

УДК 577. 15; 573. 6

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ РІЗНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

*А. Л. Бережецький<sup>1</sup>, О. М. Щувайло<sup>1</sup>, В. М. Архипова<sup>1</sup>, Л. В. Шкотова<sup>1</sup>,  
Ж.-М. Шовелон<sup>2</sup>, О. П. Солдаткін<sup>1</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Університет Клода Бернара 1, Ліон, Франція

### Анотація

#### ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ РІЗНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

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

В роботі досліджено характеристики різних перетворювачів, що пропонується використовувати для створення амперометричних біосенсорів, а саме різноманітних вуглецевих та металевих електродів, виготовлених за сучасними технологіями. Показано, що платина є найбільш придатним електродним матеріалом для використання в якості амперометричних перетворювачів. Можливе також застосування гребінчастих планарних електродів як амперометричних перетворювачів. Визначено, що оптимальним матеріалом для виробництва таких електродів є платина, а їх підкладки — кремній, ширина пальців електродів та відстань між пальцями гребінок — 10 мкм.

**Ключові слова:** амперометричні перетворювачі, вуглецеві та металеві електроди, біосенсори, тонкоплівчасті гребінчасті електроди

### Abstract

#### INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF DIFFERENT TRANSDUCERS FOR CREATION OF AMPEROMETRIC BIOSENSORS

*A. L. Bereghetskyy, O. M. Schuvaylo, V. M. Arkhypova, L. V. Shkotova, J.-M. Chovelon,  
O. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych*

The characteristics of different transducers for creation of amperometric biosensors such as various carbon and metallic electrodes were investigated. It was shown that the platinum is best electrode material for using as amperometric transducers. It is also possible to use interdigitated planar electrodes. It was shown that optimal material for such electrodes creation is platinum, the best substrate is silicon, and the width of digits and their separation are 10 μm.

**Keywords:** amperometric transducers, carbon and metallic electrodes, biosensors, thin-films interdigitated electrodes

**Аннотация****ИССЛЕДОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ**

*А. Л. Березецкий, О. Н. Шувайло, В. Н. Архипова, Л. В. Шкотова, Ж.-М. Шовелон,  
А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич*

В работе исследованы характеристики различных преобразователей, которые предлагается использовать для создания амперометрических биосенсоров, а именно разнообразных углеродных и металлических электродов, изготовленных с помощью современных технологий. Показано, что платина есть наиболее приемлемый материал для использования в качестве амперометрических преобразователей. Возможно также применение гребенчатых планарных электродов в качестве амперометрических преобразователей. Определено, что оптимальным материалом при производстве таких электродов является платина, а их подложки — кремний, ширина пальцев электродов и расстояние между пальцами гребенок — 10 мкм.

**Ключевые слова:** амперометрические преобразователи, углеродные и металлические электроды, биосенсоры, тонкопленочные гребенчатые электроды

**1. Вступ**

Амперометричні біосенсори — одна з самих найширших та найбільш розвинених груп біосенсорів. З моменту появи першого амперометричного біосенсора пройшло вже більш ніж 40 років [1]. Весь цей час постійно проводяться пошуки оптимальних матеріалів та дизайну для їх створення.

В загальному випадку в основі роботи амперометричного біосенсора лежить вимірювання щільності струму, що протікає в електрохімічній комірці при постійному потенціалі, за наявності в зразку електрохімічно активних речовин [2]. Ефективність розвитку амперометричних біосенсорів тісно пов'язана з розвитком мікросистемних технологій [3]. Постійна мініатюризація таких систем призвела до зменшення розмірів біосенсора, витрат на реагенти, що використовуються як при його створенні, так і аналізі, зробила прилади більш компактними та простими у використанні. Створення конкурентноздатного біосенсора можливе лише за умови оптимального поєднання біологічного матеріалу, перетворювача, методу іммобілізації та апаратурної частини. Постійний пошук нових підходів та матеріалів, що спростять процедуру аналізу та зроблять її дешевшою є єдино виправданою стратегією розробників.

Дана робота присвячена дослідженню різних перетворювачів для створення амперометричних біосенсорів, а саме різноманітних вуг-

лецевих та металевих електродів, виготовлених за сучасними технологіями, а також їх порівняльному аналізу.

