

УДК 621.315.592, 577.15, 543.6

СЕНСОРНІ МАСИВИ НА ОСНОВІ ДИФЕРЕНЦІЙНИХ ІСПТ-ЕЛЕМЕНТІВ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН ПРИРОДНОГО ТА ШТУЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

*О. Л. Кукла, О. С. Павлюченко, Ю. В. Голтвянський, О. О. Солдаткін¹,
В. М. Архипова¹, С. В. Дзядевич¹, О. П. Солдаткін¹*

Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України,
03028, Київ-28, просп. Науки, 41, тел./факс 380 (044) 265-18-27, kukla@isp.kiev.ua

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Заболотного, 150, тел. 380 (044) 2000-328, alexsold@yahoo.com

Анотація

СЕНСОРНІ МАСИВИ НА ОСНОВІ ДИФЕРЕНЦІЙНИХ ІСПТ-ЕЛЕМЕНТІВ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН ПРИРОДНОГО ТА ШТУЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

*О. Л. Кукла, О. С. Павлюченко, Ю. В. Голтвянський, О. О. Солдаткін,
В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін*

Розроблено топологію транзисторних чипів на основі диференційних іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) та виготовлено серію рН-чутливих сенсорних елементів за кремнієвою інтегральною *p*-канальною МОН-технологією. Розроблено уніфіковану вимірювальну кювету для диференційної пари ІСПТ, яка є базовим модулем для побудови багатоканального сенсорного масиву. Розглянуто основні типи електронних ІСПТ-перетворювачів та проаналізовано їх характеристики щодо біосенсорних застосувань. На основі рН-ІСПТ-елементів та низки іммобілізованих біоселективних ферментних шарів розроблено експериментальні зразки біосенсорів для вимірювання токсичних речовин у розчинах. Отримано калібрувальні криві для визначення концентрацій органофосфорних і карбаматних пестицидів та глікоалкалоїдів.

Ключові слова: іон-селективний польовий транзистор, диференційна пара ІСПТ, іммобілізовані ферменти, органофосфорні та карбаматні пестициди, глікоалкалоїди

Abstract

SENSOR ARRAYS BASED ON THE DIFFERENTIAL ISFET ELEMENTS FOR MONITORING OF TOXIC SUBSTANCES OF NATURAL AND ARTIFICIAL ORIGIN

*A. L. Kukla, A. S. Pavluchenko, Yu. V. Goltvjanskiy, A. A. Soldatkin, V. M. Arkhypova,
S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin.*

Transistor chip topology based on the differential ion-sensitive field effect transistors (ISFET) has been developed and a series of pH-sensitive sensor elements by silicon integral *p*-channel MOS-technology have been manufactured. Universal measuring cell for differential ISFET pair have been developed, the last can serve as the base module for multichannel sensor array creation. The basic types of electronic ISFET-transducers were considered and their characteristics with respect to biosensor application were analyzed. Experimental samples of biosensors based on the pH-ISFET elements and number of immobilized bioselective enzyme membranes for determination of toxic

substances in solutions have been created. Calibration curves for determination of organophosphorus and carbamate pesticides as well as glycoalkaloids concentration have been obtained.

Keywords: ion-sensitive field effect transistor, differential ISFET pair, immobilized ferments, organophosphorus and carbamate pesticides, glycoalkaloids

Аннотация

СЕНСОРНЫЕ МАССИВЫ НА ОСНОВЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ИСПТ-ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ЕСТЕСТВЕННОГО И ИСКУССТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*А. Л. Кукла, А. С. Павлюченко, Ю. В. Голтвянский, А. А. Солдаткин,
В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин*

Разработана топология транзисторных чипов на основе дифференциальных ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ) и изготовлено серию рН-чувствительных сенсорных элементов с помощью кремниевой интегральной *p*-канальной МОП-технологии. Разработана унифицированная измерительная кювета для дифференциальной пары ИСПТ, являющаяся базовым модулем для построения многоканального сенсорного массива. Рассмотрены основные типы электронных ИСПТ-преобразователей и проанализированы их характеристики для биосенсорных применений. На основе рН-ИСПТ-элементов и ряда иммобилизованных биоселективных ферментных слоев разработаны экспериментальные образцы биосенсоров для измерения токсических веществ в растворах. Получены калибровочные кривые для определения концентрации органофосфорных и карбаматных пестицидов и гликоалкалоидов.

Ключевые слова: ионоселективный полевой транзистор, дифференциальная пара ИСПТ, иммобилизованные ферменты, органофосфорные и карбаматные пестициды, гликоалкалоиды

1. Вступ

Потенціометричні сенсорні елементи на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) є дуже перспективними з точки зору побудови мультисенсорних систем для хімічного та екологічного моніторингу, оскільки вони мають високу чутливість, швидкодію, малі розміри, сумісні зі стандартними мікроелектронними технологіями та придатні для масового виробництва. ІСПТ можна розглядати як спеціальний тип МОН-транзистора, в якому видалений металевий затвор, а діелектричний шар приведений в контакт з розчином (електролітом), через який до структури прикладається зовнішня напруга. Для надання хімічної чутливості до певної речовини на затворний діелектрик наносять хімічну або біоселективну мембрану. Принцип дії ІСПТ, як сенсорного елемента, заснований на вимірюванні провідності каналу польового транзистора при зміні концентрації певних іонів у розчині [1].

