ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1998. Т. 14. № 2

Вивчення шляхів оптимізації робочих характеристик потенціометричних біосенсорів

О. П. Солдаткін

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

Огляд присвячено власним роботам, що проводилися в тісній співпраці співробітників Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, Київського державного університету імені Тараса Шевченка та Вищої технічної школи м. Ліона (Ecole Centrale de Lyon, Франція). Дослідження направлені на детальний аналіз проблем та недоліків, пов'язаних з роботою потенціометричних біосенсорів. Також здійснено детальний аналіз шляхів вирішення проблеми покращання робочих характеристик потенціометричних ферментних сенсорів.

Вступ. Біосенсори, які базуються на планарних напівпровідникових структурах, привертають до себе значну увагу завдяки тому, що їхній потенціал при використанні мікроелектронних технологій спричинює появу аналітичних систем нового покоління. Такі технології добре пристосовані до серійного виробництва мініатюрних пристроїв. Кінцевою метою є розробка дешевих, одноразових, надійних приладів, придатних до швидкого аналітичного тестування. Останнє становить інтерес для таких галузей, як біомедицина, моніторинг навколишнього середовища та контроль якості води та їжі.

Напівпровідниковими структурами, що найчастіше застосовуються як перетворювачі у біосенсорах, є іон-селективні польові транзистори (ІСПТ), запроваджені Бергвелдом [1] у 1970 р. і використані вперше у 1980 р. Карасом та Джанатою у ферментному біосенсорі (ензимний польовий транзистор (ЕНПТ)) для визначення пеніциліну [2]. Ці піонерські роботи стимулювали цілу низку розробок ферментних та імунних сенсорів на основі ІСПТ. Однак, попри початковий оптимізм, прогрес у цій області виявився повільнішим, ніж очікувалося [3].

Впровадження та комерціалізація розроблюваних ферментних сенсорів на основі pH-чутливих польових транзисторів лімітуються, частіше за все, такими факторами, як:

— сильна залежність сенсорного відгуку від буферної ємності, іонної сили та pH аналізованого розчину;

— недостатньо низька мінімальна концентрація аналіту, яка визначається за допомогою біосенсора, та вузький або зміщений динамічний діапазон вимірюваних концентрацій;

— недостатня стабільність (операційна та при зберіганні);

— відсутність добре відпрацьованих технологій нанесення біоселективних мембран на поверхню фізичних перетворювачів, що призводить до появи неспецифічних сигналів при роботі в реальних зразках.

Протягом останніх 10—15 років досить значні дослідницькі зусилля були направлені на вирішення згаданих питань та на покращання аналітичних характеристик потенціометричних ферментних сенсорів. Деякі з перелічених проблем вирішувалися простим використанням розчинів з різною буферною ємністю, насиченням системи косубстратом (у випадку глюкозного сенсора вузький динамічний діапазон останнього розширювався насиченням киснем аналізованого розчину чи заміною кисню на ферицианід), а також використанням заряджених додаткових мембран.

У даній публікації представлено результати детального дослідження шляхів подолання деяких

© О. П. СОЛДАТКІН, 1998

зазначених труднощів та способів покращання робочих характеристик потенціометричних ферментних сенсорів. Як модельні системи було використано біосенсори для визначення пеніциліну, глюкози та сечовини.

Використання розчинів з різною буферною ємністю при визначенні концентрацій пеніциліну, сечовини та глюкози потенціометричними ферментними сенсорами на основі пеніцилінази, уреази та глюкозооксидази відповідно показало різну залежність характеристик цих сенсорів від буферної ємності [4—6]. При аналізі пеніциліну [4] було показано, що із збільшенням буферної ємності зразка динамічний діапазон сенсора значно розширюється (табл. 1).

Так, при 1,0 мМ концентрації фосфатного буфера в аналізованому зразку динамічний діапазон біосенсора складав 0,05—5 мМ пеніциліну, в той же час при концентрації буфера 50 мМ він розширювався і складав 2,0—75 мМ субстрату. Необхідно відмітити, що чутливість сенсора при цьому зменшувалася, а мінімально детектована концентрація субстрату відповідно зростала. Фактично мав місце зсув динамічного діапазону сенсора в бік високих концентрацій аналіту.

