

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ**

Marta Bożewicz



**Praca magisterska
Potencjometryczne mikrosensory z zastosowaniem
ISFETów do monitorowania jonów
w układzie przepływowym**

wykonana pod kierunkiem

dr hab. Wojciecha Wróblewskiego

WARSZAWA 2003

**Gdybym mówił językami ludzi i aniołów,
a miłości bym nie miał,
stałbym się jak miedź brzęcząca albo cymbał brząca.
Gdybym też miał dar prorokowania
i znał wszystkie tajemnice,
i posiadał wszelką wiedzę,
i wiarę miał tak wielką, iżbym góry przenosił,
a miłości bym nie miał – byłbym niczym.**

Kor 13, 1-2

**Rodzicom, rodzinie, przyjaciołom,
Panu dr hab. Wojciechowi Wróblewskiemu,
Panu prof. dr hab. Zbigniewowi Brzózce,
Panu dr inż. Michałowi Chudemu,
Panu dr hab. Arturowi Dybko
dziękuję za wyrozumiałość, życzliwość i poświęcony czas.**

CEL PRACY

Skróty i wyrażenia dotyczące czujników chemicznych używane w pracy.....	4
---	---

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Tło historyczne FETów.....	5
2. Wstęp.....	6
3. Występowanie, wpływ jonów amonowych i azotanowych (V) na środowisko naturalne i organizm ludzki.....	7
4. Potencjometria.....	9
5. Miniaturyzacja elektrod.....	10
6. Technologia krzemowa (silikonowa).....	11
6.1. Półprzewodnikowe czujniki.....	11
6.1.1. MOSFET - Tranzystor unipolarny (polowy).....	12
6.1.2. ISFET – Jonoselektywny tranzystor polowy.....	13
6.1.3. MEMFET i CHEMFET.....	14
6.1.4. Biosensory oparte na FETach.....	15
7. Membrana w sensorach potencjometrycznych.....	16
7.1. Jonofor i sól lipofilowa (elektroaktywne składniki).....	17
7.2. Matryce polimerowe.....	20
8. Parametry pracy sensorów potencjometrycznych.....	22
8.1. Potencjał i selektywność.....	22
8.2. Czułość i dolna granica oznaczalności.....	24
8.3. Czas odpowiedzi.....	25
8.4. Powtarzalność i stabilność.....	25
8.5. Czas życia elektrody.....	25

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

9. Aparatura pomiarowa i oprogramowanie.....	26
10. Stosowane odczynniki.....	27
11. Przygotowanie podłoży CHEMFETów i nanoszenie membran.....	30
12. Metodyka pomiarów ISFETów i CHEMFETów.....	32
13. Pomiary ISFET jako sensorów pH.....	34
14. Pomiary CHEMFETów do oznaczania jonów azotanowych (V).....	37
15. Pomiary CHEMFETów do oznaczania jonów amonowych.....	43
16. Podsumowanie i wnioski końcowe.....	47
17. Spis literatury.....	49

CEL PRACY

Celem mojej pracy było opracowanie jonoczułych sensorów selektywnych na jony azotanowe (V) i amonowe przystosowanych do pracy w układzie przyływowym. Realizacja takiego celu wymagała przetestowania nowych przetworników z tylnym wyprowadzeniem kontaktów elektrycznych (ISFETów) wykonanych w Instytucie Technologii Elektronowej w Warszawie, jako sensorów pH. Kolejnym etapem była optymalizacja składników jonoselektywnych membran czułych na jony NH_4^+ i NO_3^- . Przewidziano również przetestowanie kilku materiałów polimerowych jako matryc membranowych pod kątem adhezji do podłoża ISFETów.

Skróty i wyrażenia dotyczące czujników chemicznych używane w pracy:

FET – tranzystor polowy (ang. Field - Effect Transistor)

MOSFET – tranzystor polowy z izolowaną bramką

(ang. Metal Oxide Semiconductor FET)

ISFET – jonoselektywny tranzystor polowy (ang. Ion - Selective FET)

MEMFET – tranzystor polowy z membraną (ang. Membrane FET)

CHEMFET – chemicznie modyfikowany tranzystor polowy

(ang. Chemically Modified Field Effect Transistor)

ENFET – enzymatycznie modyfikowany tranzystor polowy (ang. Enzyme FET)

IMFET – immunochemiczny tranzystor polowy (ang. Immuno-FET)

PenFET – enzymatycznie modyfikowany FET czuły na penicylinę

(ang. Penicillin-Sensitive FET)

Pd - MISFET – tranzystor polowy z bramką palladową

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Tło historyczne FETów

1822	Wydzielenie krzemu z krzemionki	Jons Berzelius
1897	Odkrycie elektronu	Joseph J. Thomson
1906	Elektroda szklana pH	M. Cremer
1907	Początek elektroniki - trioda	Lee De Forest
1925	FET - Patent	J. E. Lilienfeld
1956	Nagroda Nobla w dziedzinie półprzewodników - efekt tranzystorowy, realizacja i teoria złącza P-N i tranzystora złączonego BJT	J.Bardeen, W.Brattain, W.Shockley
1960	MOSFET	Dawon Kahng
1962	Elektroda enzymatyczna (idea)	Clark, Lyons
1966	Tworzenia kompleksów w komórce mitochondrialnej (wyjaśnienie mechanizmu)	Simon, Stefanac
1969	Elektroda jonoselektywna do oznaczania jonów azotanowych (V), (NO_3^-)	Dobbelstein, Diehl
1970	Elektroda jonoselektywna do oznaczania jonów amonowych (NH_4^+)	Cosgrove, Mask, Krull
1970	ISFET	Bergveld
1976	ENFET	Janata, Moss
1978	IMFET	J. F. Schenck
1983	Pierwsza międzynarodowa konferencja dotycząca czujników chemicznych	Japonia
1987	Nagroda Nobla w dziedzinie chemii -oddziaływania międzycząsteczkowe o wysokiej selektywności (syntetyzowali również pierwsze jonofory)	Pedersen, Lehn, Cram
1988	ISFETy z tylnym wyprowadzeniem kontaktów	de Rooij et al.
1991	Wydanie monografii „Chemical and Biochemical Sensors”	W. Gopel et al., VCH
1999	Produkcja ISFETow technologia CMOS (Complementary MOS)	Bausells et al.