Досвід розробки та експлуатації як окремих ІСПТ-сенсорів, так і багатоканальних систем

на їх основі показує [2-5], що існує цілий ряд конструктивних та технологічних недоліків, що перешкоджають ефективному використанню розроблених прототипів цих сенсорів. Однією з основних проблем при розробці ІСПТ є забезпечення його надійної герметизації при роботі в розчинах електролітів. Тому для ІСПТ необхідна хімічно стійка ізоляція всіх електричних контактів, підкладки та бокових сторін кристалу від електроліту та ретельне ущільнення сенсорної поверхні від протікання розчину. Потрібно також забезпечити формування якісного діелектричного затворного шару, що безпосереднім чином впливає на операційну та довготермінову стабільність іон-селективних транзисторів. Якісний затворний діелектрик дозволяє отримати невелику порогову напругу та знизити до мінімуму струми витоків [2]. Для побудови багатоелементних інтегральних масивів важливо також забезпечити відсутність паразитних струмів витоків між сусідніми транзисторами, що досягається застосуванням спеціальних технологічних засобів [3]. При біо-

хімічних вимірюваннях недоліком ІСПТ-елементів є також недостатня зручність їх експлуатації — нанесення або зміни біочутливих шарів на поверхнях транзисторів [4,5] через малі їх розміри.

Дана робота присвячена розробці нових сенсорних елементів на основі інтегральних кремнієвих рН-чутливих ІСПТ-елементів, для яких в значній мірі враховані означені вище недоліки, а також розробці оптимальних методів їх поєднання з біоселективними ферментними шарами з метою використання створених сенсорних елементів в системах моніторингу токсичних речовин.

2. Розробка диференційних ІСПТ-сенсорних елементів

Особливості топології та технології виготовлення ІСПТ-сенсорів.

В попередніх роботах [3,5] було встановлено, що для отримання високої стабільності, довготермінової надійності сенсорних елементів та відсутності їх взаємовпливу в складі багатоканального масиву доцільно обрати p -каналъну МОН-технологію на кремнієвих підкладках КЕФ-4.5 <111> або <100> з формуванням підзатворного діелектричного шару із отриманої термічним окисленням плівки SiO_2 товщиною 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 товщиною 50-70 нм.

Загальною топологічною особливістю розроблюваних конструкцій ІСПТ, що орієнтовані на роботу в біохімічних лабораторіях, є необхідність забезпечення вільного та зручного доступу до активної чутливої (затворної) області сенсорних елементів для нанесення на них біомембран. Тому для таких елементів може бути використане рознесення активної області затвора і металевих контактів на різні частини кристалу, що забезпечує, з одного боку, зручність доступу до активних областей транзисторів, з другого — надійність ізоляції електричних контактів від розчину. Використання протяжних дифузійних шин від витоку і стоку, що ізолювані від розчину шаром діелектрика, може бути оптимальним вирішенням цієї задачі.

Розроблена топологія передбачає розміщення двох ідентичних p -каналъних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8×8 мм. Схематичне зображення топології диференцій-

ного сенсора показано на рис.1. Дифузійні p^+ -шини з контактами до стоку і витоку кожного з транзисторів виведені на край чипа, як і вивід до вбудованого мікроелектроду порівняння. Для усунення можливості утворення паразитного каналу провідності між p^+ -областями двох транзисторів, чип містить захисну роздільну n^+ -область шириною 50 мкм з контактом до підкладки. Зигзагоподібна геометрія затворної області транзистора з відношенням довжини каналу до його ширини 100:1, що забезпечує достатній рівень крутизни перехідної характеристики.

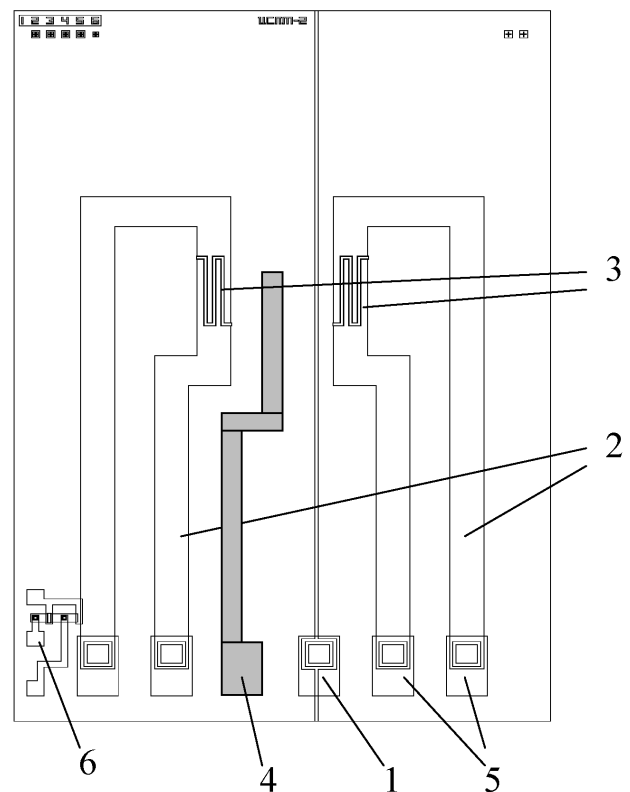


Рис. 1. Контурний вигляд топології диференційної пари ІСПТ, що включає: 1 — контакт до n -підкладки (в центрі), 2 — p^+ -дифузійні шини від областей витоку і стоку кожного із транзисторів, 3 — зигзагоподібні області затворів, 4 — вивід до вбудованого електроду порівняння, 5 — алюмінієві контактні острівці до транзисторів, виведені на край чипа, 6 — два тестових МОН-транзистори з металевими затворами

Вікно в шарі окислу, яке витравлюється для вирощування затворного діелектрика, в новій топології повторює геометрію каналу з перекриттям 7 мкм. В попередніх варіантах технології [3] відкривалося прямокутне вікно над областю каналу, це могло приводити до небажаної дифузії p -домішки в область каналу при насту-

пних технологічних операціях термообробки. Крім того, для усунення можливості виникнення дефектів при відкриванні контактних вікон перед напилюванням алюмінію, було використано двох-стадійне травлення окремо шарів нітриду кремнію і окислу. Для цього була введена додаткова операція фотолітографії та додані відповідні елементи топології на фотошаблоні.