Подібну залежність величини динамічного діапазону від буферної ємності (концентрації фосфатного буфера) було отримано і для уреазного сенсора [5] (див. табл. 1). Але різниця по відношенню до пеніцилінового сенсора була в тому, що динамічний діапазон уреазного сенсора розширити достатньо не вдавалося. При значному збільшенні концентрації фосфатного буфера (до 20 мМ та вище) величина відгуку біосенсора падала, а подальшого розширення динамічного діапазону не спостерігалося. Мабуть, починав діяти якийсь механізм обмеження динамічного діапазону сенсора, наприклад, пов'язаний з $K_м$ для уреази.

У випадку ж глюкозного потенціометричного ферментного сенсора [6] використання розчинів з різною буферною ємністю взагалі ніякого розширення динамічного діапазону не давало (див. табл. 1), оскільки якась інша причина, не обумовлена буферною ємністю чи $K_м$, лежить в основі його вузького діапазону. Використання буферних розчинів з підвищеною буферною ємністю призводило тільки до значного зниження чутливості сенсора.

Отже, на основі отриманих результатів можна зробити висновок, що у випадку пеніцилінового (та в певній мірі уреазного) біосенсора за допомогою вибору буферної ємності аналізованого зразка можна підбирати чутливість і необхідну для аналізу субстрату область лінійної ділянки динамічного діапазону сенсора. В випадку ж глюкозного ЕНПТ зазначений підхід давав можливість тільки модулювати чутливість біосенсора. Але, на жаль, цей підхід обмежується лише вимірами *in vitro* і тільки за умов значного розведення зразка. Він не може бути використаний при аналізі реальних зразків без їхнього розведення.

Насичення аналізованого зразка косубстратом. *Насичення зразка киснем шляхом продування останнього через аналізований розчин.* У результаті аналізу калібрувальних кривих глюкозного сенсора на основі pH-ПТ перетворювачів [6—8] було виявлено, що незалежно від методу імобілізації ферменту на чутливій області перетворювача та товщини мембрани калібрувальні криві

Таблиця 1
Характеристики ЕНПТ, специфічних до пеніциліну, сечовини та глюкози, в залежності від концентрації буфера в аналізованому зразку [4—8]

Тип ЕНТП	Концентрація фосфатного буфера, мМ pH 7,3—7,4)	Мінімально детектована концентрація субстрату, мМ	Лінійна ділянка динамічного діапазону, мМ
Пеніциліновий	1	0,05	0,05—5,0
	10	0,5	0,5—15,0
	50	2,0	2,0—75,0
Уреазний	1	0,01	0,01—0,50
	5	0,10	0,10—1,50
	10	0,25	0,25—2,50
	20	0,50	0,50—2,50
Глюкозний	1	0,05	0,05—1,50
	10	0,25	0,25—1,50

залежності величини відгуків від концентрації глюкози виходили на точку насичення при концентрації глюкози близько 1,5—2,0 мМ. Було зроблено припущення, що точка насичення на калібрувальній кривій залежить від концентрації кисню в аналізованому розчині, оскільки кисень є косубстратом реакції перетворення глюкози до глюконової кислоти

$$\beta\text{-D-Глюкоза} + \text{FAD} = \text{D-Глюконо-}\delta\text{-лактон} + \text{FADH}_2; \quad (1)$$

$$\text{FADH}_2 + \text{O}_2 = \text{FAD} + \text{H}_2\text{O}_2. \quad (2)$$

D-Глюконо-δ-лактон спонтанно дисоціює до глюконової кислоти. Ця реакція каталізується ферментом глюкозооксидазою (ГОД) і лежить в основі електрохімічного визначення глюкози.

Залежність стаціонарного відгуку глюкозного ЕНПТ від концентрації глюкози в зразку представлено на рис. 1. Виміри здійснювали без насичення зразка киснем (крива *1*) та при продуванні останнього через аналізований зразок (крива *2*). Як видно з рисунка, насичення зразка косубстратом розширює динамічний діапазон сенсора і підтверджує припущення, що саме концентрація кисню в аналізованому зразку лімітує динамічний діапазон сенсора. Але вирішення цієї проблеми за рахунок насичення зразка киснем нереальне в рамках рутинного аналізу і значно обмежує область використання розробленого біосенсора.

