

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 602.1, 519.85, 53.08

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.2.333195>

МОДЕЛЮВАННЯ ВІДГУКУ ФЕРМЕНТНОГО ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ

Юрій Карпенко¹, <https://orcid.org/0000-0001-9619-8012>

Валентина Архипова¹, <https://orcid.org/0000-0002-4009-1539>

Олександр Кукла², <https://orcid.org/0000-0003-0261-982X>

Сергій Дзядевич^{1,3}, <https://orcid.org/0000-0003-2915-716X>

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна

² Інститут фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова,
проспект Науки, 41, м. Київ, 03028, Україна

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01003, Україна

e-mail: ukr.karpenko.yu@gmail.com, avalka@yahoo.com, kukla@gmail.com, dzyad@yahoo.com

Анотація. В роботі проведено моделювання кінетики відгуків потенціометричного біосенсора на основі диференційного рН-чутливого польового транзистору (рН-ПТ) для визначення креатиніну із використанням біоселективного елементу – ферменту креатиніндеіміназа.

При моделюванні враховано такі характеристики рН-ПТ як порогова напруга та крутість перехідної ВАХ транзистора, склад та густина функціональних груп на поверхні двошарового затворного діелектрика оксид-нітрид кремнію. Показано еволюцію зміни величини рН розчину поблизу поверхні транзистора у відповідь на внесення креатиніну та відповідну кінетику відгуку біосенсора. Розглянуто вплив іммобілізації ферменту в фотополімерній матриці PVA-SbQ на концентрацію ферменту в біоселективній мембрані та теоретично досліджено вплив іонної сили буферного розчину на відгук біосенсора.

Проведено порівняння отриманих модельних результатів з експериментальними відгуками рН-ПТ біосенсора для креатиніну в діапазоні концентрацій субстрату 1-10 мМ та показано їх хорошу відповідність. Середня похибка моделювання складала не більше 2 % величини відгуку на внесення 1 мМ креатиніну. Показано, що розраховані значення чутливості розглядуваних рН-ПТ знаходяться в діапазоні 35-40 мВ/рН для робочих величин рН розчину, що відповідає реальним зразкам датчиків.

Ключові слова: потенціометричний біосенсор, рН-чутливий польовий транзистор, креатинін, фермент креатиніндеіміназа, математична модель відгуку

Вступ

Потенціометричні біосенсиори на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ), що поєднують біологічний високоселективний елемент із фізико-хімічним перетворювачем, набули широкого застосування через хорошу чутливість, високу швидкодію та мініатюрність. Використання в якості затворного діелектрика сандвічу оксид-нітрид кремнію додатково дозволяє виготовляти біосенсиори, сумісні зі стандартною кремнієвою технологією, що робить їх придатними для серійного виробництва. Завдяки вказаним рисам ІСПТ-пристрої мають суттєві переваги порівняно зі звичайними іон-селективними електродами, що особливо відчутно в біомедичних застосуваннях.

Одним із важливих біомаркерів в медичній діагностиці є креатинін – кінцевий продукт метаболізму креатину, що використовується для оцінки функціонального стану нирок. Традиційні методи його визначення, зокрема колориметричний метод Яффе та ферментативні спектрофотометричні аналізи, мають певні обмеження, такі як необхідність підготовки проби та використання коштовного обладнання. В той же час застосування ферментних потенціометричних біосенсорів забезпечує високу специфічність до аналіту та експресне визначення його концентрації в аналізованих зразках.

Загалом біосенсиори для визначення біохімічних речовин містять такі основні частини: 1) Фізичний перетворювач – в нашому випадку це іон-селективний електрод або польовий транзистор, який реєструє зміну потенціалу на межі поділу затворного діелектрика з електролітом, спричинену варіаціями іонного складу розчину внаслідок ферментативних реакцій; 2) Біологічний рецепторний шар з вмістом одного або кількох ферментів, що каталізують перетворення субстрату у сполуки, що змінюють концентрацію іонів у аналізованому розчині; 3) Електрод порівняння, який забезпечує стабільний потенціал на затворі транзистора для точних вимірювань. З іншого боку, визначення креатиніну базується на наступних

етапах креатиніназного каскаду: 1) Гідроліз креатиніну: фермент креатиніндеіміназа (КФ 3.5.4.21) каталізує гідроліз креатиніну до N-метилгідантоїну та аміаку (NH_3); останній викликає зміну рН середовища, яку можна реєструвати потенціометричним електродом; 2) Гідроліз N-метилгідантоїну: фермент гідантоїназа (КФ 3.5.2.2) може каталізувати подальше перетворення N-метилгідантоїну у N-метилгліцин (саркозин); 3) Окиснення саркозину: фермент саркозин оксидаза (КФ 1.5.3.1) каталізує реакцію окиснення саркозину з утворенням гліцину, формальдегіду та перекису водню.

Одним із найбільш досліджуваних підходів є використання креатиніндеімінази (КД), яка є каталізатором реакції з утворенням сильного луку, що здатний забезпечити зміну величини рН у буферних розчинах достатньо низької концентрації. Зміна рН середовища, в свою чергу, регулює поверхневий електричний потенціал, що реєструється іон-селективним електродом. Зазначений поверхневий потенціал на межі поділу електрод-розчин залежить від фізичних параметрів самого електроду, його матеріалу, густини функціональних груп на поверхні, температури тощо, а також параметрів електроліту.

Потенціометричні біосенсиори на основі КД досліджувалися у низці наукових робіт. Так, у роботах [1, 2] було продемонстровано ефективність використання іммобілізованого ферменту на різних носіях, таких як полімерні матриці та наноматеріали, що значно покращило стабільність та чутливість сенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ). В роботі [3] показано, що використання наночастинок металів у конструкції сенсора підвищує його селективність та знижує межу виявлення.

Окрім експериментальних підходів, значну роль у розробці біосенсорів відіграє моделювання фізико-хімічних процесів у сенсорних системах. В роботах [4, 5] було розроблено математичні моделі, що описують кінетику ферментативних реакцій у біосенсорах та механізми зміни потенціалу на поверхні електро-

дів. Це дозволило значно покращити прогнозування аналітичних характеристик сенсорів, таких як лінійний діапазон, межа виявлення та час відгуку. Зокрема, моделювання процесів масопереносу та впливу іонної сили середовища допомогло оптимізувати конструкцію біосенсорів та вибрати найбільш ефективні матеріали для іммобілізації ферментів. В роботі [6] вперше описана модель для розрахунку чутливості рН-ПТ із використанням теорії зв'язування поверхневих сайтів і ємності подвійного електричного шару. В роботах [7, 8] було розглянуто використання диференційної пари ІСПТ датчиків, один з яких містить ферментну мембрану (Ф-ПТ), а другий є контрольним з нейтральною мембраною (К-ПТ). Різниця сигналів між Ф-ПТ і К-ПТ, що випробовують на собі однакові робочі умови, значною мірою нівелює вплив заважаючих факторів зовнішнього середовища (температури, світла, електромагнітних завад) та безпосередньо відображає внесок ферментативної реакції. Загалом поєднання експериментальних досліджень та комп'ютерного моделювання відіграє важливу роль у створенні та оптимізації високочутливих та селективних потенціометричних біосенсорів.

Метою даної роботи є розробка моделі ферментного потенціометричного біосенсору на основі диференційного рН-чутливого *p*-канального польового транзистору (рН-ПТ) для визначення креатиніну з урахуванням особливостей іммобілізації ферменту, порівняння отриманих модельних результатів з експериментальними відгуками рН-ПТ сенсорів в актуальному діапазоні концентрацій субстрату та вироблення рекомендацій щодо оптимізації технологічних параметрів біосенсору.

Матеріали і методи

В роботі використовували наступні реагенти: КД (КФ 3.5.4.21) із мікроорганізмів *Streptomyces sp.*, ліофільно висушену, з активністю 25 од.акт./мг білка, Інститут біології клітини НАН України, 25 % сироватковий альбумін бика (БСА), креатинін, гліцерин (чда), модифікований N-метил-4(4'-формілстирил)

піридину метасульфат ацеталем полівініловий спирт (PVA-SbQ), калій діфосфатний і натрій-фосфатний буфер (чда). Методика отримання біоселективних мембран була аналогічною до робіт [8, 9] та є оптимізованим способом іммобілізації білку (БСА або ферменту й БСА) в фотополімері PVA-SbQ відносно компонентів мембрани. А саме, проводилась фізико-хімічна обробка на поверхні ІСПТ суміші білків різних співвідношень КД/БСА з PVA-SbQ ультрафіолетовим опроміненням довжиною 365 нм в камері Bio-Link BLX-365 тривалістю 10-20 хв. з інтенсивністю 20 Дж/м². Для підтримання однорідності концентрацій сполук в сенсорній комірці використовується магнітна мішалка зі швидкістю обертання до 5 с⁻¹.