Для спрощення контролю якості виготовлення сенсора до конструкції були введені додаткові тестові МОН-транзистори, аналогічні за структурою сенсорним елементам, але з металевим затвором, з виведеними контактними острівцями (див. рис.1). Наявність цих елементів дозволяє простим тестовим зондом вимірювати пробивні напруги $p-n$ переходів для всіх елементів, оцінювати порогові напруги як активних транзисторів з тонким діелектричним шаром, так і паразитних з товстим окислом, а також можливі струми витікання транзисторів без необхідності при цьому забезпечувати контакт кристалу з розчином електроліту. Передбачена також можливість нанесення напилюванням на кристал сенсора додаткового металевого електрода, що відіграє роль квазі-електрода порівняння в електрохімічній комірці. Послідовність усіх технологічних операцій при виготовленні інтегральних ІСПТ-сенсорів детально описана в [3].

Виготовлені польові транзистори мають наступні параметри: пробивна напруга $p-n$ пере-

ходів біля 50 В, гранична напруга (відкривання) для активних транзисторів біля -2 В, гранична напруга для паразитних транзисторів біля -15 В, струм витіку через затворний діелектрик на рівні 10^{-12} А.

Конструкція вимірювальної комірки.

Як показала практика використання прототипів багатоканальних ІСПТ сенсорів, монолітна архітектура мультисенсора з загальним протоком рідини [5-7] не є досить надійною та зручною у користуванні. Тому була обрана модульна архітектура, в якій власне ІСПТ-чип, вимірювальний перетворювач і система підготовки й постачання проби конструктивно розділені й оформлені у вигляді закінчених блоків, що з'єднуються один з одним за допомогою роз'ємних сполучень.

У відповідності до цих вимог була запропонована уніфікована розбірна конструкція вимірювальної кювети, яка складається з металевішої основи, на яку встановлюється друкована плата з кристалом сенсора, фторопластової кришки з силіконовим ущільненням та з'ємного пробоприймача. При зміні конфігурації сенсорної системи (непроточної на проточну та навпаки, одноканальної на багатоканальну і т.п.) змінюється лише конструкція пробоприймача, решта частин вимірювальної кювети залишаються незмінними. Схематичне зображення конструкції корпусу сенсора показано на рис.2.

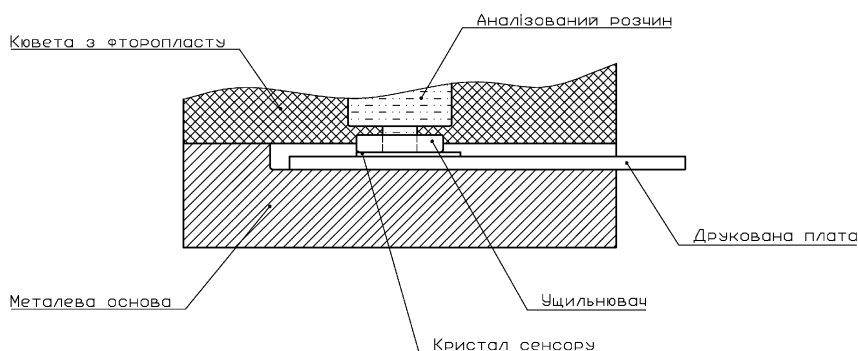


Рис. 2. Схематичне зображення конструкції розбірної кювети для диференційного ІСПТ-сенсора

Чип розміром 8x8 мм з диференційною ІСПТ-парою монтується на спеціальній друкованій платі, його контактні острівці з'єднуються з платою тонкими дротинками та ізолюються компаундом. Фото зібраного диференційного ІСПТ-модуля показано на рис.3.

В непроточному варіанті кювети пробоп-

риймач виконаний у вигляді відкритого фланця з фторопласту, який прикріплюється до кришки корпусу кювети через ущільнювальну прокладку і таким чином утворює стакан для постачання проби. В проточному варіанті кювети забезпечує протікання аналізованого розчину від вхідного отвору до вихідного че-

рез робочий об'єм, надійний контакт сенсора й електрода порівняння з рідиною. Останній встановлюється вертикально таким чином, що його зовнішній капіляр знаходиться в безпосередній близькості до поверхні сенсора. Розроблений ІСПТ-сенсор в корпусі може бути використаний як для вимірювань у складі проточної системи, так і для вимірювань у відкритій ємності з розчином.

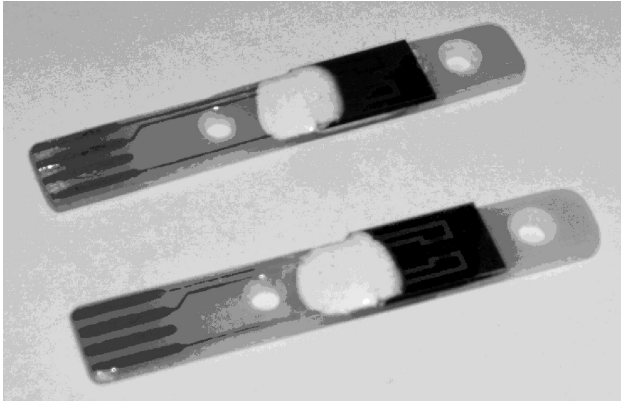


Рис. 3. Диференційний ІСПТ-сенсор змонтовано на спеціальній друкованій платі

Електронний модуль.