Заміна кисню на фериціанід. Інший підхід для розширення динамічного діапазону глюкозного сенсора — це заміна природного косубстрату (кисню) на фериціанід і насичення системи останнім [9]. При цьому окислення глюкози ГОД проходить за такою схемою:

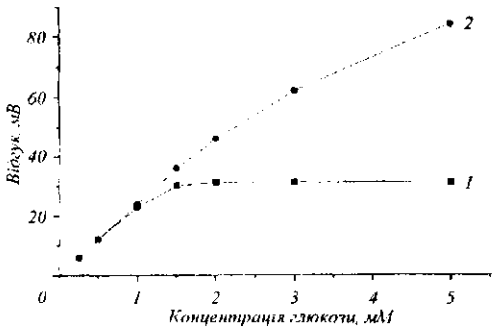

Рис. 1. Калібрувальні криві для глюкозного ЕНПТ в звичайних умовах вимірів (*1*) та при насиченні зразка киснем (*2*). Визначення концентрації глюкози проводили в розчині 1 мМ фосфатного буфера, pH 7,3

$$\beta\text{-D-Глюкоза} + \text{FAD} = \text{D-Глюконо-}\delta\text{-лактон} + \text{FADH}_2; \quad (3)$$

$$\text{FADH}_2 + 2[\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-} = \text{FAD} + 2[\text{Fe}(\text{CN}_6)^{4-} + 2\text{H}^+. \quad (4)$$

Дійсно, при насиченні зразка фериціанідом значно розширюється динамічний діапазон глюкозного потенціометричного сенсора. Так, за концентрації ферриціаніду 80 мМ лінійний діапазон визначення розширюється до концентрації глюкози 15—20 мМ і навіть більше. Але знову ж таки, застосування ферриціаніду значно ускладнює процедуру визначення глюкози *in vitro* і робить взагалі неможливим використання біосенсора для вимірів *in vivo*. Тому наступним етапом було використання заряджених напівпроникних додаткових мембран, нанесених поверх референтної та ферментної мембран.

Використання заряджених додаткових мембран для покращання аналітичних характеристик глюкозного ЕНПТ. Як уже зазначалося вище, аналітичне застосування ЕНПТ обмежується значною залежністю відгуку сенсора від pH, буферної ємності та іонної сили зразка, а також косубстратним обмеженням швидкості ферментативної реакції, яка лежить в основі аналізу при використанні глюкосенсорів [6—8].

Відомо, що дію останнього фактора у випадку амперометричного ферментного біосенсора можна подолати шляхом застосування додаткової мембрани, яка розширює динамічний діапазон сенсора [10]. Додаткові заряджені мембрани (альбумінову чи Nafion) з таким самим ефектом було нещодавно використано нами та японськими вченими для глюкозних ЕНПТ [6, 11, 12]. Було показано, що сенсори, модифіковані такими мембранами, демонструють розширений динамічний діапазон при визначенні глюкози. Верхня межа лінійної ділянки динамічного діапазону за допомогою подібних ЕНПТ зсувається до 15—20 мМ і навіть вище.

Однак визначення глюкози у нерозведеній сироватці чи у цільній крові (концентрація аналіту у діапазоні 3—20 мМ) за допомогою ЕНПТ біосенсора є складним навіть при розширенні його динамічного діапазону через високу буферну ємність аналізованого зразка.

Враховуючи вищевикладене, наступним кроком було вивчення можливості застосування додаткових мембран з метою зниження впливу концентрації буфера на відгук глюкозних ЕНПТ, а не тільки для розширення їхнього динамічного діапазону. Біосенсори без додаткової мембрани мали швидкий (близько 30 с) відтворюваний відгук на

додавання субстрату. Однак динамічний діапазон сенсора був дуже вузьким (до 1,5 мМ) і амплітуда відгуку суттєво залежала від концентрації буфера (величина відгуку зменшувалася у 20 разів, коли концентрація буфера змінювалася з 1 до 10 мМ). Як показано вище, причиною вузького динамічного діапазону глюкозних ЕНПТ є кисневе обмеження каталітичного глюкозного окислення, а залежність амплітуди відгуку від концентрації буфера є наслідком зв'язування протонів іонами буфера в мембрані і так званого буфер-опосередкованого транспорту протонів із ферментної мембрани [13].

Застосування додаткових мембран помітно змінює характеристики біосенсора, такі як динамічний діапазон, залежність відгуку від концентрації буфера та часу відгуку [6, 12]. З даних, наведених у табл. 2, видно, що використання 1 % Nafion мембрани на поверхні ферментної мембрани розширює динамічний діапазон ЕНПТ до 2,5 мМ і трохи знижує його чутливість до концентрації буфера. Використання 5 %-го розчину Nafion при нанесенні додаткової мембрани призводить до розширення динамічного діапазону сенсора у 3—5 разів (особливо коли вимірювання проводяться в кінетичному режимі [6]) і робить відгук сенсора майже нечутливим до збільшення концентрації буфера з 1 мМ до 10 мМ. Час відгуку для ЕНПТ з 5 % Nafion мембраною становить 5—7 хв у порівнянні з 30 с для ЕНПТ без додаткової мембрани. Цей факт підтверджує припущення, що Nafion мембрана дійсно створює додатковий дифузійний бар'єр для субстратів та продуктів ферментативної реакції.