2. Wstęp

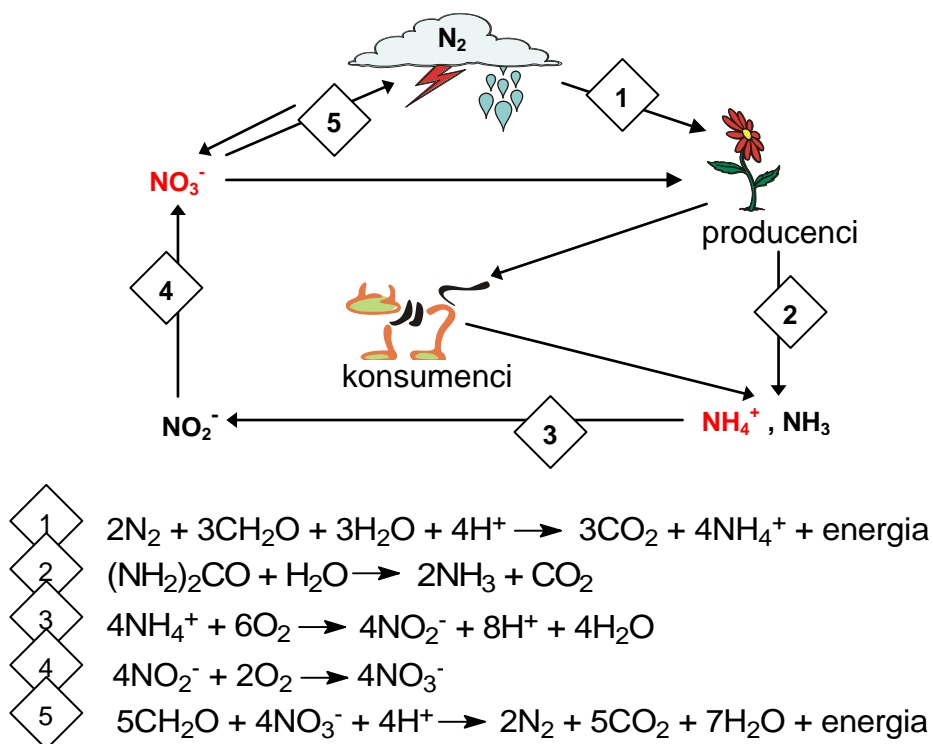
Na świecie nie istnieją siedliska ukształtowane wyłącznie przez prawa przyrody. Nawet w pozornie dziewiczych terenach jak Arktyka, stwierdzono obecność DDT (pod nazwą handlową AZOTOX) w tłuszczu fok [1]. XIX wiek był stuleciem przełomowym w intensywności korzystania z zasobów naturalnych i rozwoju techniki. W 1969 roku na forum Organizacji Narodów Zjednoczonych Sekretarz Generalny ONZ przedstawił raport, gdzie po raz pierwszy powiedziano głośno o kryzysie ekologicznym, który przybrał zasięg ogólnosiwiatowy. Kontrola stanu dóbr naturalnych jest zadaniem chemika analityka, który stoi przed wyborem precyzyjnej i taniej metody analitycznej. Poprawny wybór jest podstawą podejmowania wszelkich decyzji i działań w ochronie i kształtowaniu środowiska. Większość metod analitycznych to czasochłonne procedury analityczne, niektóre z nich nie mają wystarczającej czułości pozwalającej na oznaczanie bardzo małych stężeń w obecności dużej ilości związków przeszkadzających. Sensory potencjometryczne należą do grupy urządzeń analitycznych, które gwarantują szybkie wykonanie oznaczenia interesującego składnika w badanej próbce w obecności związków przeszkadzających. Charakteryzują się dokładnością, precyzją i umożliwiają:

- prowadzenie badań w terenie,
- wykonanie pomiaru w czasie rzeczywistym,
- miniaturyzacje urządzeń i analizę bardzo małych objętości próbek,
- selektywne oznaczanie danego składnika w obecności związków przeszkadzających,
- pominięcie etapów: pobrania, przygotowywania, przechowywania próbki,
- środowiskową, przemysłową i kliniczną kontrolę analityczną [2 - 6].

W ciągu ostatnich 30 lat ukazało się ponad 600 artykułów opisujących potencjometryczne sensory wykorzystujące tranzystory polowe do oznaczanie jonów wodorowych (ISFETy) i 150 prac poświęconych chemicznie i biologicznie modyfikowanym (CHEMFET, ENFET, IMFET) [7]. Rozwój różnych dziedzin nauki (mikroelektronika, inżynieria materiałowa i innych), umożliwił ich miniaturyzację i zastosowanie w przepływowych układach pomiarowych [8, 9].

3. Występowanie, wpływ jonów amonowych i azotanowych (V) na środowisko naturalne i organizm ludzki

Obieg energii i materii jest podstawą funkcjonowania ekosystemu. Dzięki cyklicznej przemianie związków azotowych zachowana jest równowaga między biosferą i atmosferą. Ziemska atmosfera składa się w 78% obj. azotu, który ulega cyklicznej przemianie biochemicznej. Jony azotanowe (V) powstałe w wyniku wyładowań atmosferycznych i w procesie nitryfikacji są podstawowym budulcem wielu struktur, wchodzą w skład białek i kwasów nukleinowych. Produktem rozkładu zwierząt i roślin (proces amonifikacji) są jony amonowe.



Rys. 1 Cykl biochemiczny azotu

Azotany nie wykorzystane przez rośliny mogą gromadzić się w glebie (np. złoża saletry chilijskiej, $NaNO_3$). Występowanie azotanów w wodach naturalnych pochodzi również ze ścieków komunalnych, przemysłowych i rolnictwa. Nawozy sztuczne stosowane w nadmiarze, wypłukane z wodami opadowymi przez opady atmosferyczne do rzek i jezior są przyczyną eutrofizacji. Na skutek nadmiaru azotanów (V) następuje gwałtowny rozwój glonów, prowadzący do nagromadzenia się nadmiernej ilości substancji organicznych i nadmiernego zużycia tlenu. Skutkiem tego procesu jest śnięcie ryb.

Nadmiar azotanów w organizmie ludzkim wywołuje sinicę u małych dzieci. W obecności tych jonów czerwony barwnik krwi – hemoglobina ulega utlenieniu do methemoglobiny, która zamiast jonów Fe^{2+} zawiera jony Fe^{3+} , uniemożliwiające łączenie się z tlenem. W tej postaci methemoglobina nie bierze udziału w jego transporcie do wszystkich komórek ciała.

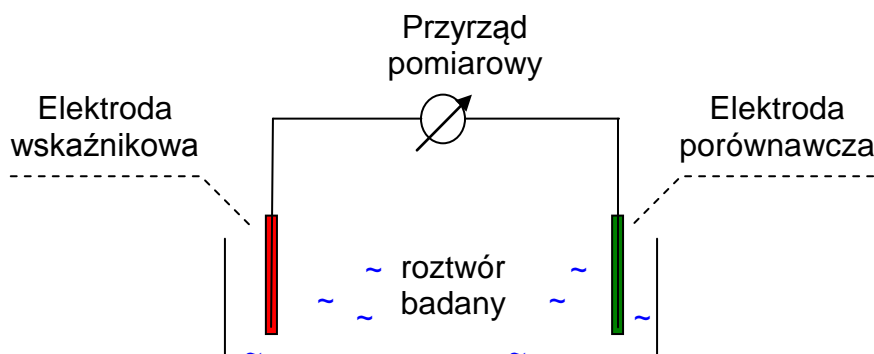
Jony amonowe powstałe w wyniku rozkładu zwierząt i roślin, podobnie jak glin, "konkurują" w glebie z pierwiastkami zasadowymi. Nadmiar azotu powoduje nadmierne rozrastanie koron drzew w porównaniu ze zbyt mało rozwiniętym systemem korzeniowym. Zredukowany system korzeniowy i rozbudowana korona sprawiają, że drzewa nie są wystarczająco silne, by oprzeć się mocniejszym porywom wiatru. Nadmiar azotu w glebie zmniejsza również odporność drzew na atak owadów i grzybów, a nawet mróz. Rośliny, pobierając jeden jon amonowy (NH_4^+) powodują uwolnienie jednego jonu H^+ . W ten sposób gatunki, które pobierają dużo jonów amonowych, na przykład świerk, zakwaszają glebę.

Ścieki przemysłowe (NH_4Cl – stosowany w suchych ogniwach, NH_4NO_3 jako składnik materiałów wybuchowych), intensywne rolnictwo (nawożenie pól $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), powodują przedostawanie się do środowiska naturalnego coraz większych ilości związków azotu. Norma Europejska dopuszcza maksymalną koncentrację jonów amonowych w rezerwatach przyrody 0,04 – 0,2 mg/L [10].

Wzajemne oddziaływania między powietrzem atmosferycznym, rzekami, jeziorami, glebą, oceanami, wodami podziemnymi, fauna i florą powodują, że zanieczyszczenia włączone są w obieg biogeochemiczny, zakłócając równowagę środowiska. Szkodliwości dla jednego elementu środowiska mogą pośrednio dotyczyć wielu innych, wobec czego ochrona dóbr naturalnych i jego kontrola musi być globalna. Z tych powodów konieczne jest szybkie i dokładne oznaczanie zawartości jonów amonowych i azotanowych (V) w środowisku naturalnym. Istotny jest wybór odpowiedniej metody, który pozwoliłby na ich oznaczenie w próbkach rzeczywistych, z pominięciem wstępnych etapów, co umożliwia potencjometryczne półprzewodnikowe czujniki.