Електронна частина приладу складається з двох модулів: блок сенсорних перетворювачів, що формує вихідні сигнали від кожного сенсора та різницевий сигнал від кожної диференційної пари, та модуль програмного керування

та інтерфейсу на основі 8-разрядного мікроконтролера.

Сенсорний перетворювач (СП) служить для перетворення змін електропровідності каналу ІСПТ в напругу, яка придатна для аналого-цифрового перетворення і подальшої обробки. Можливі різні схемотехнічні рішення цієї задачі. Нижче розглянуті переваги й недоліки двох можливих реалізацій схеми СП.

Найчастіше як вимірювальний перетворювач використовується схема стеження з від'ємним зворотним зв'язком, що автоматично підтримує струм каналу ІСПТ постійним на рівні вибраного значення, зображена на рис.4. Схема реалізована на основі електрометричного (інструментального) підсилювача з ІСПТ, що включений в ланцюг зворотного зв'язку, та інтегратора зі зміщеною загальною точкою, вихідний сигнал якого безпосередньо використовується для керування режимом роботи ІСПТ. Вихідний сигнал схеми в стаціонарному режимі визначається виразом:

$$U_{\text{вих}} = A(U_{02} - U_1) = A(U_{02} - U_{01}(1 + 2R/r)), \quad (1)$$

де A — коефіцієнт підсилення інтегратора за постійною напругою, U_{01} та U_{02} — опорні напруги, прикладені до схеми, U_1 — вихідна напруга інструментального підсилювача, r — опір каналу ІСПТ, R — опір резисторів в ланцюгах зворотного зв'язку в схемі (див. рис.4), $(1 + 2R/r)$ — коефіцієнт підсилення інструментального підсилювача.

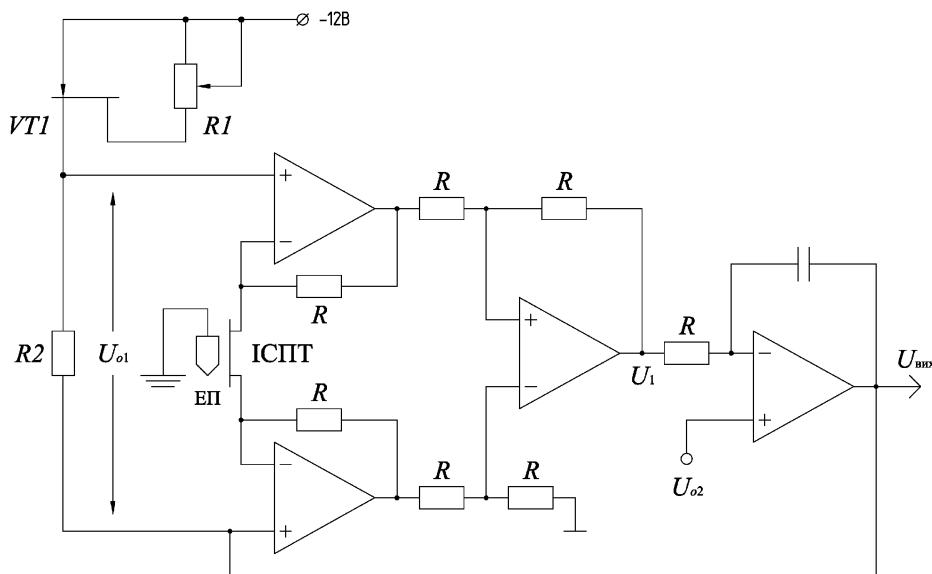


Рис. 4. Схема стеження для вимірювального сенсорного перетворювача, що реалізує режим автоматичного підтримання постійного струму в каналі ІСПТ

Враховуючи, що $r=U_{ce}/I_k=U_{o1}/I_k$ та $I_k=k(U_{ze}-U_{nop}-\varphi)$, де k — крутизна перехідної характеристики, I_k — струм каналу, U_{ce} — напруга стік-витік, U_{ze} — напруга затвор-витік та U_{nop} — гранична напруга відкривання ІСПТ, φ — падіння напруги на межі розділу затворного діелектрика з електролітом, обумовлене адсорбцією іонів (протонів) на чутливій поверхні затвору, отримуємо із (1):

$$\begin{aligned} U_{вих} &= A(U_{o2}-U_{o1}-2RI_k) = \\ &= A(U_{o2}-U_{o1}-2Rk \cdot (U_{ze}-U_{nop}-\varphi)). \end{aligned} \quad (2)$$

Оскільки вихідна напруга в розглядуваній схемі відповідає потенціалу на витoku ІСПТ, то кінцево отримуємо наступне рівняння для визначення вихідної напруги СП:

$$U_{вих} = A[U_{o2}-U_{o1}-2Rk \cdot (U_{вих}-U_{nop}-\varphi(pH))]. \quad (3)$$

При найменшій зміні провідності каналу, що викликане зміною рН середовища та відповідною зміною потенціалу $\varphi(pH)$ на межі розділу затворного діелектрика з розчином, електронна схема автоматично відслідковує цю зміну по ланцюгу зворотного зв'язку таким чином, що вихідна напруга зміниться практично на ту ж саму величину, що і потенціал затворної області транзистора. Таким чином, зміна вихідної напруги схеми в точності повторює всі коливання потенціалу на затворі внаслідок зміни концентрації адсорбованих протонів.

Враховуючи, що значення A дуже велике, в сталому режимі виконується приблизна рівність $U_1 \approx U_{o2}$. Це дозволяє оцінити величину струму I_k в каналі ІСПТ, що підтримується схемою постійним за вибраних умов:

$$I_k \approx (U_{o2}-U_{o1})/2R. \quad (4)$$

Отже, регулюючи опорні напруги U_{o1} та U_{o2} , можна вибрати оптимальну робочу точку транзистора. Методика вибору параметрів схеми включає наступні кроки:

— у відповідності з відомою перехідною характеристикою ІСПТ обирається робочий струм транзистора;

— із виразу (4) визначається потрібна різниця $U_{o2}-U_{o1}$;

— за відомими вихідними характеристиками транзистора обирається значення напруги U_{o1} (тобто стік-витік), потрібне для роботи в стаціонарному режимі;

— із раніше визначених значень $U_{o2}-U_{o1}$ та U_{o1} визначається потрібна величина U_{o2} .