У подальших експериментах використовували сенсори, модифіковані 5 % Nafion додатковими мембранами та без них.

Концентрація буферних компонентів з низькою молекулярною масою (в основному карбонати), що визначають pH та ємність буфера крові, становить близько 25—30 мМ [14]. Тому важливо було порівняти відгуки глюкозних ЕНПТ без та з додатковими мембранами у 20 мМ та більш концентрованих буферних розчинах [6]. Результати представлено на рис. 2.

Відгук ЕНПТ без додаткової мембрани сильно залежав від концентрації буфера і зменшувався майже у 50 разів за її зміни від 1 до 40 мМ (відгук сенсора у 1 мМ фосфатному буфері, pH 7,4, який містив 140 мМ NaCl, взято за 100 %). У той же час ЕНПТ з додатковою мембраною показує значно нижчу залежність величини відгуку від концентрації буфера. Відгук знижується майже лінійно при збільшенні концентрації буфера і у 40 мМ фосфатному буфері диференційний вихідний сигнал

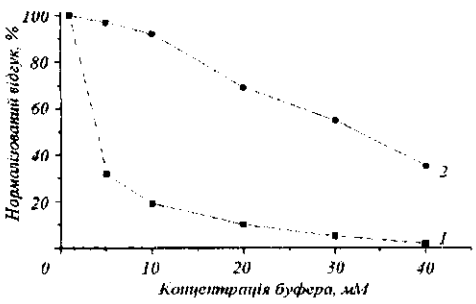

Рис. 2. Залежність стаціонарного відгуку глюкозного ЕНПТ (без додаткових мембран (*1*) та з додатковим шаром Nafion полімеру поверх референтної мембрани та мембрани, що містить іммобілізований фермент (*2*)) від концентрації буфера. Виміри проводили в фосфатному буфері (pH 7,4), що містив 140 мМ NaCl та 2 мМ глюкозу

Таблиця 2

Характеристики глюкозних ЕНПТ (модифікованих Nafion мембранами) в залежності від концентрації буфера в аналізованому зразку [6]

Тип додаткової мембрани	Концентрація фосфатного буфера, мМ (pH 7,3—7,4)	Мінімально детектована концентрація субстрату, мМ	Чутливість сенсора, мВ/мМ субстрату	Динамічний діапазон сенсора, мМ
Nafion, %				
1	1	0,05	20,0	0,05—2,5
1	10	0,15	7,0	0,15—2,5
5	1	0,05	18,0	0,05—5,0
5	10	0,15	17,0	0,05—6,0

дорівнює близько 35 % його величини у 1 мМ буферному розчині.

Таке зниження впливу буферної ємності на відгук глюкозного ЕНПТ можна пояснити, беручи до уваги властивості Nafion як катіонообмінника. Наприклад, було показано, що коефіцієнт дифузії для іонів Na^+ крізь Nafion мембрану у 100 разів перевищує цей показник для іонів Cl^- [15]. Негативно заряджені групи Nafion мембрани створюють бар'єр для дифузії негативно заряджених іонів. У цих дослідженнях застосовували фосфатний буфер і діяв буфер-опосередкований механізм дифузії протонів з ферментного шару завдяки рухові нейтральних та негативно заряджених часток буфера крізь мембрану.

Наявність додаткової Nafion мембрани ефективно блокує перенесення заряджених іонів буфера і, таким чином, суттєво знижує внесок вищезгаданого механізму до загального дифузійного потоку протонів крізь Nafion мембрану.

Порівняння стабільності обох типів ЕНПТ [6] (з додатковою та без додаткової мембрани) при інтенсивному використанні та довгостроковому зберіганні показало, що стандартне відхилення величини відгуку сенсора до 1 мМ концентрації глюкози було менше за 5 % для 40 вимірювань протягом одного дня. Відгук сенсора залишався стабільним протягом принаймні 1 місяця за зберігання в сухому стані при 4 °С.