Математичне моделювання кінетики відгуків рН-ПТ сенсорів виконувалось за допомогою розроблених програмних алгоритмів в середовищі MatLab із застосуванням чисельних методів вирішення диференціальних рівнянь.

В експериментальній частині роботи використовували сенсорні електроди з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів із двошаровим діелектричним покриттям оксид-нітрид кремнію. Розглядувані датчики мали рН-чутливість в середньому біля 40 мВ/рН, транс-провідність в межах 700–800 мкА/В² та порогову напругу біля -1,3 В. Вихідний робочий режим транзисторів налаштовувався в лінійній частині перехідної вольт-амперної характеристики при значеннях напруги затвор-стік -(2,3–2,5) В та струму в каналі близько 500 мкА.

Моделювання відгуку біосенсора

Фізична структура рН-ПТ сенсора

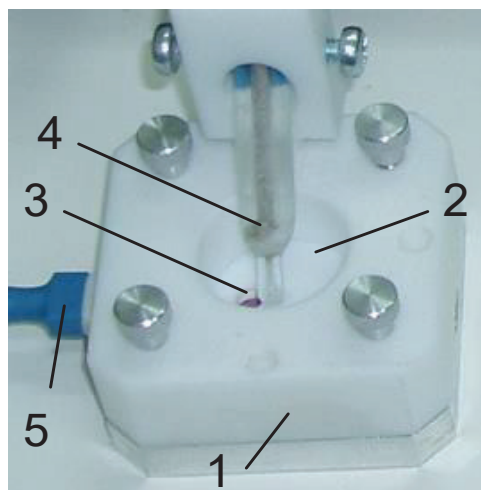
Розроблена топологія сенсорного чипу передбачала розміщення диференційної пари *p*-канальних рН-чутливих транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм (виготовлені в Інституті фізики напівпровідників НАН України, Київ, Україна). Детальний опис потенціометричного перетворювача на основі вказаних рН-ПТ та конструкції вимірювальної комірки наведено в роботах [10-12]. Діелектричний шар затвору складався із термічно

окисленого шару SiO_2 товщиною 50 нм та оса-
дженого шару Si_3N_4 товщиною 70 нм в реак-
торі зниженого тиску. p^+ -дифузійні провідні
шини, вкриті шаром діелектрику та виведені
на край чипу, використовувалися для форму-
вання електричних контактів до областей стоку
та витоку транзисторів. Для усунення можли-
вості утворення паразитного каналу провід-
ності між p^+ -областями двох транзисторів, чип
містив захисну роздільну n^+ -область шириною
50 мкм з контактом до n -підкладки. Зигзагопо-
дібна геометрія затворної області транзистора
з відношення геометричної довжини каналу
до його ширини, рівним 100, забезпечувала
високий рівень крутизни перехідної характе-
ристики порядку 700–800 мкА/В². Отримані
ІСПТ демонстрували вихідну рН-чутливість
близько 40 мВ/рН.

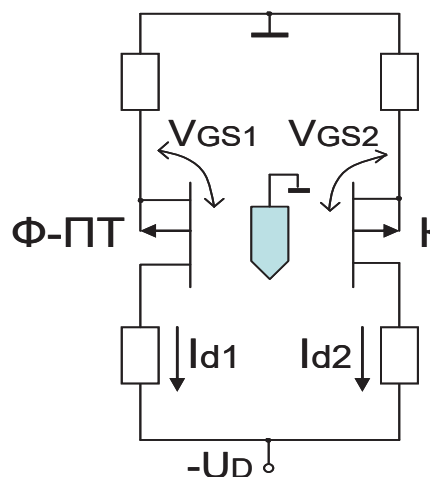
Кристал з польовими транзисторами вста-
новлювався на спеціальній монтажній платі
(50×8 мм) з роз'ємним підключенням до вимі-
рювального пристрою. Два ідентичних рН-ПТ
на чипі дозволяли здійснювати вимірювання в
диференціальному режимі, коли на поверхню

одного наносилась біоселективна (ферментна)
мембрана, а інший використовувався як рефе-
рентний (контрольний). Це дозволяло значно
послабити вплив на результати вимірювань
таких заважаючих факторів, як коливання тем-
ператури, освітлення, величини рН та іонної
сили розчину.

Схематичний вигляд комірки з біосенсо-
ром представлено на рис. 1а, у круглій комірці
об'ємом 5 мл з робочим розчином розташову-
ється зовнішній електрод порівняння та якор
магнітної мішалки. Герметичне ущільнення до
поверхні кристалу ІСПТ утворює у дні комірки
циліндричну порожнину, яка фактично відіграє
роль ферментного мікрореактора. Оскільки її
об'єм складає менше 1% від загального об'єму
комірки з розчином, то можна вважати, що за
відносно невеликий час ферментної реакції
та дифузії її продуктів (декілька хвилин, в за-
лежності від проникності мембран та в'язкості
середовища) зміна концентрації іонів відбува-
ється лише в об'ємі зазначеної мікрореактор-
ної порожнини. Ця обставина враховувалась у
подальших розрахунках.



(а)



(б)

Рис. 1. Вимірювальна комірка та схематичний вигляд електричної схеми з диференціальним рН-ПТ біосенсором: а) Загальна конструкція вимірювальної комірки: 1 – тефлоновий корпус на металевій основі, 2 – циліндрична порожнина з буферним розчином та якорем магнітної мішалки, 3 – комірка ферментного мікрореактора, 4 – електрод порівняння, 5 – роз'ємне сполучення з кремнієвим чипом з диференціальними ПТ; б) Електрична схема підключення диференційного потенціометричного рН-ПТ датчика; електрод порівняння, розташований біля затворів, підключено до “землі”.

Електрична схема підключення двох польових транзисторів зображена на рис. 16. На поверхню активного датчика Ф-ПТ з чутливістю s_1 наносилась мембрана із суміші БСА і ферменту, останній перетворює креатинін у відповідний продукт ферментної реакції – аміак. В той же час на поверхні контрольного датчика К-ПТ з чутливістю s_2 знаходилась нейтральна біомембрана лише із вмістом БСА.

Надалі розглянуто модель ферментного потенціометричного біосенсора для визначення креатиніну в рамках структури “аналізований розчин – ферментна / нейтральна мембрана – чутлива поверхня датчика” яка складатиметься з трьох наступних частин: 1) розрахунок порогової напруги, струмів стоку рН-ПТ та їх різницевого струму як електричного відгуку сенсора, 2) електрохімічна модель поверхневих явищ на затворі рН-ПТ, 3) модель біохімічного перетворення аналіту у ферментній мембрані на продукт реакції, що змінює величину рН та електричний потенціал на межі розділу діелектрик – електроліт.

Розрахунок електричного відгуку рН-ПТ сенсора

Відгуком потенціометричного біосенсора у диференційному режимі будемо вважати різницю струмів стоку ферментного Ф-ПТ та контрольного К-ПТ транзисторів I_{d1} і I_{d2} :

$$\Delta I_d = I_{d1} - I_{d2} . \quad (1)$$

Варто відзначити, що транзистори в залежності від прикладеної напруги можуть працювати у різних режимах (лінійному і насичення). Для більшої загальності в моделі застосовується алгоритм розрахунку еквівалентного електричного кола для ПТ, описаний в роботі [13]. Вираз для струму стоку I_d в каналі польового транзистора, що працює у режимі насичення (в нашому випадку), має вигляд:

$$I_d = K_p (V_{GS} - V_T)^2 / 2 , \quad (2)$$

де $K_p = W \mu_p C_d / L$ – коефіцієнт, що характеризує питому крутість перехідної характерис-

тики транзистора, W і L – ширина та довжина каналу польового транзистора, відповідно, μ – рухливість основних носіїв заряду в каналі (дірки для p -типу), C_d – питома ємність діелектрика, V_{GS} – напруга затвор-витік, V_T – порогова напруга.