Зазначимо, що розглянута схема має ряд важливих переваг, які виправдовують її використання:

— схема відслідковує потенціал затворної області ІСПТ, тому може бути прямо використана для вимірювання рН-чутливості сенсора, без попереднього вимірювання характеристик транзистора та його калібрування;

— чутливість перетворювача не залежить від крутизни перехідної характеристики ІСПТ (остання впливає лише на динамічні властивості схеми стеження);

— завдяки включенню ІСПТ в диференційному каскаді в схемі пригнічуються синфазні зовнішні завади (на з'єднувальних підводах до стоку та витoku) та шуми;

— динамічний діапазон вихідної напруги схеми не обмежений розміром лінійної області перехідної характеристики ІСПТ.

Але така схема має також і свої суттєві вади, що полягають в нестабільності її робочої точки та в переході до режиму осциляції при втраті контакту з розчином або електродом порівняння. Стабільність схеми залежить від параметрів ланцюга зворотного зв'язку, які повністю визначаються характеристиками вихідного підсилювача. До того ж сам ІСПТ є виконуючою ланкою регулятора, і його характеристики також можуть впливати на стабільність регулювання. При невірному виборі підсилювача та номіналу ємності в ланцюгу зворотного зв'язку схема може губити робочу точку або входити до режиму осциляції. Крім того, при втраті контакту з електродом порівняння (або омичного, або через розчин), автоматичне керування в схемі перестає працювати, внаслідок чого може виникнути безповоротна втрата робочої точки.

Вказані недоліки схеми стеження можна легко усунути, якщо перетворити її на схему прямого вимірювання, розірвавши ланцюг зворотного зв'язку й подавши опорну (відкриваючу) напругу на витік ІСПТ. В цьому випадку напруга на виході інструментального підсилювача буде пропорційна до $(1+2R/r)$, де $r = U_{o1}/I_k$. Вихідна напруга схеми в цьому випадку визначається опорною напругою U_{o1} та обраним струмом каналу ІСПТ, який відповідає лінійній ділянці перехідної характеристики $I_k(U_{ze})$.

Схема прямого вимірювання для диференційної пари транзисторів, один з яких використовується як референтний, може бути реалізована з використанням одного джерела

стабільної напруги U_0 , яке відіграє роль одночасно відкриваючої (напруги затвор-витік) та струмоутворюючої (напруги живлення). Принципова схема такого перетворювача показана на рис.5. ІСПТ використовуються тут як джерело керованого струму, що працює на

резистивне навантаження R , з якого знімається вихідний сигнал. Диференційний сигнал формується за допомогою інструментального різницевого підсилювача, передбачені також підсилені вихідні сигнали з кожного окремого транзистора пари.

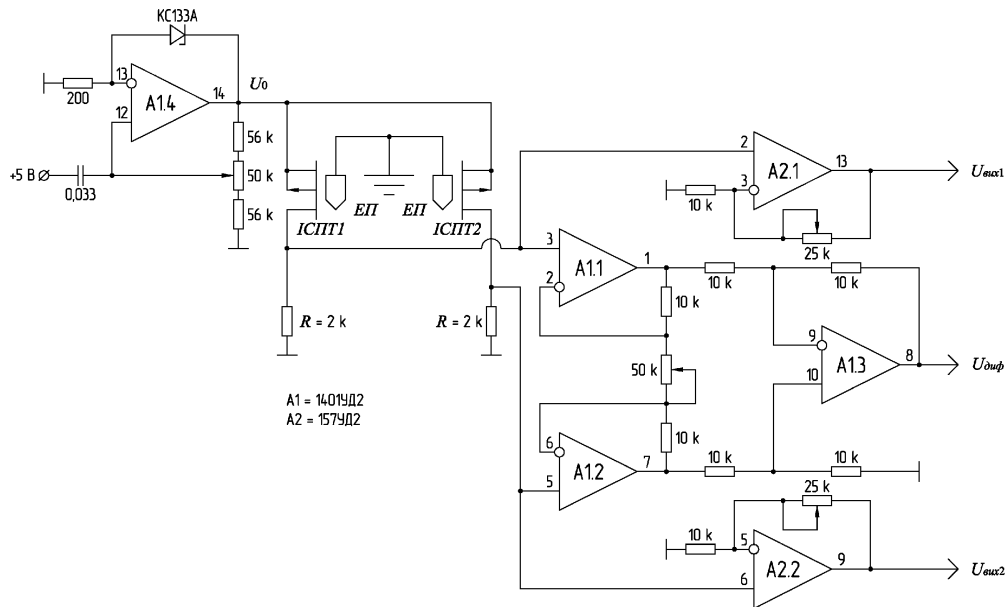


Рис. 5. Принципова електрична схема вимірювального сенсорного перетворювача на базі лінійного диференційного підсилювача сигналу

На відміну від розглянутої вище схеми стеження, де чутливість вимірювання зміни рН середовища визначалася виключно іон-чутливими властивостями самого ІСПТ, в даній схемі чутливість можна регулювати в певних межах за допомогою зміни опору навантаження. Це дозволяє досягнути більшого відношення сигнал/шум за умови, що основна частина шумів обумовлена зовнішніми до ІСПТ факторами (завади та шуми джерела живлення). Вибір оптимальної робочої точки для схеми полягає в підборі оптимального значення резистора навантаження R та опорної напруги U_0 .