**2. Дослідження стабільності і чутливості різних типів амперометричних перетворювачів**

Першим кроком при здійсненні пошуку оптимальних матеріалів і оцінки технології виготовлення електродів було вивчення серійної стабільності різних типів амперометричних перетворювачів, що традиційно використовуються при створенні біосенсорів. Погана відтворюваність електрохімічних властивостей від електроду до електроду може зробити малоперспективною подальшу розробку біосенсора на його основі, навіть при дуже добрих характеристиках окремих представників серії.

Були досліджені та використані такі перетворювачі (Рис. 1).

1. Електроди на основі графітових стрижнів (зовн. діаметр 3,05 мм, тип RW-001, Ringsdorffwerke GmbH., Bonn, Німеччина,) виготовлялись наступним чином. Стрижні нарізались до необхідної довжини та полірувались на зволоженому тонкому наждачному папері з наступним відмиванням дистильованою водою та сушкою при кімнатній температурі. Кінцеве полірування робочої частини графітового електроду виконувалось за допомогою фільтрувального паперу. Бокова поверхня

стрижнів була електрично ізолювана термоусадочною трубкою з зовнішнім діаметром 4,5 мм. Для створення герметичного з'єднання, яке б повністю ізолювало аналізоване середовище від неробочої частини перетворювача, трубка після "одягнення" розігрівалась до 100°C. Також досліджувались графітові стрижні без захищеної бокової поверхні.

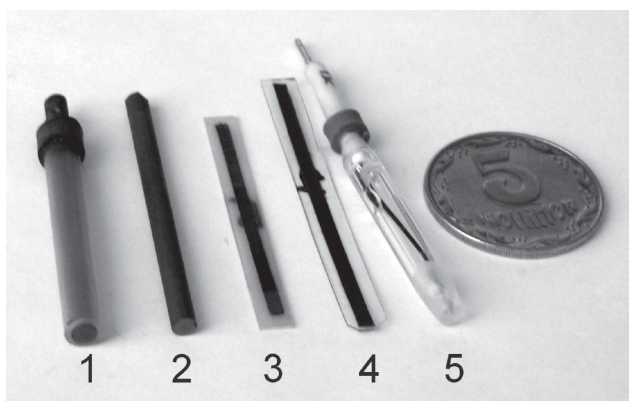


Рис. 1. Зовнішній вигляд електродів, що використовувались як амперометричні перетворювачі: 1 — графітовий стрижень в оболонці, 2 — графітовий стрижень без оболонки, 3 — амперометричний електрод "Іва" на твердій основі, 4 — амперометричний електрод "Іва" на гнучкій основі, 5 — платиновий дисковий електрод.

2. Платинові дискові електроди виготовлялись в нашій лабораторії за наступною технологією: шматочок платинового дроту діаметром 0,4 мм і довжиною 3 мм поміщався в скляний капіляр з зовнішнім діаметром 3,5 мм, звужений з одного боку, після чого звужений кінець капіляру із платиною у середині герметизувався запаюванням у полум'ї пальника. Електричне з'єднання платини з електропровідним дротом забезпечувалось низькотемпературним спаюванням за допомогою сплаву Вуда (температура плавлення 80 °С). Відкритий кінець капіляру заповнювався епоксидною смолою, частина дроту знаходилась в середині капіляру, а частина залишалась зовні. Перед першим використанням робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку на наждачному папері та за допомогою алюмінієвої пасти. При необхідності, робоча поверхня платинового електроду поновлювалася за допомогою полірування.

3. Комерційні вуглецеві пастові електроди були виготовлені за технологією трафаретного друку на підприємстві "Іва" (Єкатеринбург, Росія) [4]. Вони склались з підкладки у ви-

гляді гнучкої та щільної пластикової плівки розміром 50x5 мм, на яку було нанесено смужку вуглецевої пасти. Середня частина електроду була ізолювана від середовища, робоча зона електроду була у вигляді прямокутника розміром 2x4 мм, підключення до вимірювальної системи відбувалось за допомогою контактних площадок на протилежному кінці електроду.

Всі дослідження проводили в проточно-інжекційній системі власного виробництва (Рис. 2). Вона складається з традиційної трьох електродної системи, тобто робочого електроду (різних типів), Ag/AgCl електроду порівняння, допоміжного Pt електроду і потенціостату [5].