Вираз для величини порогової напруги ІСПТ можна представити як суму наступних доданків [13], в якій нас цікавить величина інтерфейсного потенціалу φ_{eo} :

$$V_{T,ISFET} = E_{ref} - \varphi_{eo} + \chi^{sol} + \Delta\phi - \frac{\Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{ox} + Q_{ss}}{C_d} - \frac{Q_B}{C_d} + 2\varphi_f \quad (3)$$

де χ^{sol} – поверхневий потенціал рідкого шару, E_{ref} – потенціал Ag/AgCl електроду, φ_{eo} – поверхневий електричний потенціал на межі поділу електроліт-діелектрик, чутливий до зміни величини рН; його вплив описується доданком $s_1 \Delta pH$, прикладеним до напруги затвор-витік $V_{GS,i}$ (див. рис. 16), Q_{ox} – густина заряду в діелектрику, Q_{ss} – густина заряду поверхневих станів на межі поділу діелектрика та напівпровідника, Q_B – густина заряду збідненого шару в області просторового заряду напівпровідника, Φ_{Si} – робота виходу електрону з кремнію, $\Delta\phi \approx 0.003$ В – дифузійний потенціал між електролітом та електродом порівняння, φ_f – потенціал Фермі.

Електрохімічна модель поверхневих процесів на затворі транзистора

Поверхневі іонні процеси на затворі транзистора зазвичай описуються за допомогою теорії сайтів зв'язування [6] та моделі подвійного електричного шару Гуї-Чепмена-Штерна [14]. Умова електронейтральності системи електроліт/діелектрик/напівпровідник в цілому передбачає рівність нулю загального заряду в системі, і для вихідного стану (в початковий момент після включення затворної напруги) ця умова має вигляд:

$$\sigma_0 + \sigma_{dl} + \sigma_s = 0 , \quad (4)$$

де σ_s – позитивний заряд напівпровідника, що складається з заряду інверсійного шару і заряду іонізованих донорів, σ_0 – заряд, адсорбо-

ваний на межі поділу електроліт/діелектрик, σ_{dl} – заряд дифузійного шару електроліту.

Опис моделі сайтів зв'язування на кремнієвій поверхні, що складається з оксиду і нітриду кремнію, наведено в роботі [15]. Система рівнянь їх рівноважних поверхневих концентрацій (розмірність – од/м²), виражена через амфотерні константи дисоціації і баланси поверхневих комплексів, має вигляд:

$$\begin{cases} [SiO^-][H^+]_s / [SiOH] = K_a \\ [SiOH][H^+]_s / [SiOH_2^+] = K_b \\ [SiNH_2][H^+]_s / [SiNH_3^+] = K_{N+} \\ [SiO^-] + [SiOH] + [SiOH_2^+] = N_{Sil} \\ [SiNH_2] + [SiNH_3^+] = N_{Nit} \end{cases}, \quad (5)$$

де K_a , K_b , K_{N+} – константи дисоціації та N_{Sil} , N_{Nit} – густина відповідно силанольних і аміньних поверхневих сайтів [15].

Знаючи величини цих параметрів, із вирішення системи рівнянь (5) можна отримати залежності для концентрацій заряджених поверхневих комплексів $[SiOH_2^+]$, $[SiNH_3^+]$ та $[SiO^-]$ як функцію концентрації іонів водню $[H^+]_s$ на поверхні діелектрика. Далі отримуємо відомий вираз для поверхневої густини зарядів на межі розподілу електроліт-діелектрик [14]:

$$\begin{aligned} \sigma_0 &= q([SiOH_2^+] + [SiNH_3^+] - [SiO^-]) = \\ &= qN_{Nit} \frac{[H^+]_s}{[H^+]_s + K_{N+}} + qN_{Sil} \frac{[H^+]_s^2 - K_a K_b}{[H^+]_s^2 + K_b [H^+]_s + K_a K_b}. \end{aligned} \quad (6)$$

Перший доданок в кінцевому виразі (6) описує внесок нітриду кремнію в загальну поверхневу густину зарядів, другий доданок відповідає кількості функціональних груп, що надає оксид кремнію, утворений додатково на поверхні нітриду кремнію. Припустимо, що доступна кількість функціональних груп на поверхні ІСПТ є їх лінійною комбінацією. Оперуючи рівнянням (6), можна отримати рівноважне значення рН розчину, при якому загальний заряд поверхневих комплексів стає

нульовим – pH_{pzc} [3], або вирішити зворотну задачу – з'ясувати за цих умов співвідношення доступних функціональних груп. Зазначимо, що згідно [6] власна буферна ємність діелектрика буде дорівнювати:

$$\beta = -\frac{\partial \sigma_0}{q \partial p H_s}. \quad (7)$$

На рис. 2 наведено схему ферментної реакційної комірки з відповідними мембранами на поверхнях обох транзисторів диференційної пари.

Позначимо відстань від поверхні ПТ до площини, що обмежує дифузійний шар електроліту, як x_2 та припустимо, що ця відстань відповідає довжині Дебая, $x_2 = \lambda_D = k^{-1}$, звідси параметр k дорівнює:

$$k = \sqrt{\frac{q^2 N_A \sum_i c_i^0 z_i^2}{\epsilon_m \epsilon_0 k_B T}} = \sqrt{\frac{2q^2 N_A}{\epsilon_m \epsilon_0 k_B T} I}, \quad (8)$$

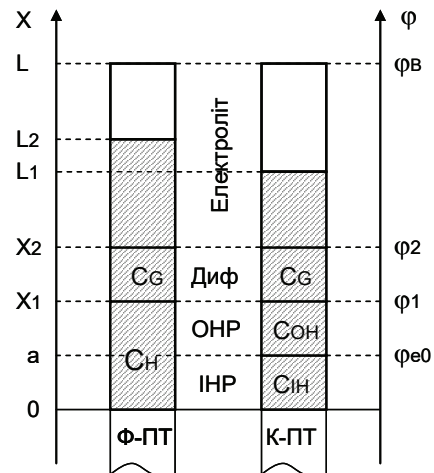


Рис. 2. Схематичний вигляд мікрореакторної комірки, де умовно показане розташування ферментної і БСА мембран (вони заштриховані, товщини L_2 і L_1 , відповідно) вздовж осі X від поверхонь активного Ф-ПТ і контрольного К-ПТ датчиків; вздовж осі ϕ відкладені відповідні потенціали розподілу електричного поля в електроліті.

де ϵ_m – діелектрична проникність електроліту, k_B – константа Больцмана, T – температура, q – елементарний заряд, N_A – число Авогадро, c_i і z_i – мольна концентрація і число заряду i -го іону, відповідно, I – іонна сила розчину.

Поверхнева густина заряду дифузійного шару на відстані $x_2 = \lambda_D$ від поверхні ПТ [16]:

$$\sigma_{dl} = -\sqrt{8\varepsilon_m\varepsilon_0k_B T n^0} \sinh\left(\frac{z\varphi_2}{2V_t}\right) = -2\kappa\varepsilon_m\varepsilon_0 \frac{V_t}{z} \sinh\left(\frac{z\varphi_2}{2V_t}\right), \quad (9)$$

де $V_t = kT/q$ – теплова напруга, $n_0 = c_0 N_A$ – су- потенціал дифузійного шару на відстані x_2 від марна кількість всіх іонів, φ_2 – електричний поверхні діелектрика.

Відповідна ємність дифузійного шару дорівнює:

$$C_G = \frac{\partial \sigma_{dl}}{\partial \varphi_2} = \sqrt{2\varepsilon_b\varepsilon_0 z^2 q n^0 / V_t} \cdot \cosh\left(\frac{z\varphi_2}{2V_t}\right) = \kappa\varepsilon_m\varepsilon_0 \cdot \cosh\left(\frac{z\varphi_2}{2V_t}\right). \quad (10)$$

Інтегральна електрична ємність подвійного електричного шару C_{Int} визначається як ємність з двох послідовно з'єднаних ємностей:

$$\frac{1}{C_{Int}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G}, \quad (11)$$

де $C_H = \varepsilon_r\varepsilon_0\kappa$ – загальна ємність, в свою чергу, послідовно з'єднаних ємностей внутрішнього C_{Int} і зовнішнього C_{OHP} шарів Гельмгольца.

Система рівнянь, що описує модельну структуру електроліт-діелектрик-напівпровідник, може бути записана згідно [14] у вигляді:

$$\begin{cases} \varphi_{eo} = \sigma_0 / C_{Int} \\ \varphi_2 = \varphi_{eo} + \sigma_{dl} / C_H \end{cases}. \quad (12)$$

Чутливість транзистора (в одиницях В/рН) розраховується наступним чином [17]:

$$s = \frac{\partial \varphi_{eo}}{\partial pH_B} = -2.3V_t \left(\frac{2.3V_t C_{dif}}{q\beta} + 1 \right)^{-1}, \quad (13)$$

де C_{dif} – диференційна ємність [6], що характеризує здатність електроліту зберігати заряд у відповідь на зміну поверхневого потенціалу φ_{eo} .