4. Potencjometria

Potencjometria jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych w chemii analitycznej. Polega na pomiarze siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa składającego się z dwóch przewodników elektryczności (elektrod) zanurzonych w elektrolicie (przewodniku jonowym) w warunkach bezprądowych (Rys. 2).



Rys. 2 Schemat potencjometrycznego układu pomiarowego

Jedna z elektrod ma stały potencjał, jest obojętna względem oznaczanych jonów i nazywa się elektrodą porównawczą (odniesienia). Druga zaś jest elektrodą wskaźnikową, której potencjał zależy od zmian aktywności oznaczanego jonu (a_A) w roztworze badanym zgodnie z równaniem Nernsta:

$$E = E^\circ + 2,303 RT/zF \log a_A \quad (1)$$

E° – potencjał standardowy elektrody

R – stała gazowa $R = 8,31 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$

T – temperatura $T_{[K]} = t_{[^\circ\text{C}]} + 273,15$

z – liczba elektronów biorących udział w reakcji

F – stała Faradaya $F = 96485,31 \text{ C/mol}$

a_A – aktywność oznaczanego jonu

Za zmianę SEM ogniwa jest odpowiedzialna elektroda wskaźnikowa, którą może stanowić mikroelektroda jonoselektywna (sensor potencjometryczny) zawierająca dwa podstawowe elementy: warstwę receptorową i przetwornik. Część receptorowa ma za zadanie selektywnie „rozpoznać” oznaczany składnik i przekształcić informację chemiczną w formę

energii. Przetwornik wzmacnia i przekształca sygnał na parametr mierzalny fizycznie. Przetwornikami mogą być struktury półprzewodnikowe (np. tranzystory polowe) należące do grupy czujników elektrochemicznych.

5. Miniaturyzacja elektrod

Miniaturyzacja elektrod jest dążeniem do zmniejszania ich rozmiarów, ciężaru, zużywanej energii przy zwiększaniu niezawodności ich działania. Miniaturowe rozmiary umożliwiają umieszczenie elektrod w przenośnym systemie pomiarowym i pracy w terenie, otrzymując informacje o badanej próbce w czasie rzeczywistym. Możliwość konstrukcji coraz mniejszych czujników jest uzależniona od postępu technicznego.

Freiser na początku lat siedemdziesiątych zaproponował miniaturowe elektrody powlekane (CWEs – coated wire electrodes). Zaletą tego typu elektrod, w których jonoselektywna membrana jest bezpośrednio umieszczona na drucie metalicznym (Pt, Cu, Au, Ag) [11, 12] jest prosta konstrukcja oraz możliwość miniaturyzacji. Z powodu niestabilności potencjału [13] poszukiwano innych rozwiązań. Wykorzystując właściwości materiałów chemoczułych zaproponowano umieszczenie jonoselektywnej membrany na materiałach ceramicznych [14], tlenkach glinu, tantalu, hafnu, azotkach (krzemu i boru), węgla szklistym (GC), graficie sitodrukowanym (S-PG) [13] i innych [15, 16]. Wadą tak skonstruowanych elektrod była słaba adhezja membrany do podłoża. Zainteresowano się strukturami elektrolit - izolator - półprzewodnik (EIS – Electrolyte – Insulator - Semiconductor) [17, 18] wykorzystującymi technologię krzemową, a szczególnie tranzystorami polowymi (FET). Esashi i Matsuo badając pierwsze konstrukcje ISFETów w roztworze wodnym poruszyli problem hermetyzacji [19]. W 1999 roku Bausells et al. zaproponował produkcję ISFEów technologią CMOS (Complementary MOS) [20]. Później włączono także technologie SOS (Silicon On Sapphire - warstwa monokrystalicznego krzemu osadzona epitaksjalnie na podłożu szafirowym) i SOI (Silicon On Insulator - krzem na izolatorze). Kolejnym krokiem było opracowanie przez grupę de Rooij ISFETów z tylnym wyprowadzeniem kontaktów (back-side contact) [21, 22] co ułatwiło wprowadzenie tego typu czujnika do układu przepływowego [23].

6. Technologia krzemowa (silikonowa)

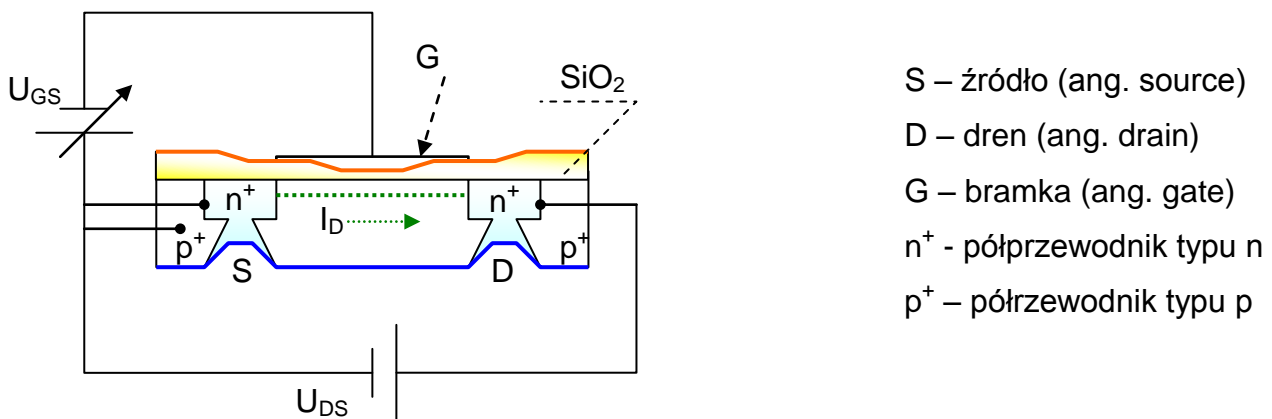
Krzem (silicon) wydzielił w 1822 roku Jons Berzelius z krzemionki (SiO_2), uważanej wówczas za pierwiastek. Krzemionka w różnych odmianach polimorficznych (kwarc, krystobalit, trydymit) oraz minerały krzemianowe stanowią większość skał tworzących skorupę ziemską. Związki krzemu z wodorem, tzw. krzemowodory (silany) i silikony (tworzywa krzemooorganiczne) znalazły zastosowanie jako materiały polimerowe w membranach elektrod jonoselektywnych. Krzemiany i krzemionka stanowią podstawowy surowiec przemysłu szklarskiego (naczynia laboratoryjne). Historię wykorzystania krzemu w konstrukcji różnych czujników opisuje Middelhoek [24]. Tranzystory krzemowe zostały wykonane po raz pierwszy przez Boba Noyce'a w zakładach Fairchild Semiconductors w 1961 roku.

6.1. Półprzewodnikowe czujniki

Kryształy krzemu jak również pierwiastki z IV grupy układu okresowego Mendelejewa (diament, german) są półprzewodnikami. W stanie czystym słabo przewodzą prąd elektryczny. Domieszkowane pierwiastkami z grupy V (arsenem, antymonem, bizmutem), posiadających nadmiar wolnych elektronów, półprzewodnik staje się materiałem typu n. Przy dodaniu domieszek pierwiastków z grupy III (glinu, galu, indu), z niedoborem elektronów, powstaje materiał typu p [25]. Najbardziej znanym przyrządem półprzewodnikowym jest tranzystor, zbudowany z kombinacji półprzewodników typu n (nośniki większościowe - elektrony) i p (nośniki większościowe - dziury). Opracowanie tranzystora bipolarnego w 1947 roku zapoczątkowało rewolucje w mikroelektronice. Tranzystory to mikroelektroniczne przyrządy półprzewodnikowe posiadające własność wzmacniania sygnału wejściowego. Urządzenia te działają na zasadzie sterowania przepływem ładunku. Tranzystory, w których decydującą rolę w przepływie prądu sterowanego biorą udział jedynie nośniki większościowe nazwano unipolarne, zaś w tranzystorach bipolarnych w przepływie prądu biorą udział zarówno elektrony, jak i dziury [26].