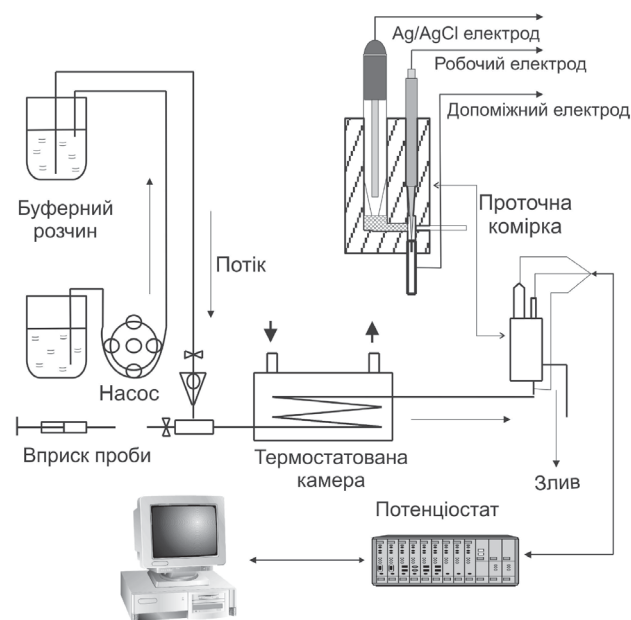


Рис. 2. Лабораторна проточно-інжекційна система для проведення амперометричних досліджень.

Всі вимірювання проводились при робочому потенціалі +650 мВ, що відповідає анодному окисленню перекису водню.

Абсолютні величини струмів в біоаналітичній техніці не мають принципового значення, тому що, по перше, завжди можна використати підсилювач, а по друге, виміри в основному проводять, використовуючи калібрувальні криві по необхідному субстрату, тобто в деякій мірі це відносні вимірювання. Для порівняння характеристик різних перетворювачів використовувалось співвідношення "відгук/фон".

На Рис. 3 у вигляді діаграми представлено середні та граничні експериментальні співвід-

ношення “відгук/фон” для різних типів електродів при додаванні у комірку 100 мкМ перекису водню.

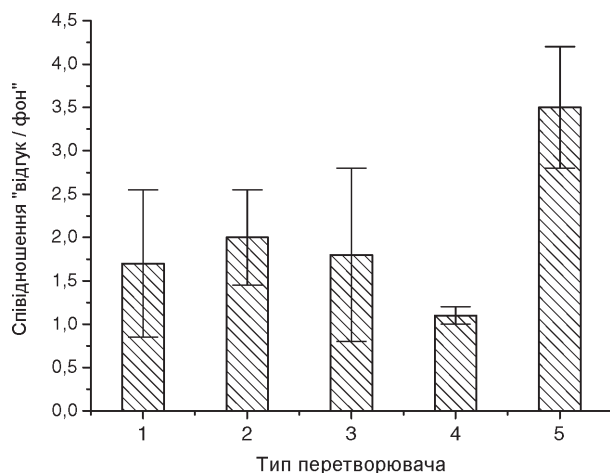


Рис 3. Чутливість до перекису водню для різних серій амперометричних перетворювачів різних типів (1 — вуглецевопастовий на підкладці, 2 — вуглецевопастовий на плівці, 3 — графітовий стрижень в оболонці, 4 — графітовий стрижень без оболонки і 5 — платиновий диск).

Використання для визначення серійної стабільності концентрації перекису водню 100 мкМ зумовлено необхідністю достовірно отримати високий відгук сенсора. З іншого боку, необхідно зазначити, що така концентрація електрохімічного субстрату є досить великою, і на практиці отримати такі концентрації перекису водню як продукту ферментативної реакції вдається не завжди, тобто концентрація аналіту  $10^{-4}$  М скоріш верхня межа лінійного діапазону більшості речовин, які визначає біоаналітична амперометрія [2].

З рисунку можна зробити висновок, що майже всі розглянуті графітові перетворювачі (в тому числі комерційні амперометричні електроди виробництва “Іва”) мають досить великий розкид значень та невелике співвідношення “відгук/фон”. Найкращі співвідношення “відгук/фон” отримано для досліджених платинових дискових електродів. З цього можна зробити висновок про небажаність використання більшості розглянутих перетворювачів для створення ферментних біосенсорів через низькі співвідношення “відгук/фон”. Особливо це стосується графітових електродів, які, до того ж, ще мають погану серійну стабільність. В той же час наведені результати ніяким чином не нівелюють переваг графіту як електродного матеріалу, адже справа в тому,

що графітові перетворювачі досить часто потребують певної хімічної та/або електрохімічної попередньої обробки. Така процедура покращує їх електрохімічні характеристики, але деяким чином ускладнює роботу з ними. Також можливим рішенням є використання диференційного режиму вимірювань, коли використовується різниця фонових сигналів, тим самим значно збільшуючи відношення “відгук/фон”.