Висновки. Таким чином, було показано, що, здійснюючи виміри субстратів за допомогою потенціометричних біосенсорів у спеціальних умовах (використання зразків з різною буферною ємністю, насичення системи косубстратами), можна впливати на їхні основні характеристики. Формування заряджених додаткових шарів поверх референтної та ферментної мембран, принаймні для глюкозного ЕНПТ, призводить до значного зменшення впливу концентрації буфера на відгук біосенсора, а також розширює динамічний діапазон відгуку сенсора до 15—20 мМ глюкози. Негативно заряджені групи в додаткових БСА та Nafion мембранах блокують транспорт протонів, опосередкований буферними носіями. Окрім того, додаткова мембрана ефективніше обмежує дифузію глюкози, аніж кисню, через мембрану, що призводить до розширення динамічного діапазону сенсора.

А. П. Солдаткин

Изучение путей оптимизации рабочих характеристик потенциометрических биосенсоров

Резюме

Обзор посвящен собственным работам, которые проводились в тесном сотрудничестве ученых Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киевского университета имени Тараса Шевченко и Высшей технической школы г. Лиона (Ecole Centrale de Lyon, Франция). Исследования были направлены на детальный анализ недостатков и проблем, связанных с работой потенциометрических биосенсоров, а также на изучение путей решения этих проблем. Также сделан анализ подходов для улучшения рабочих характеристик потенциометрических ферментных сенсоров.

Alexey P. Soldatkin

Study of the ways of the working characteristics optimisation of potentiometric biosensors

Summary

Review dedicated to the own works that were done in the frame of collaboration between Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev State University and Ecole Centrale de Lyon (France). These investigations were directed on the detailed analysis of disadvantages and problems, connected with performance of potentiometric biosensors, and on the detailed study of the ways to solve these problems. There is an analysis of approaches for improvement of working characteristics of potentiometric enzyme sensors in this review as well.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Bergveld P.* Development of an ion-sensitive solid state device for neurophysiological measurements // IEEE Trans. Biomed. Eng.—1970.—17.—P. 70—71.
2. *Caras S., Janata J.* Field effect transistors sensitive to penicilline // Anal. Chem.—1980.—52.—P. 1935—1937.
3. *Guilbault G. G.* Biosensors — current status and future possibility // Chimia.—1988.—42.—P. 267—279.
4. *Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Ельская А. В.* Ферментные биосенсоры для определения пенициллина на основе кондуктометрических планарных электродов и pH-чувствительных полевых транзисторов // Укр. биохим. журн.—1996.—68, № 1.—С. 26—31.
5. *Солдаткин А. П., Бубряк О. А., Стародуб Н. Ф. и др.* Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // Электрохимия.—1993.—29, № 3.—С. 315—319.
6. *Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Shul'ga A. A. et al.* Glucose-sensitive field-effect transistor with additional Nafion membrane. Reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range // Anal. chim. acta.—1993.—283.—P. 695—701.
7. *Солдаткин А. П., Сандровский А. К., Шульга А. А. и др.* Глюкозный биосенсор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. Зависимость отклика биосенсора от состава анализируемого раствора // Журн. аналит. химии.—1990.—45, № 7.—С. 1405—1409.
8. *Shul'ga A. A., Sandrovsky A. K., Strikha V. I. et al.* Overall characterization of ISFET-based glucose biosensor // Sensors and Actuators B.—1992.—10.—P. 41—46.
9. *Shul'ga A. A., Koudelka-Hep M., de Rooij N. F., Netchiporouk L. I.* Glucose sensitive enzyme field effect transistor using potassium ferricyanide as an oxidizing substrate // Anal. Chem.—1994.—66.—P. 205—210.
10. *Mascini M., Isannello M., Palleschi G.* Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics ob-

tained by binding enzymes to nylon nets // Analyt. chim. acta.—1983.—146.—P. 135—148.
11. Saito A., Miyamoto S., Kimura J., Kuriyama T. An ISFET glucose sensor for undiluted serum sample measurement // Sensors and Actuators B.—1991.—5.—P. 237—239.
12. *Shul'ga A. A., Strikha V. I., Soldatkin A. P. et al.* Removing the influence of buffer concentration on the response of enzyme field effect transistors by using additional membranes // Anal. chim. acta.—1993.—278.—P. 233—236.
13. *Varanasi S., Ogundiran S. O., Rukenstein R.* An algabraic equation for the steady-state response of enzyme-pH-electrodes and field effect transistors // Biosensors.—1988.—3.—P. 269—295.
14. *Хмелевский Ю. В., Усатенко О. К.* Основные биохимические константы в норме и патологии / Под ред. Р. А. Фролькиса.—Киев: Здоров'я, 1987.—160 с.
15. *Varebska A., Koter S., Kujawski W.* // Desalination.—1984.—51.—P. 3—11.

Надійшла до редакції 24.12.97