6.1.1. MOSFET - Tranzystor unipolarny (polowy)

Jednym z rodzajów tranzystorów unipolarnych jest tranzystor polowy z izolowaną bramką - MOSFET (Rys.3), w którym warstwę izolacyjną stanowi dwutlenek krzemu (SiO_2). Struktura MOSFET-u składa się z podłoża z półprzewodnika typu p, na którym naniesione są dwa obszary półprzewodnika silnie domieszkowanego typu n (S - źródło, D - dren). Znajdujący się między nimi półprzewodnik typu p pokryty jest izolacyjną warstwą, na którą naniesiona jest metalizacja bramki. Polaryzacja bramki (G) napięciem (U_{GS}) dodatnim powoduje przyciąganie elektronów z wnętrza półprzewodnika p i indukuje się kanał między obszarami półprzewodnika typu n [27].



Rys. 3 Schemat tranzystora polowego z izolowaną bramką (MOSFET)

Kanał ten stanowi ścieżkę przewodzącą między źródłem a drenem. Zmiana napięcia przyłożonego między bramką a źródłem (U_{GS}) steruje wielkością prądu płynącego w kanale (I_D – prądu drenu). Prąd płynie wówczas gdy napięcie U_{GS} przekroczy pewną wartość progową U_T (napięcie progowe). Wartość prądu płynącego w kanale (I_D – prąd drenu) od napięć polaryzujących opisuje wyrażenie (w zakresie liniowym):

$$I_D = \beta(U_{GS} - U_T)U_{DS} \quad (2)$$

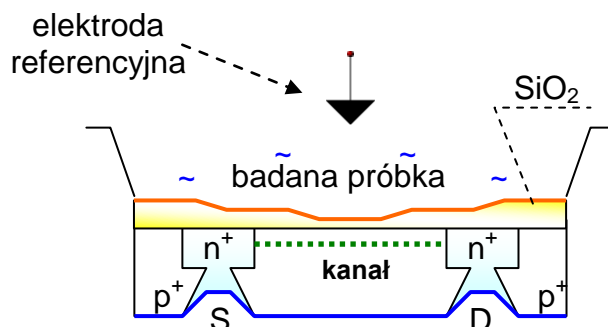
U_{GS} – napięcie przyłożone między bramką a źródłem

U_T – napięcie progowe

U_{DS} – napięcie przyłożone między drenem a źródłem

6.1.2. ISFET – jonoselektywny tranzystor polowy

Bergveld w 1970 roku zastąpił metaliczną bramkę w MOSFETach roztworem próbki kontaktującej się z warstwą izolacyjną (SiO_2) (Rys. 4). Zauważył pojawienie się potencjału na granicy faz: próbka/ SiO_2 w zależności od zmian pH badanej próbki [28].



Rys. 4 Schemat jonoselektywnego tranzystora polowego (ISFET)

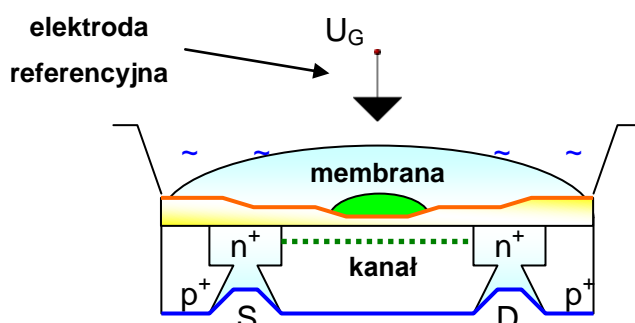
Przepływający prąd pomiędzy źródłem a drenem I_D uzależniony jest od powstałego potencjału na granicy faz roztwór/ SiO_2 , ale bezpośredni jego pomiar nie pozwala na oszacowanie wartości tego potencjału. Jednakże przy stałym, ściśle określonym potencjale U_{DS} zmiany potencjału na granicy faz roztwór/ SiO_2 mogą być kompensowane przeciwnymi wartościami potencjału U_{GS} przyłożonego do elektrody referencyjnej. Potencjał pomiędzy bramką a źródłem U_{GS} , będący wyjściowym sygnałem dziesięciokanałowego wzmacniacza sygnału czujników typu ISFET, określa wartość potencjału na granicy faz: roztwór/ SiO_2 .

Bergveld udowodnił, że ISFET jest elektronicznym elementem identycznym jak MOSFET i może być uważany jako elektroniczne urządzenie, z jedną dodatkową cechą: możliwością chemicznej regulacji napięcia progowego za pomocą zmian potencjału powierzchniowego na granicy faz: roztwór/ SiO_2 . Powstały potencjał wynika z chemicznych właściwości warstwy izolacyjnej (SiO_2), na powierzchni której w kontakcie z roztworem wodnym obecne są grupy hydroksylowe (HO^-), które mogą ulegać protonowaniu lub deprotonowaniu w zależności od jej kwasowości – czyli wykazują czułość na pH. Bergveld wyznaczył krzywe kalibracji ISFETów z różnymi rodzajami warstw izolacyjnych: SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 , Si_3N_4 i otrzymał najwyższe parametry pracy ISFETów zawierających Ta_2O_5 [7].

6.1.3. MEMFET i CHEMFET

MEMFET (Membrane FET) jest ISFETem zawierającym na powierzchni warstwy izolacyjnej (np. SiO_2) jonoselektywną membranę. Pierwszy MEMFET czuły na jony K^+ opracowano w roku 1983 [29]. Wadą tak zaprojektowanych sensorów był problem źle zdefiniowanej termodynamicznie granicy faz: membrana/przetwornik i wrażliwość na zmiany pH, a więc także na zmiany zawartości dwutlenku węgla w badanej próbce. W związku z powyższymi wadami MEMFETy charakteryzowały się niezadowalającymi parametrami pracy.

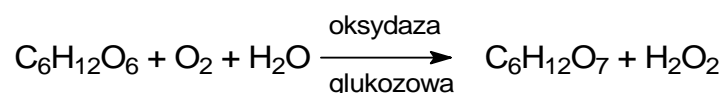
Chemicznie modyfikowany tranzystor polowy (CHEMFET) (Rys.5) stanowi rozwiązanie wyżej wymienionych trudności. Pomiędzy FETem a membraną zastosowano pośrednią warstwę hydrożelu (pHEMA) zawierającą roztwór o stałej sile jonowej (np. bufor pH). W celu chemicznego związania hydrożelu powierzchni ISFETA zmodyfikowano poprzez wprowadzenie grup metakrylanowych (proces silanizacji). Następnie nałożenie roztworu monomeru hydroksyetylometakrylanu (HEMA) i jego spolimeryzowanie światłem UV w obecności fotoinicjatora pozwoliło na kowalencyjne związanie warstwy z podłożem. Metoda taka korzystna jest przy masowej produkcji CHEMFETów, wykorzystującej głównie proces fotolitografii. Dzięki takiemu rozwiązaniu wyeliminowano wrażliwość czujnika na zmiany pH zapewniając stabilność sygnału elektrody podczas dyfuzji jonów i dwutlenku węgla. Na tak zmodyfikowane podłoże nałożono jonoczułą membranę i dzięki temu uzyskano tranzystory polowe czułe na inne jony niż na H^+ . Opracowano i opublikowano wiele rodzajów CHEMFETów czułych na kationy: NH_4^+ , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Cu^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cs^+ [3, 6, 30-36], i aniony: NO_3^- , ClO_4^- , H_2PO_4^- , F^- , NO_2^- [30-41].