Виходячи з результатів вимірювань платина є більш придатним електродним матеріалом ніж графіт. Але при розробці новітніх дешевих приладів необхідно було знайти на її основі більш ефективніший перетворювач сигналу, бажано виготовлений за допомогою високотехнологічного промислового виробництва, оскільки в більшості випадків саме лабораторне ручне виготовлення електродів є причиною низьких електрохімічних якостей розглянутих перетворювачів.

Таким чином після дослідження серійної стабільності наявних амперометричних перетворювачів треба було знайти новий тип амперометричного перетворювача, який би характеризувався на порядок кращими електрохімічними показниками. Увага була зосереджена на металевих гребінчастих планарних електродах, виготовлених методом вакуумного напилення, що традиційно використовуються при розробці кондуктометричних біосенсорів.

### 3. Дослідження характеристик перетворювачів в залежності від типу матеріалу, розмірів та геометрії електродів

В роботі досліджувались такі перетворювачі (Рис. 4).

1. Перетворювачі, виготовлені в науково-дослідницькому підприємстві “Київський радіозавод” (Київ, Україна), склалися з двох пар металевих (золото, мідь, хром та нікель) гребінчастих електродів, виготовлених методом вакуумного напилення металу на підкладку з сіталу розміром 5x40 мм. Ширина пальців гребінок та відстань між ними становила 70 мкм, а їх довжина 1 мм.

2. Перетворювачі, створені в науково-дослідницькому інституті “Мікроприлад” (Київ, Україна), склалися з двох пар Au гребінчастих електродів, виготовлених методом вакуу-



много нанесення на 5x30 мм підкладку з оксиду кремнію. Ширина пальців гребінок та відстань між ними становила 40 мкм, 20 мкм, 10 мкм, а довжина приблизно 1 мм.

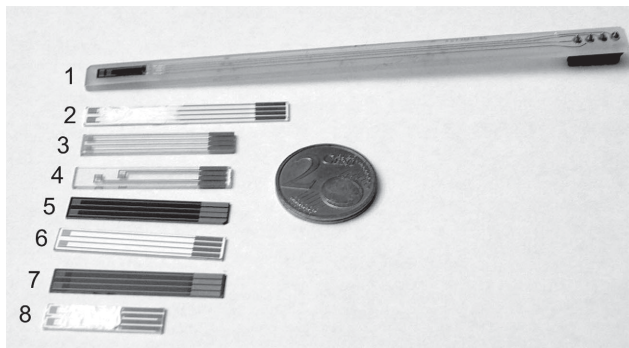


Рис. 4. Зовнішній вигляд перетворювачів, виготовлених в Науково-дослідному Інституті “Мікроприлад”, Київ, Україна (5, 6, 7) Київському радіозаводі, Україна (2, 8), Інституті мікроелектроніки м. Ньюшател, Швейцарія (1), Інституті хемо- та біосенсоріки м. Мюнстер, Німеччина (3, 4).

3. Перетворювачі, виготовлені в Інституті мікроелектроніки м. Ньюшател (Швейцарія). Як підкладка 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 і 10 мкм.

4. Перетворювачі, створені в Інституті хемо- та біосенсоріки (м. Мюнстер, Німеччина), складались з двох пар Pt планарних гребінчастих електродів (товщиною 150 нм), виготовлених методом літографії на підкладку зі скла чи оксиду кремнію розміром 5x30 мм. Ширина пальців та міжпальцевого простору були 10 мкм, а їх довжина була приблизно 1 мм.

Перші дослідження по амперометричному застосуванню такого типу електродів були направлені на визначення залежності їх чутливості до перекису водню від матеріалу гребінок електродів. На Рис. 5 зображені калібрувальні криві залежностей сили струму від концентрації перекису водню для гребінчастих планарних електродів, виготовлених з платини, золота, міді, нікелю та хрому.

З рисунку видно, що електроди, виготовлені з золота, міді, нікелю та хрому не дуже сильно різняться за чутливістю до перекису водню, але сильно програють платиновим електродам. Тобто гребінчасті планарні електроди з платини показали високу чутливість до суб-

страту, яка робить цей матеріал перспективним для подальших розробок амперометричних біосенсорів. Це також співпадає з результатами, описаними в попередньому пункті нашого дослідження по серійній стабільності та відношенню сигнал/фон, з яких також слідує, що платина є кращим матеріалом для амперометричних перетворювачів.