Методика вибору цих параметрів схеми полягає в наступному:

- на відомій перехідній характеристиці ІСПТ обирається значення U_0 , що відповідає приблизно середині лінійної ділянки характеристики (при певному робочому значенні рН), та визначається відповідне значення струму в каналі I_k ;

- у відповідності з відомими вихідними характеристиками транзистора визначається мінімально необхідне для роботи в стаціонарному режимі значення напруги стік-витік U_{ce} ;

- нарешті, визначається потрібне значення опору навантаження $R = (U_0 - U_{ce}) / I_k$; на практиці для наявних зразків ІСПТ оптимальним є значення порядку одиниць кОм.

Перевагами розглянутого СП є його простота та стабільність, оскільки схема не використовує зворотних зв'язків. За допомогою диференційного виходу вдається значно зменшити синфазні наведення і шуми, та послабити вплив таких факторів, як коливання температури та іонної сили розчину, вплив світла на результати вимірювань. До відносних недоліків схеми можна віднести те, що її чутливість залежить від крутизни затворної характеристики ІСПТ, яка визначається технологією виготовлення транзистора (з другого боку, за рахунок більшої крутизни можна збільшити чутливість схеми). Крім того, діапазон вимірюваних значень рН обмежений лінійною областю перехідної характеристики, тому потребує більш ретельного вибору робочої точки транзистора.

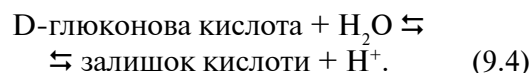
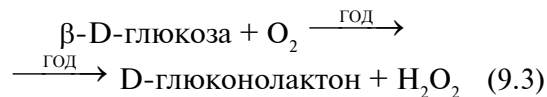
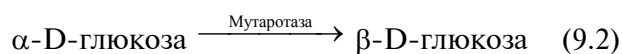
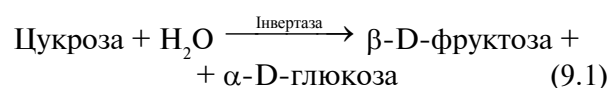
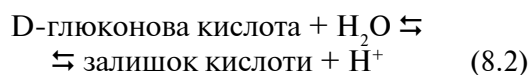
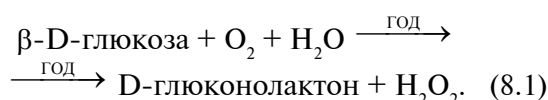
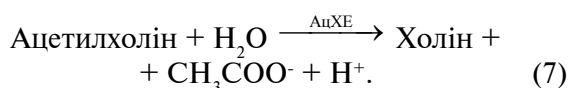
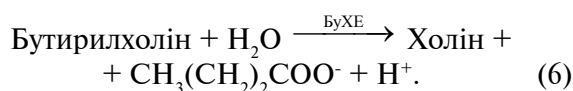
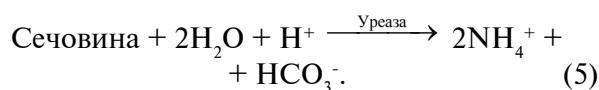
Тестування обох схем СП з наявними зразками ІСПТ показало, що рН-чутливість перетворювача складала 40-45 мВ/рН для схеми

стеження, та 50-80 мВ/рН для схеми прямого вимірювання. Порядок величини шуму для обох вимірювальних схем однаковий і не залежав від рівня вихідного сигналу. Більш високе значення відношення сигнал/шум отримано для схеми прямого вимірювання за рахунок більшої крутизни функції перетворення.

Таким чином, кожний з варіантів СП має власні переваги й недоліки. Схему стеження можна рекомендувати для лабораторних застосувань; при використанні диференційної пари узгоджених транзисторів для кожного з них потрібна окрема така схема. В масових застосуваннях (непрецизійні рН-метри, портативні прилади для експрес-аналізу) доцільно використання більш простих схем прямого вимірювання; в цьому випадку вирішальним фактором може бути енергоспоживання та собівартість.

3. Біосенсорні вимірювання

На основі диференційних рН-ІСПТ-елементів та низки іммобілізованих ферментів як біоселективних елементів розроблено та виготовлено експериментальні зразки біосенсорів. Як біоселективні елементи використано ферментні шари ацетилхолінестерази, бутирилхолінестерази, уреаз, глюкозооксидази та триферментної системи інвертаза-мутаротаза-глюкозооксидаза. В основі роботи біоселективних елементів для прямого аналізу субстратів лежать одноферментні реакції та каскади ферментативних реакцій:



Протікання ферментативних реакцій (5-7) та каскадів реакцій (8, 9) супроводжується зміною концентрації протонів (відповідно має місце локальна зміна рН розчину в мембрані). Це дозволяє використовувати рН-чутливі елементи ІСПТ-перетворювачів.

Основними, найбільш показовими характеристиками біосенсорів є калібрувальні криві (рис.6), які характеризують роботу ферментів, іммобілізованих на поверхні перетворювачів. Як видно із графіків, найбільшою чутливістю характеризується фермент ацетилхолінестераза. Менш чутливими є бутирилхолінестераза та уреаз. В той же час глюкозооксидаза та триферментна система для визначення цукрози відзначалися найгіршою чутливістю відносно інших ферментів. Всі експерименти проводились при кімнатній температурі. За отриманими калібрувальними кривими можна визначити динамічні діапазони визначення субстратів для кожного із ферментних елементів. Вони приблизно однакові за межею визначення, що складає 0,05 — 1,5-10 мМ в залежності від ферменту. Але чутливість усіх цих ферментних мембран була достатньою для подальших експериментів, а саме для їх використання в інгібіторному аналізі.