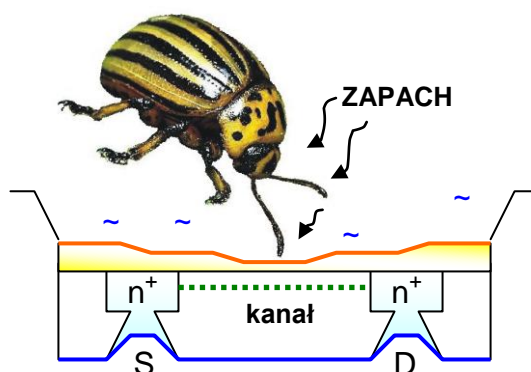
Rys. 5 Schemat chemicznie modyfikowanego tranzystora polowego (CHEMFET)

6.1.4. Biosensory oparte na FETach

Biosensory to czujniki zawierające w części receptorowej biologicznie aktywne materiały (enzymy, przeciwciała, mikroorganizmy, tkanki zwierzęce). Pierwszy bioczujnik wykorzystujący tranzystor polowy (BioFET) jako przetwornik zaproponowali w 1976 Janata i Moss [42], zaś cztery lata później Caras i Janata [43] wykonali BioFET. Zmodyfikowany enzymatycznie PenFET zawiera enzym (β -laktamazę) w membranie katalizując reakcję hydrolizy penicyliny [44]. Biosensor glukozy zawiera oksydazę glukozową, która katalizuje utlenianie jednej z form glukozy (β -D-glukopiranozę) [45].



IMFETy wykorzystują zjawisko odwracalnego wzajemnego oddziaływania przeciwciał immobilizowanych na powierzchni FETa z antygenami obecnymi w roztworze próbki. Przykładem tego typu sensora jest IMFET do oznaczania jadu pochodzącego ze szczątek niemrawca prążkowanego (*Bungarus multicinctus*) [46]. Zwłoki jadowitego węża są powodem wielu ofiar ludzkich i zwierząt w kontynentach tropikalnych i podzwrotnikowych. Schöning wraz ze współpracownikami zaproponowali BioFET wykorzystując chemoreceptorowe organy (czułka) stonki ziemniaczanej do oznaczania zapachowych substancji organicznych [47] (Rys.6). Czujniki tego typu mogą znaleźć zastosowanie w rolnictwie (pola ziemniaczane, bawełny), wykrywając szkodniki roślin, co pozwala na szybkie zapobieganie (zastosowanie pestycydów) przed zniszczeniem upraw.



Rys. 6 Schemat BioFETu zawierający czułka stonki ziemniaczanej

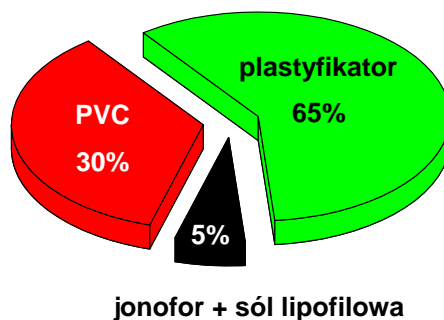
BioFETy dzięki specyfiki reakcji biochemicznej, mogą być stosowane w diagnostyce medycznej, w kontroli i analizie leków farmaceutycznych, kontroli żywności [48], w analizie fermentacji bulionu [49].

7. Membrana w sensorach potencjometrycznych

W 1906 roku Cremer zaproponował pierwszą membranę stałą czuła na jony wodorowe (elektroda szklana pH) [50]. Na powierzchni szkła glinokrzemianowego w kontakcie z roztworem wodnym powstaje grupa anionowa Al-O-Si-O^- , która łączy się z jonami H^+ za pośrednictwem pary elektronowej tlenu i powstaje różnica potencjałów, po ustaleniu której liczba jonów wodorowych wnikających w szkło jest równa liczbie jonów metalu alkalicznego opuszczającego szkło. Te właściwości materiałów chemoczułych (np. szkła glinokrzemianowe, borokrzemianowe, Al_2O_3 , Ta_2O_5 , Si_3N_4) wykorzystano do projektowania stałych membran. Ze względu na rodzaj zastosowanego materiału membrany, można je podzielić na następujące typy:

- membrany stałe nieorganiczne (szklane i krystaliczne),
- membrany ciekłe zawierające elektroaktywne związki,
- membrany ciekłe polimerycznie plastyfikowane,
- membrany ciekłe polimeryczne.

Typowa polimerowa membrana ciekła zawiera obojętny lub obdarzony ładunkiem jonofor, który selektywnie i odwracalnie kompleksuje jony, soli lipofilowej oraz matrycy np. plastyfikowany PVC (Rys. 7).



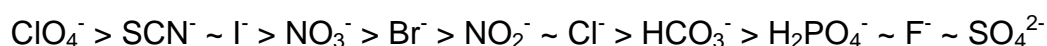
Rys. 7 Przykładowy skład ciekłej membrany polimerowej

Membrana jonoselektywna nałożona na powierzchnię przetwornika zapewnia selektywną wymianę jonów między membraną a badanym roztworem. Membrany ciekłe mogą być nakropione automatyczną pipetą w warunkach laboratoryjnych bądź przy masowej produkcji techniką sitodruku.

7.1. Jonofor i sól lipofilowa (elektroaktywne składniki)

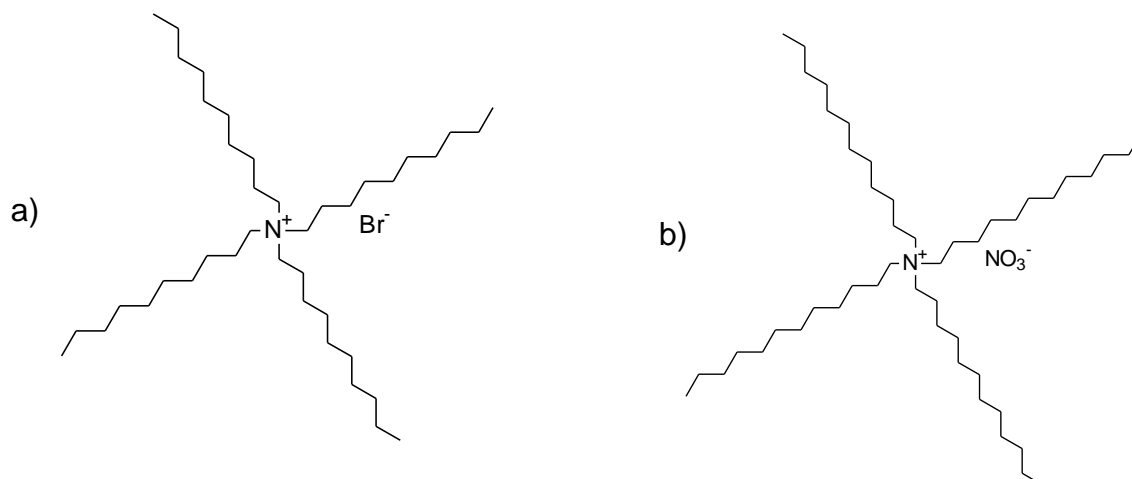
W roku 1966 Simon i Stefanac [51 - 53] wyjaśnili mechanizm selektywnego kompleksowania antybiotyków z kationami zawartymi w matrycy mitochondrialnej. Umożliwiło to projektowanie ciekłych membran, w których podstawowym składnikiem odpowiedzialnym za selektywność i inne parametry pracy czujnika jest jonofor. Obojętny lub obdarzony ładunkiem związek tworzy labilny kompleks z oznaczanym jonem i transportuje go z fazy wodnej do hydrofobowej fazy membrany. Jonofor powinien posiadać właściwości lipofilowe czyli wyższe powinowactwo do fazy organicznej (membrany) niż do fazy wodnej (badanej próbki), aby zapewnić stabilną odpowiedź sensora oraz jego trwałość.