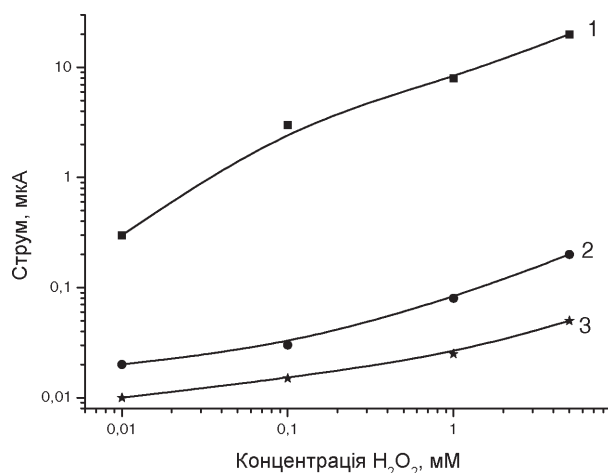


Рис. 5. Залежність відгуку сенсору від концентрації перекису водню для електродів, виготовлених з різних металів (1 — платина, 2 — золото, 3 — мідь, нікель, хром).

Подальші дослідження було сфокусовано на пошуку оптимального матеріалу підкладки для платинового електроду. На Рис. 6 зображені калібрувальні криві залежностей струму від концентрації перекису водню для гребінчастих планарних електродів, виготовлених з використанням підкладок з оксиду кремнію або скла.

З форми кривих на рисунку видно, що матеріал підкладки не має значного впливу на чутливість гребінчастих планарних електродів до перекису водню, хоча електроди на кремнії мають більш лінійну залежність струму від концентрації перекису водню. Безумовно, головною вимогою до підкладки є перш за все її діелектричні властивості, які досить схожі в обох випадках. В той же час з технологічної точки зору скло більш привабливий матеріал через низьку вартість та малу крихкість.

Досить часто важливою характеристикою перетворювачів є характеристичні розміри електродів. Саме для цього вивчався вплив ширини пальців та відстані між ними на чутливість перетворювача. На Рис. 7 приведено

калібрувальні криві залежностей струму від концентрації перекису водню для гребінчастих планарних електродів з різними характеристичними розмірами (10, 20, 40 мкм).

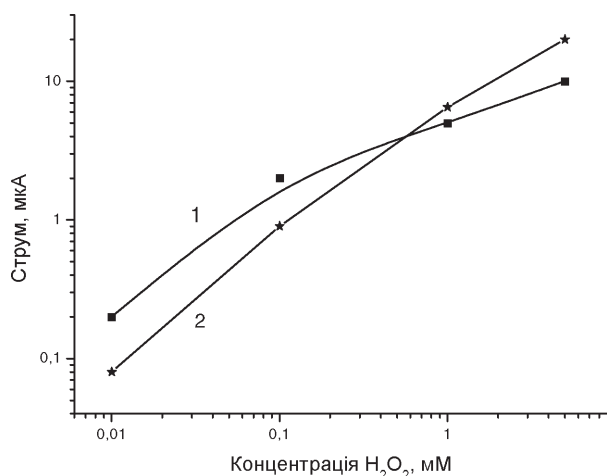


Рис 6. Залежність відгуку сенсору від концентрації перекису водню для електродів, виготовлених на різних підкладках (1 — скло, 2 — оксид кремнію).

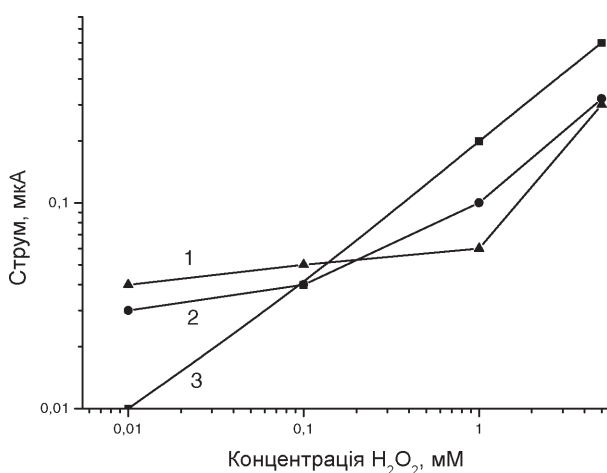


Рис 7. Залежність відгуку сенсору від концентрації перекису водню для електродів з різними характеристичними розмірами (1 — 40 мкм, 2 — 20 мкм, 3 — 10 мкм).

