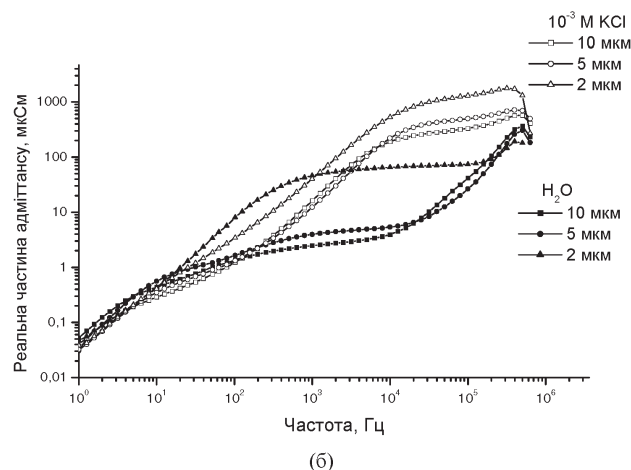
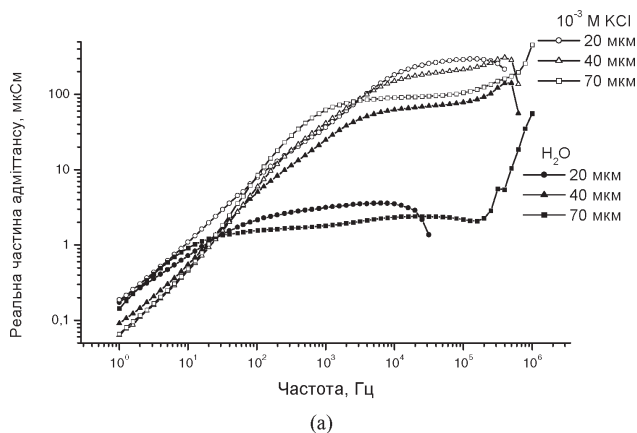
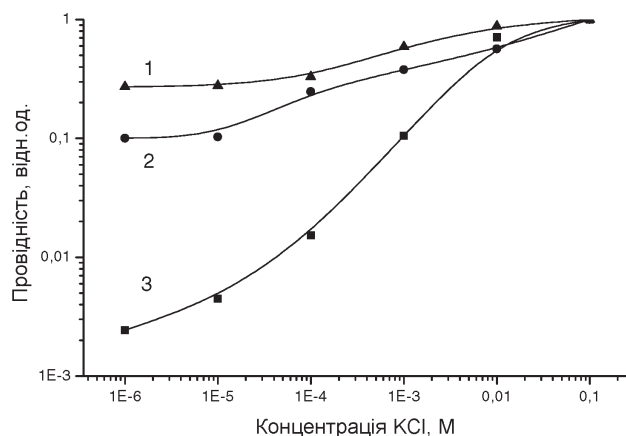


Рис. 5. Залежності реальної частини адмітансів від частоти струму для електродів з різними характеристичними розмірами (а — перша група, б — друга група).

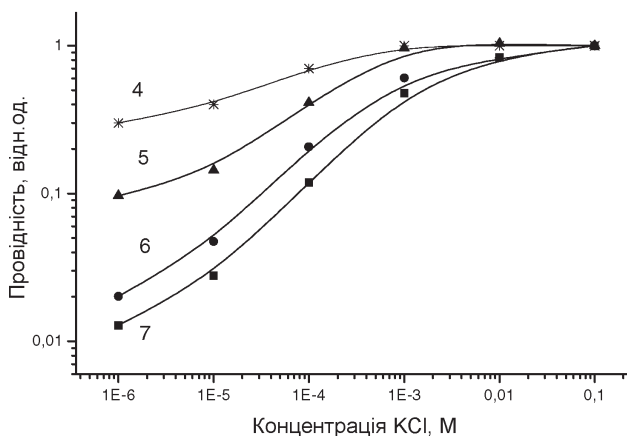
Із рисунка видно, що для всіх зразків зберігається подібна форма адмітансних кривих, що свідчить про те, що процеси, які проходять в комірниці не залежать від характеристичних розмірів гребінок.