Поверхневий електричний потенціал в цьому разі можна представити, як:

$$\varphi_{eo} = s(pH_s - pH_{psc}). \quad (14)$$

Як витікає з системи рівнянь (12) після підстановки в неї виразів (8-11), необхідним для розрахунків є значення активності (концентрації) всіх іонів, зокрема іонів водню $[H^+]_B$, на відстані довжини Дебая від поверхні діелектрика. Зробимо припущення, що концентрація водню на межі дифузійного шару x_2 не відрізняється суттєво від концентрації водню, обумовленої ферментною реакцією в мембрані, зі сторони поверхні ПТ.

Модель біохімічного перетворення

Вихідним продуктом ферментативного перетворення креатиніну за участю КД (КФ 3.5.4.21) є аміак, який безпосередньо впливає на величину рН розчину в сенсорній комірі. Концентрацію іонів водню у буферному розчині $[H^+]_B$ в залежності від кількості продукту ферментативної реакції можна знайти із системи стандартних хімічних реакцій, пов'язаних з парою кислота/основа $[NH_4^+]/[NH_3]$ у фосфатному буфері з відомим значенням рН. Відповідно до [18] можна записати:

$$\frac{[NH_3(x,t)]_{tot}[H^+(x,t)]_B}{[H^+(x,t)]_B + K_{a,NH_3}} + [H^+(x,t)]_B - 10^{-pH_{B,0}} = \frac{K_W}{[H^+(x,t)]_B} - \frac{K_W}{10^{-pH_{B,0}}}, \quad (15)$$

де $[NH_3(x,t)]_{tot}$ – загальна кількість аміаку в розчині,

$pH_{B,0}$ – початкове значення рН фосфатного буферу.

Для розрахунку відгуків кожного ПТ необхідно знайти кінетику розподілу водню на поверхні рівня x_j . В обраній системі координат (див. рис.2) продукт ферментативної реакції розповсюджується по всій товщині мембрани від щільного шару Гельмгольца біля поверхні ПТ до зовнішньої межі L_2 мембрани Ф-ПТ й далі в розчин. Величина товщини щільного шару x_j на декілька порядків менше від товщини білкової мембрани L_2 , тому приймаємо для реакційно-дифузійних рівнянь нижню межу по рівню $x=0$. Тоді з розподілу продукту $[NH_3(x,t)]$ шукатимемо кінетику концентрації іонів водню на внутрішній поверхні мембрани, ближній до поверхні ПТ, $[H^+]_B = [H^+(0,t)]_B$.

Для опису кінетики ферментативної реакції в біоселективній мембрані застосована одновимірна дифузійна модель, яка доповнена дифузійним процесом субстрату й продукту в контрольній мембрані. Реакційні компоненти (доданки) розділені по товщині на перехідний шар в області $L \geq x > L_j$ та власне білкову мембрану в межах $L_j \geq x \geq 0$, де $j = 1, 2$.

Фермент вважаємо іммобілізованим в мембрані нерухомо, тобто коефіцієнт дифузії ферменту і його комплексу $D_E = D_C = 0$. Вектор стану системи складається з векторів $\bar{Y}_1$ і $\bar{Y}_2$ для мембран Ф-ПТ і К-ПТ, відповідно:

$$\bar{Y} = [\bar{Y}_1; \bar{Y}_2], \quad (16)$$

де $\bar{Y}_1 = [S_1; P_1; E_1; C_1]$ і $\bar{Y}_2 = [S_2; P_2]$, де S_i – концентрація субстрату у i -й мембрані, P_i – концентрація продукту ферментної реакції у i -й мембрані, E_i – концентрація вільних сайтів іммобілізованого ферменту у Ф-ПТ мембрані, C_i – концентрація комплексів фермент-субстрат у Ф-ПТ мембрані.

Оскільки в загальному випадку товщини контрольної і ферментної мембрани не однакові й дорівнюють L_1 і L_2 відповідно, то можна розділити область моделювання по товщині на 3 області (див. рис.2):

$$\begin{aligned} m=1: & \quad L_2 < x \leq L \\ m=2: & \quad L_1 < x \leq L_2, \\ m=3: & \quad 0 \leq x \leq L_1 \end{aligned} \quad (17)$$

де $m=1$ – перехідний шар (він зверху обмежений рівнем L – згідно [19] це максимальна відстань, на якій ще проявляється вплив дифузії на роботу датчика, й вона складає приблизно $1.5 \times L_2$), $m=2$ – область різниці товщин ферментної і контрольної мембран, $m=3$ – область збігу по товщині обох мембран.

Спільну систему диференціальних рівнянь для контрольної і ферментної мембрани можна представити у загальному вигляді так:

$$\frac{\partial y_i}{\partial t} = D_{i,m} \frac{\partial^2 y_i}{\partial x^2} + r_{i,m}, \quad i = \{1-6\}, \quad m = \{1, 2, 3\}, \quad (18)$$

де $D_{i,m}$ – коефіцієнт дифузії i -ої сполуки в m -ній області, y_i – концентрація відповідної i -ої сполуки або іону, $r_{i,m}$ – швидкість хімічного перетворення i -ої сполуки або іону в m -ній області. Відомі коефіцієнти дифузії $D_{i,m}^0$ в областях білкових мембран будуть замінені в областях мембран співвідношенням в'язкостей η_0/η_M згідно з рівнянням Стокса – Ейнштейна:

$$D_{i,m} = \frac{kT}{6\pi R \eta_M} = D_{i,m}^0 \frac{\eta_0}{\eta_M}, \quad (19)$$

де η_0 – в'язкість розчину в комірці для сильно розведених розчинів (прийнято для води при н.у.), η_M – в'язкість розчину в мембрані.

Зрозуміло, що в 1-й області (перехідний шар) швидкості хімічних перетворень в обох мембранах нульові: $r_{i,1}=0$, $i=1..6$; у 2-й області реакції в контрольній мембрані відсутні: $r_{i,2}=0$, $i=5,6$; а у ферментній мембрані в 2-й та 3-й областях (по всій товщі ферментної мембрани) вони підкоряються рівнянням моделі Міхаєліса-Ментен. Тому загальний вектор швидкостей хімічних перетворень r_i в областях $m=1-3$ можна представити таким чином:

$$r_{1-6,1} = 0, \quad r_{1-4,2-3} = \begin{bmatrix} -k_1 E_1 S_1 + k_{-1} C_1 \\ k_2 C_1 \\ -k_1 E_1 S_1 + (k_{-1} + k_2) C_1 \\ k_1 E_1 S_1 - (k_{-1} + k_2) C_1 \end{bmatrix}, \quad r_{5-6,2-3} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (20)$$

де коефіцієнти k_p , k_{-p} , k_2 – константи швидкості реакцій в моделі Міхаеліса-Ментен. Для спрощення розрахунків будемо вважати відсутність порушення дифузійного процесу на межах об-

ластей: для ферментної мембрани при $x=L_2$ й контрольної мембрани при $x=L_1$.

Початкові умови реакційно-дифузійного процесу в початковий момент $t=0$ наступні:

$$\begin{aligned} S_1(x, 0) = 0, \quad P_1(x, 0) = 0, \quad E_1(x, 0) = E_0, \quad C_1(x, 0) = 0, \\ S_2(x, 0) = 0, \quad P_2(x, 0) = 0. \end{aligned} \quad (21)$$

Граничні умови на поверхні рівня $x=L$:

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial S_1}{\partial x} \right|_{x=L} &= D_{S_1} \cdot (q_S - P_1 - S_1), \quad \left. \frac{\partial P_1}{\partial x} \right|_{x=L} = -D_{P_1} \cdot \left(P_1 - E_0 k_2 t \frac{V_M}{V_{work}} \right), \\ \left. \frac{\partial E_1}{\partial x} \right|_{x=L} &= 0, \quad \left. \frac{\partial C_1}{\partial x} \right|_{x=L} = 0, \\ \left. \frac{\partial S_2}{\partial x} \right|_{x=L} &= D_{S_2} \cdot (q_S - P_2 - S_2), \quad \left. \frac{\partial P_2}{\partial x} \right|_{x=L} = -D_{P_2} \cdot \left(P_2 - P_1 \frac{V_M}{V_{work}} \right), \end{aligned} \quad (22)$$

де q_S – початкова концентрація субстрату в комірці.

Концентрація продукту в робочому об'ємі V_{work} біля поверхні мембран з об'ємом V_M із часом буде складати $E_0 k_2 (t - \tau) V_M / V_{work}$ [20], що і відображено в граничних умовах. Затрим-

ка в часі τ між виходом продукту з поверхні Ф-ПТ мембрани і надходженням продукту до поверхні К-ПТ має порядок 10^{-6} с, оскільки в комірці забезпечується однорідність середовища шляхом механічного перемішування. Отже для практичних розрахунків приймаємо $\tau=0$.