Pierwszymi naturalnymi jonoforami były antybiotyki (walinomycyna i gramicydyna) stosowane w sensorach selektywnych na jony potasowe (K^+) [54]. Późniejszy rozwój nauki umożliwił syntetyzowanie pierwszych jonoforów przez Pedersena et al. [55-57]. Najprostsze naładowane jonofory to wymiennicze jonowe (np. lipofilowe sole amoniowe), które tworzą pary jonowe z oznaczanym jonem (Rys.8). Jonowa selektywność membrany zawierającej wymiennicze jonowe w stosunku od anionów lipofilowych (np. ClO_4^-) względem hydrofilowych (wysoka energia hydratacji) określana jest szeregiem Hofmistera [40]:



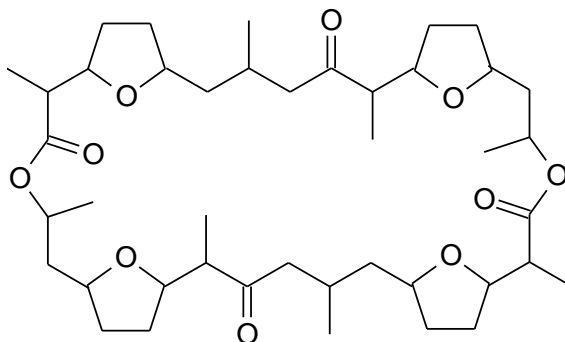
aniony hydrofilowe

Nielsen i Hansen [58] zauważyli wpływ symetrii i długość łańcuchów alifatycznych soli aminiowych na selektywność membran. Sole amoniowe z długimi podstawnikami alkilowymi (TDDAN) podwyższały selektywność membran czułych na jony NO_3^- .



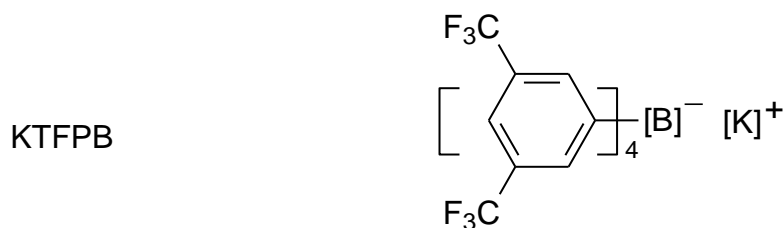
Rys. 8 Wzory strukturalne jonoforów a) bromek tetradeocyloamoniowy (TDAB),
b) azotan tetradeocyloamoniowy (TDDAN)

Jonoforami mogą być nie tylko związki obdarzone ładunkiem ale również związki obojętne. Przykładem jest nonaktyna [59] (Rys.9) wykorzystywana w projektowaniu membran w elektrodach czułych na jony amonowe (NH_4^+) i walinomycyna kompleksująca jony K^+ .



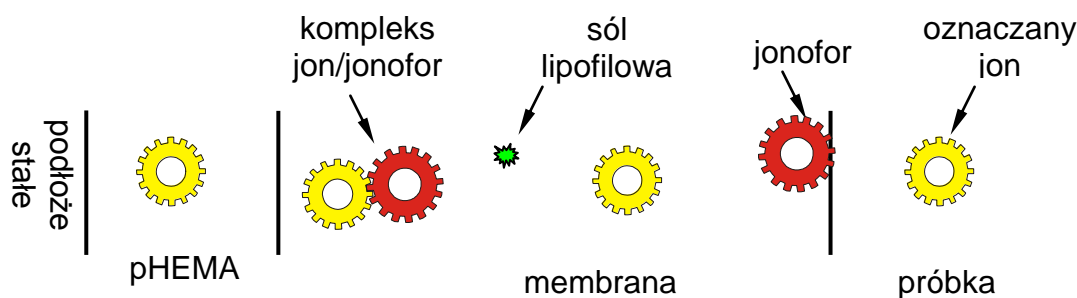
Rys. 9 Wzór strukturalny nonaktyny

Membrana zawierająca obojętne jonofory np. nonaktynę czy walinomycynę wymaga dodatku soli lipofilowej (np. KTFPB) (Rys. 10), która zapewni elektroobojętność warstwy. Dodatek soli również stabilizuje powstający kompleks w membranie i skraca czas odpowiedzi sensora [60].



Rys. 10 Wzór strukturalny tetra[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]boran potasu

Optymalna zawartość soli lipofilowej uzależniona jest od stechiometrii powstałych w membranie kompleksów i ładunków kompleksowanych jonów. W membranie sensora czułego na jon jednoładunkowy (przy stechiometrii powstającego kompleksu jon/jonofor w membranie 1:1) to 50% molowych w stosunku do jonoforu (Rys. 11).



Rys. 11 Schemat mechanizmu kompleksowania jon – jonofor z solą lipofilową w membranie zanurzonej w roztworze badanym

W takim przypadku w membranie będącej w kontakcie z roztworem wodnym zawierającym oznaczany jon ustala się równowaga, według której stężenie wolnego jonoforu (L) równe jest stężeniu kompleksu jon/jonofor (Lc_i). Jeżeli reakcja kompleksowania jonu przez jonofor w membranie opisywana jest stałą (K):

$$K = \frac{Lc_i}{L \cdot c_i}$$

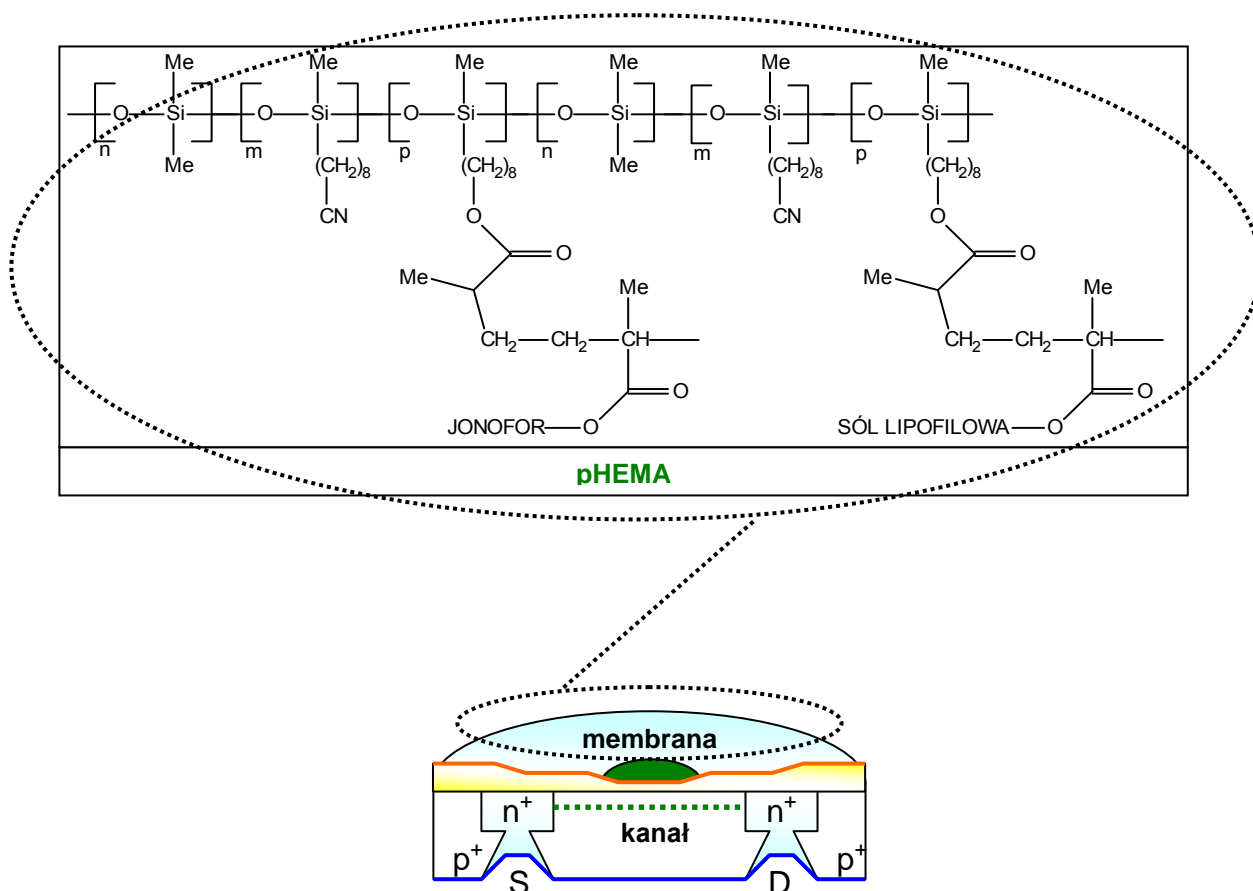
to $K = 1/c_i$. Wtedy stężenie wolnego jonu (i) w membranie jest stałe, a potencjał membrany jest funkcją jedynie stężenia jonu oznaczanego w roztworze (teoretyczna odpowiedź sensora) [40].