В якості тестових інгібіторів вибрано фосфорорганічні та карбаматні пестициди (токсичні речовини штучного походження) та стероїдні глікоалкалоїди (природні токсичні речовини). Для того, щоб знайти оптимальні умови для визначення інгібіторів, було досліджено відгуки біосенсорів на додавання субстратів без та в присутності різних інгібіторів у вимірювальному розчині. Для експериментів з токсичними речовинами з незворотнім механізмом інгібування, якими є фосфорорганічні пестициди, ми вирішили використовувати концентрації субстратів, при яких відгуки сенсорів є максималь-

ними (в умовах максимального насичення ферментів субстратами). Для глюкозооксидази ця величина склала 2 мМ, для ацетилхолінестерази — 10 мМ, а для уреази, бутирилхолінестерази та триферментної системи — 5 мМ. У випадку токсичних речовин зі зворотнім механізмом інгібування, якими є стероїдні глікоалкалоїди, для подальших вимірювань по визначенню концентрацій глікоалкалоїдів вирішено використовувати бутирилхолін в концентрації 0,5 мМ. При такій концентрації субстрату спостерігається найкраща чутливість і точність вимірювань.

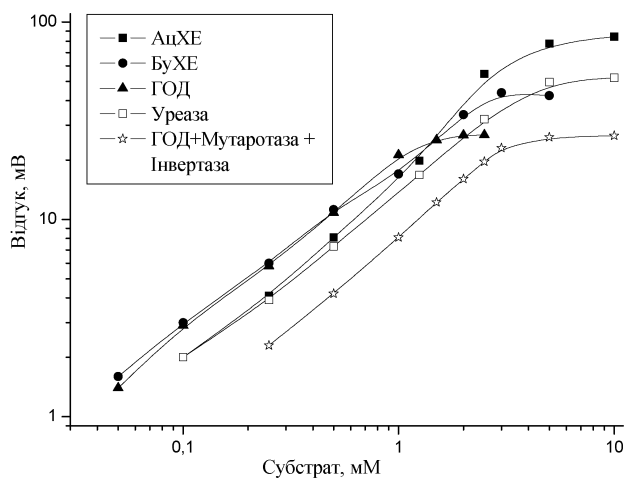


Рис. 6. Залежності величин відгуків біосенсорів з іммобілізованими на чутливій поверхні перетворювачів ферментами від концентрації відповідних субстратів. Вимірювання проводились у 2 мМ фосфатному буфері, рН 6 при кімнатній температурі

Калібрувальні криві біосенсора на основі ацетилхолінестерази та рН-чутливого польового транзистора для різних пестицидів представлені на рис. 7. Вони були лінійні в напівлогарифмічному масштабі для всіх пестицидів, що аналізувались. Мінімальна границя визначення була: 3.0×10^{-11} М для діізопропилфторфосфату, 5.0×10^{-7} М для параоксон-етилену, 1.0×10^{-6} М для параоксон-метилу, 1.0×10^{-7} М для трихлорфону, 5.0×10^{-6} М для паратіон-метилу і 2.0×10^{-6} М для карбофурану.

На рис. 8 представлено калібрувальні криві для визначення різних глікоалкалоїдів. Як можна бачити з рисунка, іммобілізована БуХЕ інгібується всіма цими компонентами в різній мірі, але в діапазоні концентрацій від 1 мкМ до 100 мкМ. Мінімальна границя визначення глікоалкалоїдів залежала від їх типу та склала 0,2 мкМ для α -чаконіну, 0,5 мкМ для α -соланіну та 0,5 мкМ для томатіну. Ця границя визначалась

найменшою концентрацією, що може бути зафіксована з заданим ступенем ймовірності. Динамічні діапазони визначення глікоалкалоїдів дозволяли вести мову про можливість їх кількісного визначення в картоплі та помідорах.

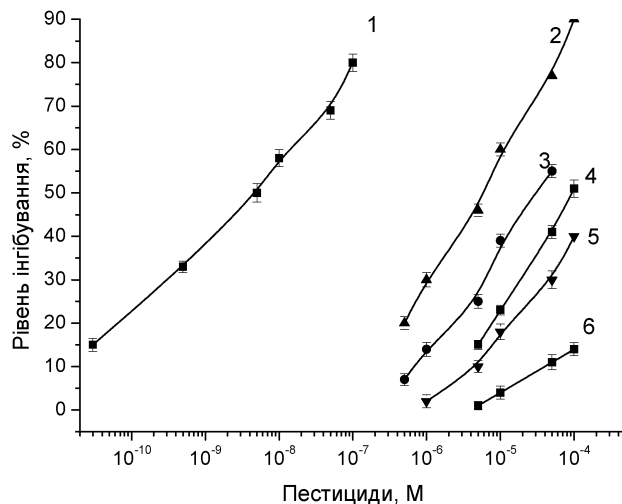


Рис. 7. Калібрувальні криві біосенсора на основі ацетилхолінестерази та рН-чутливого польового транзистора для визначення діізопропилфторфосфату (1), трихлорфону (2), параоксон-етилену (3), карбофурану (4), параоксон-метилу (5) та паратіон-метилу (6). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.0 при кімнатній температурі, час інкубації 20 хв