Граничні умови на поверхні рівня $x=0$:

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial S_1}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial P_1}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial E_1}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial C_1}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \\ \left. \frac{\partial S_2}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial P_2}{\partial x} \right|_{x=0} = 0. \end{aligned} \quad (23)$$

Теоретично відомо, що рішення такої системи має рівноважний стан на нескінченному часі, але з практичної точки зору для зменшення тривалості спостереження для чисельного вирішення доцільно обрати певне мінімальне відхилення від рівноважних значень [19]. За величиною це відхилення буде співставне з абсолютним допустимим значенням похибки моделювання.

Результати і обговорення

Для моделювання диференційного відгуку рН-ПТ біосенсора був розроблений алгоритм в системі програмування MatLab з наступною послідовністю операцій: 1) знаходження концентрації іонів водню в безпосередній близь-

кості до поверхні ПТ $[H^+(0, t)]_B$, 2) знаходження відповідного електричного поверхневого потенціалу ϕ_{eo} , 3) знаходження порогової напруги $V_{T, ISFET}$ (залежної від поверхневого потенціалу ϕ_{eo} , і коефіцієнта підсилення K_p , та 4) остаточний розрахунок вихідного струму ПТ за допомогою алгоритму, наведеного в роботі [13].

Знаходження концентрації $[H^+(0, t)]_B$ відбувалося у 2 етапи: 1) чисельне рішення системи реакційно-дифузійних рівнянь (18-23) у прийнятих межах областей (17) та 2) на основі отриманих розподілів продукту $[NH_3(x, t)]$ по довжині реакторної комірки, згідно рівняння (15) розраховувався відповідний розподіл концентрації $[H^+(x, t)]_B$ в цілому або одразу $[H^+(0, t)]_B$ на границі з поверхнею ПТ.

Відзначимо, що загалом реакційно-дифузійна система рівнянь моделі Міхаеліса-Ментена є добре відомою. Оскільки потрібно врахувати концентрації субстрату, ферменту і константи Міхаеліса, то для моделювання роботи біосенсору обрано класичні 4 рівняння моделі Міхаеліса-Ментена. В табл. 1 наведено параметри для моделювання реакційно-дифузійної системи мембран, характеристики ферменту КД узяті від виробника.

Табл. 1

Параметри реакційно-дифузійної системи

Параметр	Значення	Розмірність
D_S	$0,1-1,3 \times 10^{-9}$ [21]	$\text{м}^2/\text{с}$
D_P	$2,54 \times 10^{-9}$	$\text{м}^2/\text{с}$
$V_{\max}$	25	мкл
K_M	3,5	мМ
$V_{\text{Enzyme+BSA}}$	0,05	мм^3
V_{PVA}	0,1-0,3	мм^3
P_{enzyme}	10	%
k_1	1,85	$\text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$
k_2	6,3	с^{-1}
k_{-1}	0,185	с^{-1}
L_2	$(40-160) \times 10^{-6}$	м
L	250×10^{-6}	м
V_{cell}	2	см^3
η_0/η_1	0,125	-
q_S	0,1-10	мМ

Імобілізація біоселективних мембран в PVA-SbQ в експериментах відбувалась за однаковою методикою: кількість нанесеного ферменту в мембрані – 0,1 мкл 5% розчину КД з активністю 25 од. акт./мл на 4 біосенсори, загальна кількість білку в мембрані Ф-ПТ складалася з 5 % КД і 5 % БСА, в мембрані К-ПТ – 10 % БСА. Після обробки ультрафіолетовим опроміненням нанесеної на датчик суміші КД з БСА й PVA-SbQ з об'ємами $V_{\text{КД},0}$ і V_{PVA} , відповідно, нова середня концентрація КД в мембрані об'ємом V_M за умови повного збереження активності буде:

$$E_0 = \frac{V_{\max}}{k_2} \frac{V_{\text{КД},0}}{V_M} . \quad (24)$$

Очевидно, що початкова середня по товщині концентрація ферменту в мембрані E_0 буде більша за концентрацію з вихідного розчину у тому разі, якщо $V_M < V_{\text{КД},0}$. Товщина сухої мембрани з об'ємом $V_{\text{КД},0} = 0,05$ мкл, після іммобілізації 10 % ферменту з БСА на поверхні ІСПТ за описаною методикою нанесення складає $L_2 = 40$ мкм [22], а для мембрани об'ємом $V_{\text{КД},0} = 0,1$ мкл в ході розрахунків отримано $L_2 = 100$ мкм. Оцінки вказують, що еквівалентна концентрація КД (2,5 од. акт./л у вихідному розчині) після іммобілізації мембрани з початкової суміші КД-БСА і PVA-SbQ дорівнює 12,5 од. акт./л.

Результати теоретичного розрахунку концентрації протонів $[H^+(0,t)]_B$ за рівнянням (15) для кількості внесеного креатиніну $q_S = 1$ мМ показують (рис. 3), що утворений аміак від каталітичного перетворення КД креатиніну дифундує в об'ємі мембрани таким чином, що у безпосередній близькості до щільного шару величина pH_B зростає на 0,33 за 350 с (початкове значення pH фосфатного буферу дорівнює 7,2).

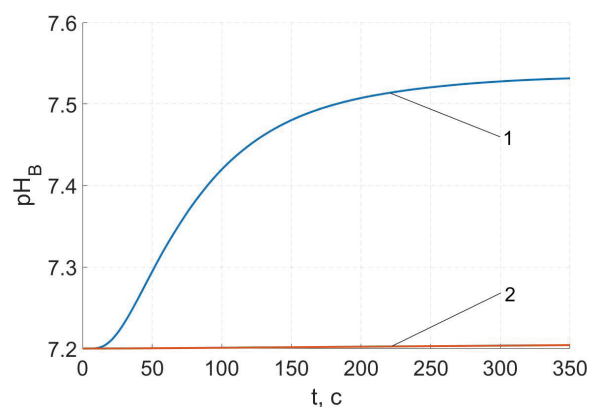


Рис. 3. Теоретичні криві кінетики pH_B , отримані з рівняння (15): 1 – для ферментної мембрани (0,05 мкл 10% КД і БСА), 2 – для контрольної мембрани (0,05 мкл БСА).

Одним з основних параметрів розчину, що впливають на розподіл поверхневого за-

ряду σ_0 , а відтак і на величину електричного потенціалу φ_{eo} , є іонна сила розчину I . Коливання концентрації $[H^+(0,t)]_B$ викликають відповідні зміни потенціалу в електроліті φ_2 , а це змінює рівноважні концентрації всіх сполук в розчині й відповідне варіювання величини

$$I = ([H^+] + [K^+] + [Na^+] + [OH^-] + [H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{2-}] + 3[PO_4^{3-}] + [NH_4^+]) / 2, \quad (25)$$

$$n^0 = c^0 \cdot N_A = [H^+] + [K^+] + [Na^+] + [OH^-] + [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{2-}] + [PO_4^{3-}] + [NH_4^+]. \quad (26)$$

При цьому еквівалентне число заряду для всього розчину буде:

$$z_{eq} = \sum_i (c_i z_i) / c^0. \quad (27)$$

Зауважимо, що рівноважні концентрації $[NH_4^+]$, $[K^+]$, $[Na^+]$, $[OH^-]$ і радикалів фосфорної кислоти були розраховані із системи стандартних хімічних реакцій для фосфатного буферу за відомим значенням рН і концентрацією буферу C_{buf} за допомогою рівняння (15). За отриманими із рівнянь (25-27) значеннями розраховуються наведені вище фізичні параметри у виразах (8)-(11). В ході розв'язання системи (12), одне з рівнянь якої є трансцендентним, для чисельного вирішення було застосовано метод Ньютона-Рафсона, при цьому необхідні значення потенціалу φ_2 розраховані за рівнянням Нернста для кожного ПТ. В табл. 2 наведено фізичні величини і хімічні константи, необхідні для визначення поверхневого потенціалу φ_{eo} .