На Рис. 6 представлено чутливості датчиків в відносних одиницях для електродів з різними характеристичними розмірами. Для обох груп електродів видно тенденцію зменшення чутливості датчиків зі зменшенням розмірів пальців гребінок. Це співпадає з даними, отриманими іншими дослідниками [15, 16]. Таким чином можна зробити висновок, що при мініатюризації не треба технологічно складного збільшення кількості пальців на електроді за рахунок зменшення їх розмірів, як це вважалося

раніше. Мініатюризацію треба проводити шляхом рівномірного зменшення як робочої поверхні електроду, так і характеристичних розмірів електродів. З іншого боку, не рекомендується виготовляти електроди з великими пальцями (хоча чутливість такого датчика може бути більшою), тому що тут починає відігравати важливу роль товщина мембрани. Основну роль при виборі розмірів сенсора грає співвідношення між товщиною мембрани, характеристичними розмірами електродів та їх активною площиною.



(а)



(б)

Рис. 6. Залежність відгуку сенсору від концентрації солі KCl для електродів з різними характеристичними розмірами (а — перша група, електроди з розмірами 20 мкм (1), 40 мкм (2), 70 мкм (3); б — друга група, електроди з розмірами 0,5 мкм (4), 2 мкм (5), 5 мкм (6) і 10 мкм (7).

Висновки

Таким чином, запропоновано ряд пріоритетності використання різних матеріалів гребінок для кондуктометричних перетворювачів,

який має вигляд: платина > золото > нікель > мідь > хром > титан > алюміній. Матеріал непровідної підкладки не впливає на чутливість датчика, тому основним показником при його виборі є технологічність та вартість. Характеристичні розміри гребінок не є вирішальним параметром перетворювача, тому для виробництва кондуктометричних біосенсорів можна використовувати звичайну технологію фотолітографічного нанесення. Результати досліджень можуть бути використані при виробництві кондуктометричних біосенсорів.

Частина цієї роботи була виконана завдяки фінансовій підтримки фонду НАТО (Collaborative Linkage Grant No 979775) та комплексної програми Національної Академії Наук України “Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій”.

Список літератури

1. Coulet P. R. What is a biosensor. / In: Blum L. J., Coulet P. R. Biosensor principles and application. New York: Marcel Dekker Inc. — 1991. — P. 1-6.
2. Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report). // Pure Appl. Chem. — 1999. — 71. — P. 2333-2348.
3. Hall E. A. H. Recent progress in biosensor development. // Int. J. Biochem. — 1988. — 20, N 4. — P. 357-362.
4. Дзядевич С. В. Биосенсоры на основе ион-селективных полевых транзисторов: теория, технология, практика. // Биополимеры и клетка. — 2004. — Т. 20, № 1-2. — С. 7-16.
5. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов. // Биополимеры и клетка. — 2002. — Т. 18, № 5. — С. 363-376.
6. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Кондуктометричний метод у ферментативному аналізі. // Укр. біохім. журн. — 1994. — Т. 66, № 4. — С. 30-42.
7. Hall E. Biosensors. / Cambridge: Open University Press, 1991.
8. Tran Minh C. Biosensors. / London: Chapman & Hall, 1993.
9. Kress-Rogers E. Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment. / New York: CRC Press, 1997.
10. Glass R. S., Perone S. P., Ciarlo D. R. Application of information theory to electroanalytical measurements using a multielement,

- microelectrode array. // *Anal. Chem.* — 1990. — 62. — P. 1914 — 1918.
11. Hoffheins B. S., Lauf R. J., Siegel M. W. Intelligent thick-film gas sensor. // *Hybrid Circuits.* — 1987. — 14. — P. 8 — 12.
12. Alder J. F., Fielden P. R., Clark A. J. Simultaneous conductivity and permittivity detector with a single cell for liquid chromatography. // *Anal. Chem.* — 1984. — 56. — P. 985-988.
13. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. // *Біополімери і клітина.* — 2005. — Т. 21. — № 2. — С. 91 — 106.
14. Dzyadevych S. V., Arkhypova V. N., El'skaya A. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin A. P. Conductometric enzyme biosensors for substrates and inhibitors analysis. // *Current Topics in Analytical Chemistry.* — 2001. — 2. — P. 179-186.
15. Jacobs P., Suls J. and Sansen W. Performance of a planar differential-conductivity sensor for urea // *Sensors and Actuators B.* — 1994. — V. 20. — P. 193 — 198.
16. Sheppard N. F., Tucker R. C. and Wu C. Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes // *Anal. Chem.* — 1993. — V. 65. — P. 1199 — 1202.