7.2 Matryce polimerowe

Najczęściej stosowanym materiałem polimerowym (wypełniaczem) w membranie jonoselektywnej, jest poli(chlorek winylu). Monomer, czyli chlorek winylu, otrzymany w 1835 roku przez Viktora Regnaulta został spolimeryzowany 37 lat później przez Baummana. PVC jest najstarszym tworzywem sztucznym. Ze względu na tak wysoką temperaturę zeszklenia ($T_g=80^{\circ}\text{C}$) wymaga dodatku plastyfikatora (rozpuszczalnika organicznego) w membranie w ilości 60-70%. Matryce z plastyfikowanego PVC wyróżniają się:

- dobrą rozpuszczalnością obojętnego nośnika,
- prostotą przygotowania membran,
- łatwą dostępnością.

Pomimo wielu zalet, modyfikacji PVC grupami HO- , $\text{CH}_3\text{COO-}$ [61, 62], elektrody tracą swoją aktywność w ciągu kilku miesięcy. Jest to spowodowane wymywaniem plastyfikatora i elektroaktywnych składników z membrany do kontaktującego się z nią roztworu wodnego [63]. Krótki czas życia CHEMFETów z matrycą z PVC wynikający z niedostatecznej adhezji PVC do bramki izolatora wymusił poszukiwania innych syntetycznych związków makrocząsteczkowych. Jedną z propozycji to zastosowanie fotopolimerów [64, 65]. Technika fotopolimeryzacji, osadzanie ukształtowanej membrany na stałych przetwornikach jest łatwo do zautomatyzowania i używana do komercyjnych multieczułych urządzeń. Testowano poliakrylan [14], poliuretany [3, 6], polistyren [66], poliiimidy [67] silopren [34], polisiloksan [30, 68]. Za najlepsze uznano membrany polisiloksanowe jako polimerowe matryce membran jonoselektywnych. Nie wymagają dodatku plastyfikatora ze względu na ich małą temperaturę zeszklenia ($T_g \leq -110^{\circ}\text{C}$) [69]. Monomery użyte do otrzymywania tych polimerów posiadają reaktywne grupy, poprzez które można dowiązać składniki elektroaktywne do łańcucha polimerowego [68, 70-72]. Obecność grup cyjanopropylowych w polisiloksanie wzmacnia polarność membran zmniejszając oporności membran (10 - 50 razy), zaś grupy metakryloksylowe umożliwiają kowalencyjne wiązanie membrany do powierzchni przetwornika (lub pośredniej warstwy hydrożelu). Inną ważną zaletą grup metakryloksylowych w polisiloksanie jest możliwość kowalencyjnego łączenia składników elektroaktywnych, dzięki czemu rozwiązany jest problem wymywania.



Rys. 12 Schemat CHEMFETu z membraną polisiloksanową z chemicznie dowiązanymi składnikami elektroaktywnymi

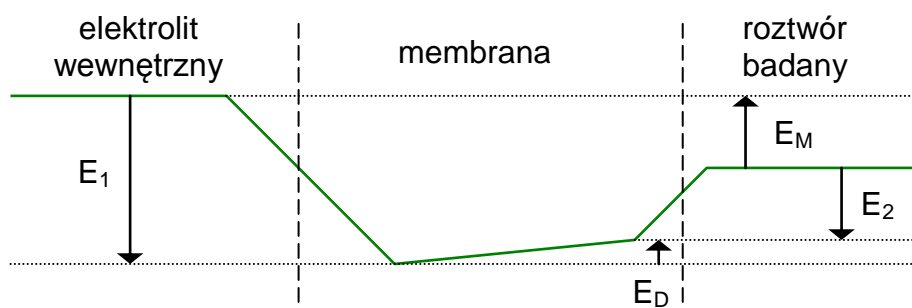
Lugtenberg et al. [72] dowiedli, że CHEMFETy selektywne na Na⁺, K⁺ i Cs⁺ z kowalencyjnie związanymi składnikami elektroaktywnymi w membranach polisiloksanowych wykazują odpowiedzi nernstowskie, zaś dla jonów dwuwartościowych (np. Pb²⁺) przyłączenie kowalencyjne boranu w membranie prowadzi do zaniku czułości mikrosensorów.

8. Parametry pracy sensorów potencjometrycznych

8.1. Potencjał i selektywność

Potencjał membrany sensora potencjometrycznego, opisany równaniem (4), składa się z dwóch potencjałów międzyfazowych na granicy faz (E_1 , E_2) i potencjału dyfuzyjnego (E_D) wynikającego z procesów zachodzących wewnątrz membrany [73] (Rys. 13).

$$E_M = E_1 - E_2 - E_D \quad (4)$$



Rys. 13 Schemat składowych potencjałów membrany E_M

Potencjał utworzony na granicy faz: membrana/próbka (E_2) zmienia się wraz ze zmianą stężenia jonu głównego w roztworze badanym, zaś E_1 jest stały przy założeniu, że skład elektrolitu wewnętrznego jest niezmienny. Potencjał dyfuzyjny E_D jest pomijalny, przy założeniu, że jest stały w czasie. Tak więc wartość potencjału membrany równa jest wartości różnicy potencjałów na granicy faz: membrana/roztwór badany. W stanie równowagi i przy założeniu, że stężenie wolnego jonoforu równe jest stężeniu kompleksu jon/jonofor w membranie, wartość potencjału membrany przedstawia równanie Nernsta:

$$E_M = E^\circ + \frac{RT}{z_A F} \ln a_A \quad (5)$$

E° - standardowy potencjał elektrody

R - stała gazowa $R = 8,31 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$

T - temperatura $T_{[K]} = t_{[^\circ\text{C}]} + 273,15$

z_A - ładunek jonu głównego (A)

F - stała Faradaya $F = 96485,31 \text{ C/mol}$

a_A - aktywność jonu głównego (A)

Jeżeli w roztworze obecny jest drugi jon (B) stosuje się półempiryczne równanie Nikolskiego-Eisenmanna, które uwzględnia wpływ aktywności tego jonu na potencjał elektrody poprzez współczynnik selektywności $K_{A,B}^{\text{Pot}}$ będący miarą selektywności elektrody jonoselektywnej:

$$E_M = E^\circ + RT/z_A F \ln(a_A + K_{A,B}^{\text{Pot}} a_B^{z_A/z_B}) = E^\circ + 2,303RT/z_A F \log(a_A + K_{A,B}^{\text{Pot}} a_B^{z_A/z_B})$$

a_B – aktywność jonu przeszkadzającego

z_B – ładunek jonu przeszkadzającego

$K_{A,B}^{\text{Pot}}$ – potencjometryczny współczynnik selektywności

Wartość liczbowa współczynnika selektywności mówi ile razy silniej dana elektroda reaguje zmianą potencjału na obecność jonu głównego (A), w porównaniu z jonem zakłócającym (B). Mała wartość $K_{A,B}^{\text{Pot}}$ oznacza dużą czułość elektrody dla oznaczanego jonu głównego (A) w obecności jonu (B). Jeżeli wartość ta jest równa jedności oznacza to, że elektroda nie wykazuje selektywności.