Отримані значення поверхневих потенціалів φ_{eo} для кожного ПТ диференційної пари далі використано для розрахунку відповідних порогових напруг $V_{T,ISFET}$, які, в свою чергу, були використані для розрахунку струмів стоку обох ПТ за формулами (1)-(3). На рис. 4 наведено теоретично розраховані та експериментально виміряні струми I_d для Ф-ПТ і К-ПТ на внесення 1 мМ креатиніну. Експериментальні дані можуть відрізнятися від теоретичних за рахунок варіювання доданків виразу (3) для $V_{T,ISFET}$, де можуть проявити себе інші фактори, зокрема, дрейф. Можна бачити, що початкові модельні значення струмів Ф-ПТ і К-ПТ тро-

хи не співпадають з експериментальними. Це обумовлено тим, що в реальному експерименті відбувається деякий зсув струму, зумовлений тимчасовим дрейфом порогової напруги, що не враховано в моделі. Більш суттєвим є те, що через зміну проникності й різної адсорбції матриксу з PVA-SbQ на поверхні ПТ [16] змінюється початкова концентрація вільних груп нітриду кремнію, а відтак і концентрації іонів водню на поверхні ІСПТ. Тому початкова базова лінія може варіювати в певному діапазоні (зазвичай до 2-3 мкА). Отримані похибки вимірювань струмів склали для Ф-ПТ 0,53 мкА, для К-ПТ 0,32 мкА, а для диференційного відгуку біосенсора – 0,62 мкА.

Табл. 2

Фізичні величини і хімічні константи

Величина	Значення	Розмірність
C_{buf}	0,005	М
T	298	град. К
$N_{S,tot}$	5×10^{18}	од./м ²
N_{Nit}/N_{Sil}	1,0006	-
ϵ_r	81	-
ϵ_m	78,5	-
K_A	16,5	-
K_B	$1,8 \times 10^{-5}$	-
K_N	1×10^{-11}	-
$C_{d,1}$	$4,5 \times 10^{-4}$	Ф/м ²
$C_{d,2}$	$4,0 \times 10^{-4}$	Ф/м ²
μ_p	336 [23]	см ² /В с

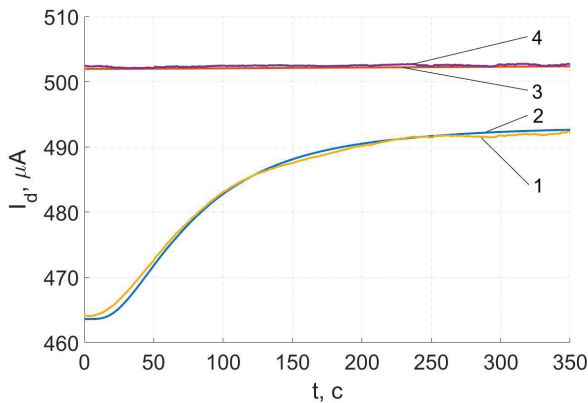


Рис. 4. Модельні та експериментальні відгуки диференційного потенціометричного біосенсора на внесення 1 мМ креатиніну окремо по транзисторах: криві 1-2 для Ф-ПТ та 3-4 для К-ПТ (1,3 – експериментальні дані, 2,4 – теоретичний розрахунок); використані параметри: 0,05 мкл 10% КД і БСА для ферментної мембрани, 0,05 мкл БСА для контрольної мембрани, $L_2=100$ мкм.

Модельний розрахунок показує, що зростання на 0,33 величини pH_B у ферментній мембрані біля поверхні ПТ викликає таку зміну поверхневого потенціалу, що струм стоку датчика зростає на 28 мкА. Таким чином концентрація протонів подвійного електричного шару зі сторони мембрани $[H^+]_B$, як найбільш рухливих іонів в розчині, визначає поверхневі концентрацію $[H^+]_S$ та потенціал ϕ_{eo} .

На рис. 5 представлено теоретично розраховані залежності вихідних струмів від величини pH_B для 4-х однотипових датчиків з ферментними мембранами та для одного контрольного датчика. Також на рисунку для першого біосенсора (синя крива) вказано відповідні кінцеві точки експериментальних відгуків (близькі до рівноважних з відхиленням менше 1%) на концентрації субстрату 0,1 мМ,

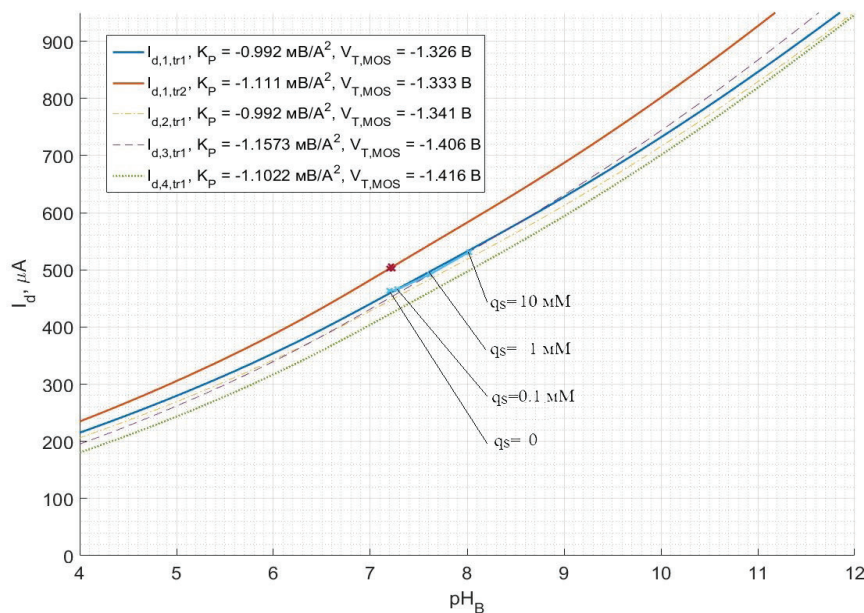


Рис. 5. Розраховані криві для струмів стоку 4-х ПТ- датчиків одного типу в залежності від величини pH буферного розчину; на вставці наведено значення коефіцієнту підсилення K_p і порогової напруги для кожного датчика, отримані з експериментальних вимірювань.

1 мМ і 10 мМ з тривалістю експозиції 350 с, 300 с і 90 с, відповідно.

Для знаходження вихідних струмів ПТ в залежності від напруги затвор-стік було розраховано сумарний потенціал, який діє на Ф-ПТ з буферного розчину, отримана залежність струму стоку від V_{GS} представлена на рис. 6.

Подібний до рис. 6 результат для використуваних нами датчиків був отриманий також в роботі [24], де для $I_d = 500$ мкА робоча напруга була $V_{GS} = -(2,6..2,8)$ В. В даному випадку вона складала $V_{GS} = -(2,45..2,55)$ В.

Теоретично розрахована за формулою (13) величина pH -чутливості представлених

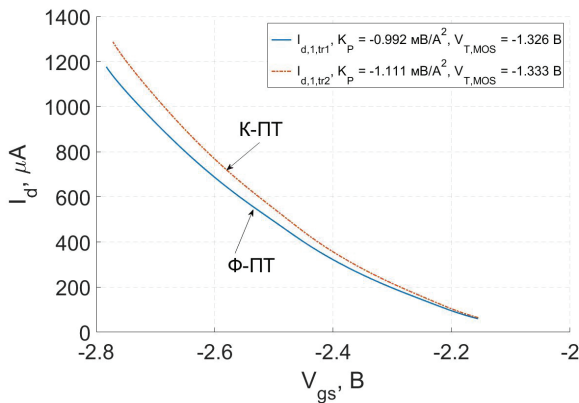


Рис. 6. Залежності струмів стоку від прикладеної напруги V_{gs} для обох транзисторів Ф-ПТ і К-ПТ диференційного датчика.

в цій роботі датчиків загалом коливається в діапазоні від 20 до 45 мВ/рН у широкому діапазоні значень рН для датчиків із вихідним параметром pH_{psc} в межах від 5,8 до 7,8 (рис. 7). Раніше опубліковані результати вимірювань подібних ІСПТ з середнім значенням рН-чутливості 33-35 мВ/рН в діапазоні рН 4-10 [24] узгоджуються з теоретично отриманим середнім значенням 34 мВ/рН. Середня рН-чутливість в діапазоні рН 4-12 складала 35,4 мВ/рН для датчика з параметром $pH_{psc} = 7,8$ (крива 1), а максимальна чутливість в діапазоні рН 4-10 складала 36,3 мВ/рН для обох розглянутих випадків. Як видно, максимальна чутливість датчиків значно менше, ніж максимальна рН-чутливість за Нернстом 59,2 мВ/рН.