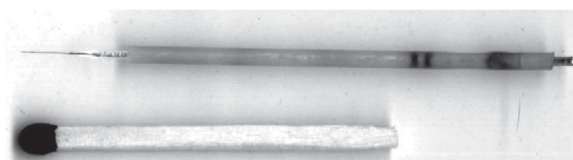
З рисунку випливає що електроди з шириною пальців та відстані між ними 10 мкм мають значно кращі електрохімічні характеристики, ніж інші розглянуті. Таким чином можна зробити висновок, що у випадку створення амперометричних біосенсорів мініатюризація є необхідною для підвищення чутливості електродів. В будь якому випадку, перетворювачі треба мініатюризувати шляхом зменшення обох електродних робочих поверхонь та їх характеристичних розмірів. Співвідношення між товщиною мембрани, характеристичними

розмірами електроду та їх активною поверхнею розглядається як основний фактор оптимізації розмірів біосенсора.

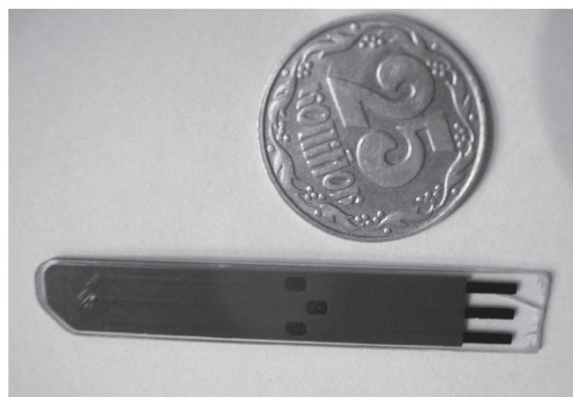
Для кращого дизайну гребінчастих планарних електродів була отримана висока чутливість до субстрату (менше 10 мкМ), низький рівень шуму (співвідношення “сигнал/фон” на 100 мкМ перекису водню близько 60), широкий лінійний динамічний діапазон роботи.

#### 4. Порівняльні характеристики роботи різних амперометричних перетворювачів

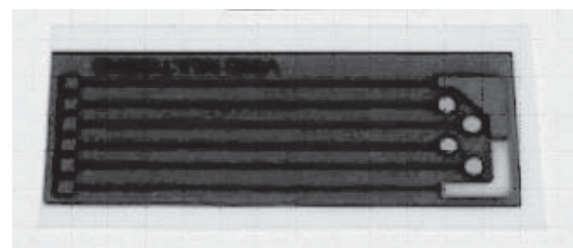
В роботі, крім вже перерахованих перетворювачів, були також досліджені та використані ще такі перетворювачі (Рис. 8).



(a)



(б)



(c)

Рис. 8. Зовнішній вигляд електродів, що використовувались в якості амперометричних перетворювачів (друга серія): мікроелектрод на основі вуглецевого волокна (а), електроди “SensLab” (б), електроди “Vino Multisens” (с).

1. Мікроелектроди на основі вуглецевого волокна, виготовлені в нашій лабораторії. Брався скляний капіляр з відтягнутим кінцем, який об-

різали таким чином, щоб отримати тупий зріз з внутрішнім діаметром 30-35 мкм, в який вставляли вуглецеве моноволокно діаметром 30 мкм та довжиною 8-10 мм. З'єднання капіляра з вуглецевим волокном запаювали. Якісний електричний контакт між вуглецевим волокном та мідним провідником забезпечувався через прижимний контакт. Після з'єднання кінець вуглецевого волокна обрізався до необхідної довжини за допомогою скальпеля під мікроскопом. Склояне тіло електроду армувалось за допомогою полімерного матеріалу [6].

2. Комерційні амперометричні електроди, виготовлені за технологією трафаретного друку фірмою "SensLab" (Лейпціг, Німеччина) [7].

3. Комерційні амперометричні мультиперетворювачі "Vino Multisens" з чотирма Pt робочими електродами, одним графіто-пастовим допоміжним електродом та одним Ag/AgCl електродом порівняння, виготовлені в Інституті хемо- і біосенсорики (м. Мюнстер, Німеччина) [8].