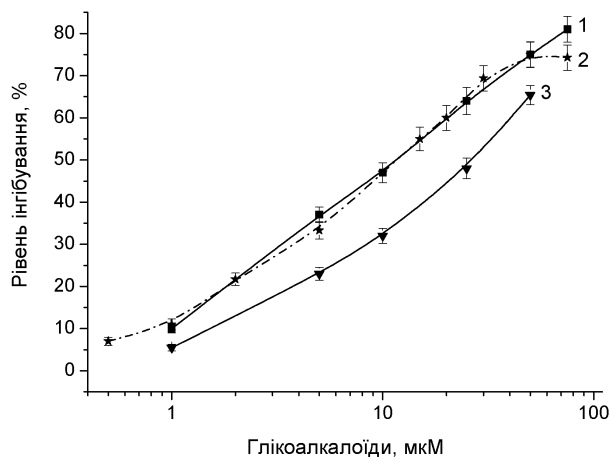


Рис. 8. Калібрувальні криві біосенсора на основі бутирилхолінестерази та рН-чутливого польового транзистора для визначення різних глікоалкалоїдів (α -чаконіну (1), томатіну (2) та α -соланіну (3)). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7.2 при кімнатній температурі, концентрація бутирилхоліну 0.5 мМ

Наступним етапом роботи було дослідження стабільності виготовлених біосенсорів при зберіганні. Біосенсори зберігались у сухому стані

при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, вимірювання проводились з 3-кратним повторенням, через певний проміжок часу (2-3 дні). Як видно з рис.9, відгуки на додавання субстратів усіх розроблених біосенсорів залишалися майже без змін протягом 12 діб. Стабільність роботи біосенсора, а також гарантований строк їхнього зберігання та придатності залежить в першу чергу від стабільності біоселективної мембрани. Найбільш стабільними виявилися біоселективні елементи на основі ГОД та триферментної системи. До втрати активності розроблених ферментних біосенсорів може призвести денатурація чи дезактивація ферментів в складі мембран, або порушення адгезії чи цілісності біоселективних мембран.

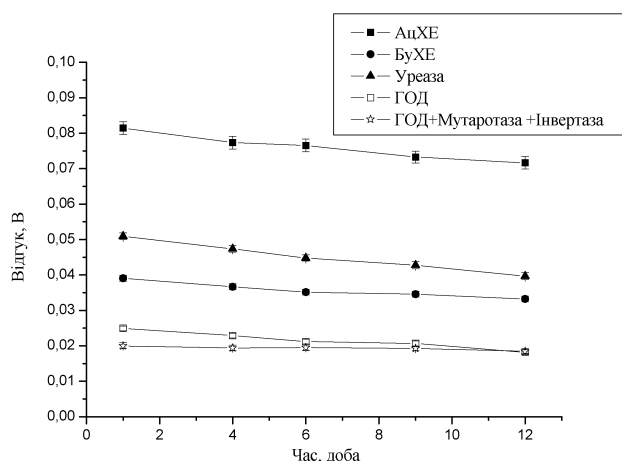


Рис. 9. Залежність величини відгуків біосенсорів, що зберігалися в сухому стані при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, від часу зберігання. Вимірювання проводилися в 2 мМ фосфатному буфері, рН 6 при кімнатній температурі

4. Висновки

Розроблені та виготовлені сенсорні елементи на основі диференційних рН-чутливих польових транзисторів за кремнієвою інтегральною *p*-канальною МОН-технологією. Розроблено уніфіковану вимірювальну кювету для диференційної пари ІСПТ, яка дозволяє проводити вимірювання як в проточному, так і в непроточному режимі та є базовим модулем для побудови багатоканальної сенсорної системи. Розглянуто реалізацію основних типів ІСПТ-сенсорних перетворювачів та проаналізовано їх переваги та недоліки для біосенсорних застосувань.

Розроблено та виготовлено експериментальні зразки біосенсорів на основі диференційних рН-ІСПТ-елементів та низки іммобілізованих ферментів як біоселективних елементів. Використано ферментні шари ацетилхолінестерази, бутирилхолінестерази, уреази, глюкозооксидази та триферментної системи інвертаза-мутаротаза-глюкозооксидаза. Знайдено, що динамічні діапазони для селективного визначення субстратів лежать в межах від 0,1 до $1,5 \div 10$ мМ, в залежності від типу ферменту. Отримано калібрувальні криві для визначення концентрацій органофосфорних і карбаматних пестицидів та глікоалкалоїдів. Показано, що біосенсори майже не втрачали активності при зберіганні протягом 12 днів.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб”.

Список літератури

1. Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C. et al., Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors // *Analytica Chimica Acta.* — 2006. — 568. — P. 248-258.
2. Набок А.В., Присяжнюк О.К., Устилко В.Е., Ширшов Ю.М., Ионоселективные полевые транзисторы с диэлектрической изоляцией // *Укр. хим. журнал.* — 1989. — Т.55, №4. — С. 386-388.
3. Кукла А.Л., Павлюченко А.С., Голтвянский Ю.В., Ширшов Ю.М., Многоэлементные сенсорные массивы на основе интегральных кремниевых ионоселективных полевых транзисторов для систем химического мониторинга // *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника.* — 2007. — Вып.42. — С. 72-79.
4. Koshets I.A., Shirshov Yu.M., Snopok B.A. et al., The ISFET-based system for glucose determination // *Proceedings of SPIE.* — 2001. — 4425. — P. 163-169.
5. Солдаткін О.О., Назаренко О.А., Павлюченко О.С., Кукла О.Л., Архипова В.М. та ін., Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора // *Біополімери і клітина.* — 2008. — Т.24, № 1. — С. 41-50.
6. Soldatkin O.O., Nazarenko O.A., Marchenko S.V., Pavluchenko O.S. et al., Development of enzyme multibiosensor for determination of several toxic compounds // *International Conference “Functional*

Materials ICFM-2007”, Partenit, Crimea, Ukraine, 2007, P. 485.

7. Demchenko O.V., Kukla A.L., Pavluchenko A.S., Array of ISFETs for biochemical applications //

Тези доповіді на 2-й Міжнародній науково-технічній конференції “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології”, Одеса, Україна, 2006, С. 170.