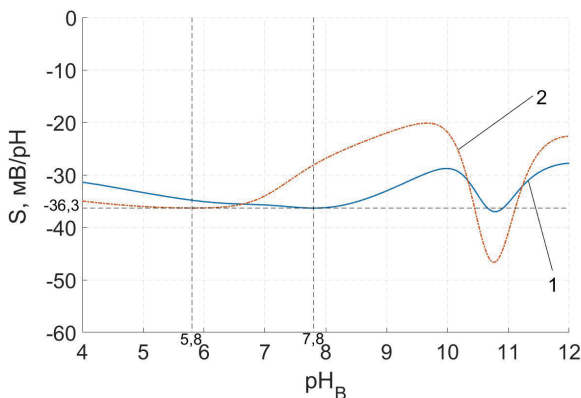


Рис. 7. Розраховані значення рН-чутливості Ф-ПТ в залежності від величини рН буферного розчину: 1 – $pH_{psc} = 7,8$, $K_P = -1,111$ мВ/А²; 2 – $pH_{psc} = 5,8$, $K_P = -0,992$ мВ/А².

Відмітимо, що через наявність на поверхні ПТ як аміних, так і силанольних поверхневих сайтів, слід очікувати два відповідні пікові значення рН-чутливості. Так, на рис. 7 очікуване максимальне значення чутливості при $pH_{psc} = 7,8$ (крива 1) і $pH_{psc} = 5,8$ (крива 2) може свідчити про переважну участь силанольних поверхневих груп, а інше пікове значення біля рН 10,8 (обидві криві) – про переважну участь аміних груп. Очевидно, що із збільшенням кількості аміних груп буде спостерігатися ріст величини піку при рН 10,8 із відповідним збільшенням величини pH_{psc} . Раніше в літературі були опубліковані менші значення pH_{psc} (для оксиду кремнію – 2, для нітриду кремнію – 3,4, для рН-ПТ, подібних розглядуваним в даній роботі – 5,8 [25, 26]). Зазначимо, що розраховане співвідношення оксидних і нітридних груп на поверхні діелектрика для $pH_{psc} = 7,8$ згідно рівняння (6) складає $N_{Nit}/N_{Sil} = 1,0006$, а для $pH_{psc} = 5,8$ – 1,00001.

Як видно, запропонована математична модель в цілому описує поведінку біосенсора досить вдало, проте на практиці через ряд факторів спостерігається відхилення результатів вимірювань від очікуваних теоретичних результатів. На рис. 8 представлені середні значення вимірювань 4-х датчиків в серіях з 10-ти експериментів для різних концентрацій субстрату від 0,1 до 10 мМ. Виходячи із суттєвих відхилень експериментальних кривих від теоретичних (до 4 мкА для відгуків на 2 мМ креатиніну) можна припустити, що методика іммобілізації ферменту з БСА в шарі PVA-SbQ потребує поліпшення в плані її кращої стандартизації. Оскільки з точки зору теоретичної моделі, за умови близьких значень базових ліній Ф-ПТ і К-ПТ, суттєвим фактором впливу на відгук залишається лише кількість ферменту в мембрані та її товщина.

На рис. 9 представлено теоретичні і експериментальні концентраційні залежності відгуків у вигляді різниці струмів в діапазоні концентрацій субстрату 0,1-10 мМ при умові максимальної тривалості кінетики зростання струму в ході ферментативної реакції протягом 180 с. Як видно, існує чітка кореляція між

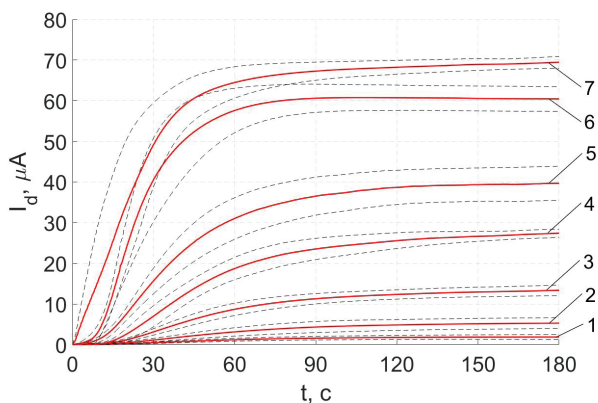


Рис. 8. Кінетика експериментальних відгуків біосенсору на внесення в комірку креатиніну з концентраціями: 1 – 0,1 мМ; 2 – 0,2 мМ; 3 – 0,5 мМ; 4 – 1 мМ; 5 – 2 мМ; 6 – 5 мМ; 7 – 10 мМ; об'єм ферменту в мембрані – 0,2 мкл; пунктирними кривими позначені межі стандартних відхилень експериментальних кривих з рівнем довіри 95 %.

кінцевими значеннями відгуків на рис.8 та 9, тобто між експериментальними і теоретичними значеннями. Таким чином, представлена модель відгуку рН-ПТ біосенсора в цілому досить адекватно описує експериментальні результати для середніх статистичних значень відгуків на вказані концентрації субстрату, в деяких випадках з похибкою менше 1 мкА. Для вдалого моделювання відгуків на менші концентрації креатиніну необхідно більш детально розглянути додаткові параметри біоселективних мембран.

З рис.9 видно, що при концентраціях субстрату поблизу константи Міхаеліса для КД $K_M = 3,5$ мМ спостерігається перетин теоретичної і експериментальної кривої. В інших областях середньоквадратичне відхилення між кривими складає $\Delta I_d = 1,67$ мкА. Така похибка може бути зовнішньою у разі моделювання відгуків біосенсора на концентрації креатиніну в зразках крові з рівнем від 50 мкМ (що еквівалентно відгуку біосенсора у 1-2 мкА). Зазначимо, що вказана величина похибки є на два порядки більшою за наявну експериментальну точність вимірювання струму власне самого ПТ. Отже потрібно констатувати, що для більш точного моделювання відгуків на малі концентрації креатиніну необхідно більш деталь-

но врахувати в теоретичній моделі структуру мембрани, її товщину і розподіл ферменту в об'ємі мембрани.

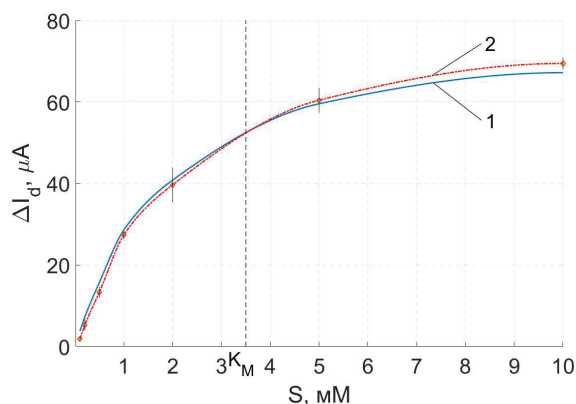


Рис. 9. Залежність диференційного відгуку біосенсора ΔI_d від концентрації креатиніну S для біосенсора з об'єм ферменту КД 0,05 мкл: 1 – теоретична, та 2 – експериментальна криві; окремі модельні точки та експериментальні дані були інтерпольовані кубічним сплайном.

Висновки

Запропоновано математичну модель, яка описує кінетику біохімічного ферментативного перетворення субстрату креатиніну в продукт аміак, що супроводжується зміною величини рН реакційного розчину та її перетворенням у диференційний сигнал відгуку потенціометричного рН-ПТ біосенсора як різниці струмів ферментного та контрольного датчиків. Показано, що зазначена модель з відповідними значеннями концентрації ферменту, об'єму ферментної мембрани і величини рН буферу коректно відображає тенденції у відгуків біосенсора та досить точно прогнозує експериментальні результати в діапазоні концентрацій креатиніну 0,1-10 мМ в умовах іммобілізації ферменту в полімерному шарі PVA-SbQ.

Результати моделювання показали значну залежність відгуку біосенсора від фізичних характеристик затворного діелектрика (величини pH_{pzc} , мірою якого є співвідношення густини поверхневих силанольних та амінних груп), характеристик біоселективної мембрани (товщини і концентрації ферменту) та параметрів електроліту (іонної сили буферного розчину). Показано, що внаслідок іммобілізації фермен-

ту в фотополімерному шарі PVA-SbQ відбувається його концентрування від 2,5 од. акт/мл до 12,5 од. акт/мл, що суттєво впливає на результат розрахунку. Середня похибка моделювання відгуків вихідного струму pH-ПТ складала 0,62 мкА на внесення 1 мМ креатиніну, що відповідає 2 % від максимального відгуку біосенсора. В той же час модель демонструє певне відхилення від експериментальних значень в разі збільшення різниці між концентрацією субстрату і константою Міхаеліса для ферменту креатиніндеімінази.