Була досліджена чутливість різних перетворювачів до перекису водню. На Рис. 9 зображені залежності струму від концентрації перекису водню для різних типів амперометричних перетворювачів.

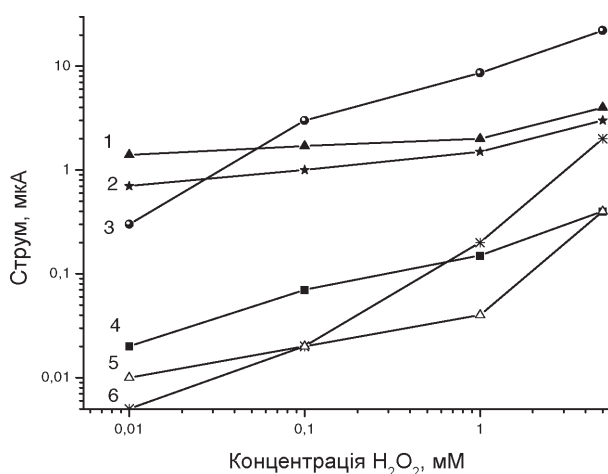


Рис 9. Залежність чутливості різних перетворювачів до перекису водню (1 — платиновий диск, 2 — графітовий стрижень, 3 — платиновий планарний гребінчастий електрод, 4 — електрод "Vino Multisens", 5 — електрод "SensLab", 6 — електрод на основі вуглецевого волокна).

З рисунку видно, що найкращу чутливість до перекису водню мають платинові планарні гребінчасті електроди та мікроелектроди на основі вуглецевого волокна. Але треба зазначити, що перетворювачі на базі гребінок да-

ють відгук майже на два порядки більший, ніж перетворювачі на основі волокна, тому при створенні біосенсора на основі планарної структури можна спростити апаратну частину. Виготовлення гребінчастих планарних електродів, завдяки прогресивній технології мікроелектроніки, легко переноситься до масового виробництва на відміну від технології перетворювачів на основі вуглецевого волокна. Останні є мікроелектродами, виготовлення яких поки що потребує досить великої кількості ручної праці кваліфікованого персоналу, та поки що не є масовим. Але необхідно відмітити, що саме такі перетворювачі є дуже перспективними для створення ультрамікробіосенсорів для визначення *in vivo*.

## 5. Висновки

Таким чином, в результаті дослідження характеристик різних електродів, які пропонується використовувати для створення ферментних амперометричних біосенсорів показано, що платина є найбільш придатним електродним матеріалом для використання в якості амперометричних перетворювачів.

Можливо також застосовувати гребінчасті планарні електроди як амперометричні перетворювачі. Визначено, що оптимальним матеріалом для виробництва таких електродів є платина, а їх підкладки — кремній, ширина пальців та відстань між пальцями гребінок — 10 мкм.

Частина цієї роботи була виконана завдяки фінансової підтримки комплексної програми Національної Академії Наук України "Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій".

## Література

1. Clark L. C. Jnr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. // *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* — 1956. — 2. — Р. 41-48.
2. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. 1. Основные принципы работы и особенности датчиков различных генераций. / *Биополімери і клітина.* 2001, Т. 17, №6. — С. 5
3. Fluitman J. Microsystems technology: objectives. // *Sensors and Actuators A.* — 1996. — 56-Р. 151-166.
4. ООО НПВП "ИВА", Екатеринбург, Россия (<http://www.iva.usue.ru>).

5. Шувайло О. Н., Данилейко Л. В., Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Ельская А. В., Сеспуглио Р., Солдаткин А. П. Разработка микробиосенсоров на основе углеродных волокон для определения глюкозы, ацетилхолина и холина in-vivo // Биополимеры и клетка. — 2002. — 18. — № 6. — С. 489-495.
6. Dzyadevych S. V., Schuvailo O. M., Danileiko L. V., El'skaya A. V., Arkhypova V. N., Cespuglio R., Soldatkin A. P. Development of amperometric enzyme biosensors based on carbon fibre microelectrode for in-vivo determination of glucose, choline and acetylcholine // Book of the 16th European Conference on Solid-State Transducers. — Prague (Czech Republics), 2002. — P. 1159-1162.
7. SensLab GmbH, Leipzig, Germany (<http://www.senslab.de>).
8. Institut für Chemo- und Biosensorik GmbH, Munster, Germany (<http://www.icb-online.de>).