Показано, що для покращення результатів моделювання, особливо щодо малих концентрацій креатиніну на рівні десятків мкМ, має сенс більш детально розглянути структуру мембрани з іммобілізованим ферментом, врахував її товщину і розподіл концентрації ферменту по об'єму мембрани.

Подяки

Роботу виконано за підтримки Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проектів НДР «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (проект № 2021.01/0010).

Список використаної літератури

- [1]. Öndeş B., Akpınar F., Uygun M., Muti M., Uygun D.A. High stability potentiometric urea biosensor based on enzyme attached nanoparticles // *Microchem. J.*, 2021, 160, 105667.
- [2]. Mu J., Lin J., Huang P., Chen X. Development of endogenous enzyme-responsive nanomaterials for theranostics // *Chem. Soc. Rev.*, 2018, 47(15), p. 5554-5573.
- [3]. Sinha S., Sahu N., Bhardwaj R., Ahuja H., Sharma R., Mukhiya R., Shekhar C. Modeling and simulation of temporal and temperature drift for the development of an accurate ISFET SPICE macromodel // *J. Comput. Electron.*, 2020, 19(1), p. 367-386.
- [4]. Katz E., Poghossian A., Schöning M.J. Enzyme-based logic gates and circuits – Analytical applications and interfacing with electronics // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409, p. 81-94.
- [5]. Loew N., Ofuji T., Shitanda I., Hoshi Y., Kitazumi Y., Kano K., Itagaki M. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance simulations of the mediator-type enzyme electrode reaction using finite element method // *Electrochim. Acta*, 2021, 367, 137483.
- [6]. R. E. G. van Hal, J. C. T. Eijkel, P. Bergveld novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters // *Sens. Act.*, B 24-25, 1995, p. 201-205.
- [7]. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Anna V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // *Biosens. Bioelect.*, 2003, 18(8), p. 1047-1053.
- [8]. Marchenko S. V., Soldatkin O. O., Kasap B. O., Kurc B. A., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Creatinine deiminase adsorption onto silicalite-modified pH-FET for creation of new creatinine-sensitive biosensor // *Nanoscale Res. Lett.* 2016, 11, p. 1-7.
- [9]. V. M. Arkhypova, I. S. Knyr, V. A. Bakhmat, Y. V. Karpenko, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych Comparison of creatinine deiminase immobilization methods for design of potentiometric biosensors for creatinine detection // *Sens. elektron. mikrosist. tehnol.*, 2024, 21(3), p. 4-15.
- [10]. S. V. Marchenko, O. A. Nazarenko, O. L. Kukla, O. S. Pavluchenko, E. K. Krasjuk, O. P. Soldatkin. Development of creatinine-sensitive biosensor for medical application // *Sens. elektron. mikrosist. tehnol.*, 2009, No. 4, p. 55-62.
- [11]. Pavluchenko A. S., Kukla A. L., Goltvianskyi Yu. V., Soldatkin O. O., Arkhypova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Investigation of stability of the pH-sensitive field-effect transistor characteristics // *Sens. Lett.*, 2011, 9(6), p. 2392-2396.
- [12]. O. O. Soldatkin, S. V. Marchenko, A. L. Kukla, A. S. Pavluchenko, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin. Multibiosensor system based on pH-sensitive field-effect transistors for simultaneous determination of Glucose, Creatinine and Urea //

Sens. elektron. mikrosist. tehnol., 2018, 15(2), p. 54-66.

[13]. Won Y. Yang, Jaekwon Kim, Kyung W. Park, Donghyun Baek, Sungjoon Lim, Jinsong Joong, Suhyun Park, Han L. Lee, Woo June Choi, and Taeho Im. // *Electronic Circuits with MATLAB, PSpice, and Smith Chart*. John Wiley & Sons, Inc, 2020, p. 865.

[14]. Wrege R., Schneider M. C., Guimarães J. G., Galup-Montoro C. ISFETs: theory, modeling and chip for characterization // *IEEE 10th Latin American Symposium on Circuits & Systems (LASCAS)*, 2019, p. 109-112.

[15]. Sinha S., Rathore R., Sinha S.K., Sharma R., Mukhiya R., Khanna V. K. Modeling and simulation of ISFET microsensor for different sensing films // *ISSS international conference on smart materials, structures and systems*, 2014.

[16]. Bard A.J., Faulkner L.R., White H.S. *Electrochemical methods: fundamentals and applications* // John Wiley & Sons, 2022, p. 580.

[17]. Bergveld, P. ISFET, theory and practice // *IEEE Sensor Conference*, Toronto, 2003, p. 328.

[18]. Temple-Boyer P., Le Gal J., Pourciel-Gouzy M.L., Sant W., Martinez A. Modeling of EnFETs for the creatinine detection // *Sens. Act., B*, 2006, 118 (1-2), p. 47-52.

[19]. Baronas R., Ivanauskas F., Kulys J. *Mathematical modeling of biosensors* // Springer International Publishing, 2021, p. 456.

[20]. Marcenyuk, V.P., Sverstyuk, A.S., Andrushchak I. E. Podhod k issledovaniyu

global'noj asimptoticheskoy ustojchivosti reshchatykh differentsial'nykh uravnenij s zapazdyvaniem dlya modelirovaniya immunosensorov // *Problemy upravleniya i informatiki*, 2019, 1, p. 62-74 (*in Russian*).

[21]. Rambod E., Beizai M., Rosenfeld M. An experimental and numerical study of the flow and mass transfer in a model of the wearable artificial kidney dialyzer // *Biomed. Eng. Online*, 2010, 9, p. 1-22.

[22]. Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P., Naukovi ta tekhnologichni zasady stvorennia miniatiurnykh elektrokhimichnykh biosensoriv // K.: Naukova dumka, 2006 (*in Ukrainian*).

[23]. Arora N.D., Hauser J.R., Roulston D.J. Electron and hole mobilities in silicon as a function of concentration and temperature // *IEEE Transactions on electron devices*, 1982, 29(2), p. 292-295.

[24]. Lozovoy S., Kukla A., Pavluchenko A. Investigation of metrological performance of the ISFET-based pH sensors. *Sensors & Transducers*, 2014, 27(5), p. 225.

[25]. Aouni F., Mlika R., Martelet C., Ouada H.B., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin A.P. Modeling of the potentiometric response of ENFETs based on enzymatic multilayer membranes // *Electroanalysis*, 2004, 16(22), p.1907-1911.

[26]. Niu M.N., Ding X.F., Tong Q.Y. Effect of two types of surface sites on the characteristics of Si₃N₄-gate pH-ISFETs // *Sens. Act., B*, 1996, 37(1-2), p. 13-17.

Стаття надійшла до редакції 09.06.2025 р.

UDC 602.1, 519.85, 53.08

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.2.333195>

MODELING THE RESPONSE OF AN ENZYME POTENTIOMETRIC BIOSENSOR BASED ON PH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR CREATININE DETERMINATION

Yuriy Karpenko¹, Valentyna Arkhypova¹, Oleksandr Kukla², Sergiy Dzyadevych^{1,3}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU,
150 Akademika Zabolotnogo St, Kyiv, 03680, Ukraine

² V. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, 41 Nauki Ave, Kyiv, 03028, Ukraine

³ Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska St, Kyiv, 01003, Ukraine
e-mail: ukr.karpenko.yu@gmail.com, avalka@yahoo.com, kukla@gmail.com, dzyad@yahoo.com

Abstract. The work presents a simulation of the kinetics of the responses of a potentiometric biosensor based on a differential pH-sensitive field-effect transistor (pH-FET) for the determination of creatinine using a bioselective element – the enzyme creatine deiminase.

The modeling took into account such characteristics of the pH-FET as the threshold voltage and steepness of the transient I-V characteristic of the transistor, the composition and density of functional groups on the surface of the two-layer gate dielectric silicon oxide-nitride. The evolution of the change in the pH value of the solution near the transistor surface in response to the introduction of creatinine and the corresponding kinetics of the biosensor response are shown. The effect of enzyme immobilization in the PVA-SbQ photopolymer matrix on the enzyme concentration in the bioselective membrane is considered and the effect of the ionic strength of the buffer solution on the biosensor response is theoretically investigated.

The obtained model results were compared with the experimental responses of the pH-FET of the creatinine biosensor in the range of substrate concentrations of 1-10 mM and their good correspondence was shown. The average modeling error was no more than 2 % of the response value to the addition of 1 mM creatinine. It was shown that the calculated sensitivity values of the considered pH-FETs are in the range of 35-40 mV/pH for the working pH values of the solution, which corresponds to real sensor samples.

Keywords: potentiometric biosensor, pH-sensitive field effect transistor, creatinine, enzyme creatinine deiminase, mathematical model of response