W 1976 roku IUPAC zarekomendował dwie metody do wyznaczania potencjometrycznych współczynników selektywności [74]:

➤ **SSM** (ang. separate solution method) – metoda roztworów rozdzielonych.

Polega na pomiarze potencjału sensora względem elektrody odniesienia, zanurzonych w roztworze zawierającym tylko jony główne (A),

$$E_A = E^\circ + RT/z_A F \ln a_A \quad (7)$$

a następnie pomiarze w roztworze zawierającym tylko jony przeszkadzające:

$$E_B = E^\circ + RT/z_A F \ln(K_{A,B}^{\text{Pot}} a_B^{z_A/z_B}) \quad (8)$$

Różnica równań (8) i (7) pozwala na obliczenie wartości potencjometrycznego współczynnika selektywności na jon (B) względem jonu głównego (A).

$$\log K_{A,B}^{\text{Pot}} = (E_B - E_A) z_A F / RT \ln 10 + (1 - z_A/z_B) \ln a_A \quad (9)$$

$$K_{A,B}^{\text{Pot}} = a_A^{(1-z_A/z_B)} e^{(E_B - E_A) z_A F / (RT)}$$

Warunkiem zastosowania tej metody jest nerstowska odpowiedź elektrody na zmiany aktywności zarówno jonu głównego jak i przeszkadzającego.

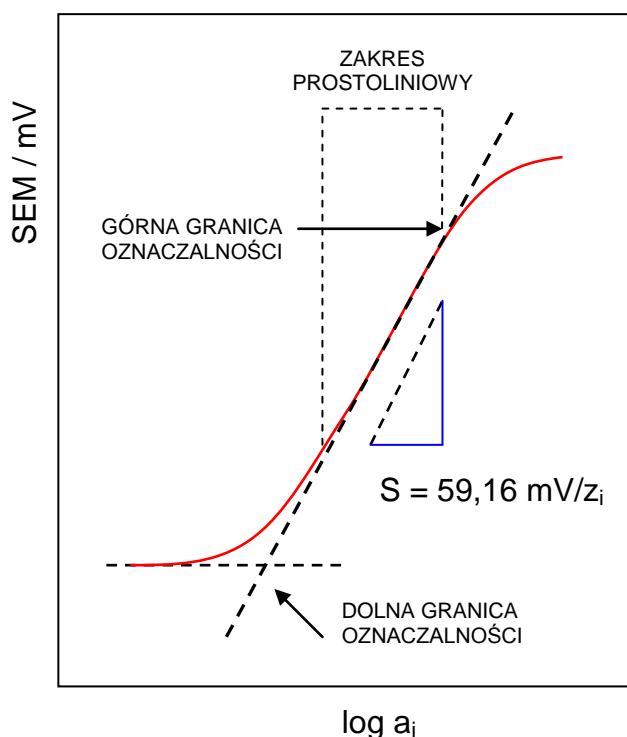
- **FIM** (ang. fixed interference method) – metoda roztworów mieszanych.

W tej metodzie zależność potencjału od logarytmu zmiany aktywności jonu głównego (a_A) jest rejestrowana miareczkując roztwór o znanej aktywności jonu przeszkadzającego (a_B) roztworem jonu głównego. Następnie metodą graficzną wyznacza się dolną granicę oznaczalności zakładając, że sygnał sensora na granicy oznaczalności pochodzi jedynie od jonów przeszkadzających (B), a w części Nerstowskiej tylko od jonów głównych (A), a w punkcie przecięcia obu prostych ($\log a_A$) $E_A = E_B$:

$$\log K_{A,B}^{\text{Pot}} = \log a_A - z_A/z_B \log a_B \quad (10)$$

8.2. Czulość i dolna granica oznaczalności

Sygnałem pomiarowym (odpowiedzi) czujnika jest krzywa kalibracji przedstawiająca zależność siły elektromotorycznej ogniwa od logarytmu aktywności badanego jonu (Rys.14). Krzywa kalibracji ma w pewnym zakresie przebieg prostoliniowy zwany również zakresem odpowiedzi elektrody. Nachylenie odcinka prostoliniowego (S) krzywej kalibracji, jest miarą czulości elektrody i w idealnym przypadku zgodnie z równaniem Nernsta (1) w temperaturze 25°C, dla jonów jednowartościowych zmiana potencjału powinna wynosić 59,16 mV, a dla jonów dwuwartościowych 29,58 mV. Najmniejsze stężenie substancji wywołujące zmianę sygnału pomiarowego nazywa się dolną granicą oznaczalności (dolny limit detekcji).



Rys. 14 Przykładowa krzywa odpowiedzi dla elektrody kationoselektywnej

8.3. Czas odpowiedzi

Czas odpowiedzi jest definiowany według IUPAC jako czas potrzebny do ustabilizowania potencjału ogniwa w granicach 1 mV lub kiedy sygnał osiągnie 95% jego wartości końcowej ($t_{95\%}$), po umieszczeniu w badanym roztworze ogniwa pomiarowego.

8.4. Powtarzalność i stabilność

Powtarzalność określana jest jako wartość odchylenia standardowego wyrażania w jednostkach potencjału, dla wielokrotnych pomiarów sensora w roztworze o znanej aktywności jonu głównego. Natomiast stabilność, inaczej dryft sygnału pomiarowego, wyrażana jest przez zmienność potencjału w czasie po zanurzeniu elektrody w roztworze o określonym stężeniu jonu głównego.

8.5. Czas życia elektrody

Czas życia określa okres czasu poprawnie działającego sensora z zaznaczeniem trybu stosowania (przechowywanie, w użyciu) [75]. Podstawowym czynnikiem warunkującym długie funkcjonowanie CHEMFETów jest dostateczna adhezja polimerycznej membrany do podłoża ISFETów. Matryce polimerowe zawierające PVC słabo przylegają do podłoża co powoduje penetrację wody pod membranę i w konsekwencji jej odklejenie. Udowodniono, że membrany zawierające fotopolimery (np. polisiloksan, silopren) poprzez kowalencyjne dowiązanie matrycy do podłoża, jak również poprzez immobilizację składników elektroaktywnych (jonoforu, soli lipofilowej) do tych polimerów, przedłuża czas funkcjonowania takich czujników [3, 6, 14, 30, 34, 64 - 72]. Zwykle czas życia CHEMFETów określany jest po kilkumiesięcznych testach (od 3 do 6 miesięcy).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

9. Aparatura pomiarowa i oprogramowanie

Aparatura pomiarowa

- podłoża czujników typu ISFET
- elektroda odniesienia Ag/AgCl
- układ przepływowy
- dziesięciokanałowy wzmacniacz sygnału czujników typu ISFET
- automatyczne biurety
- pompa perystaltyczna z wymiennymi głowicami
- mieszadło magnetyczne
- lampa UV
- komora polimeryzacyjna
- butla z gazem obojętnym
- mikroskop z kamerą CCD
- waga analityczna
- szklana elektroda pH-metryczna

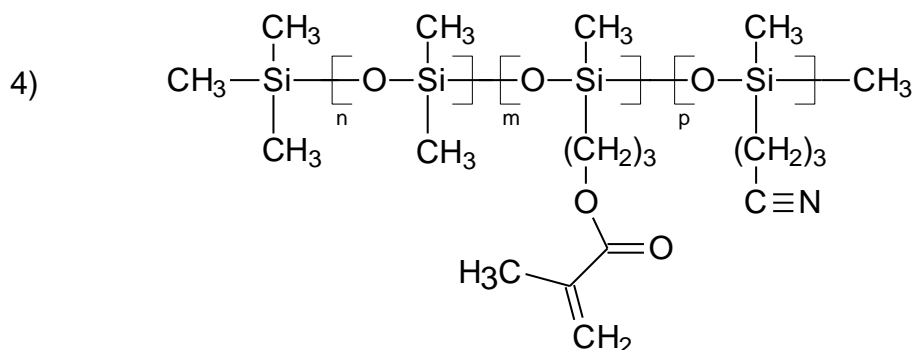
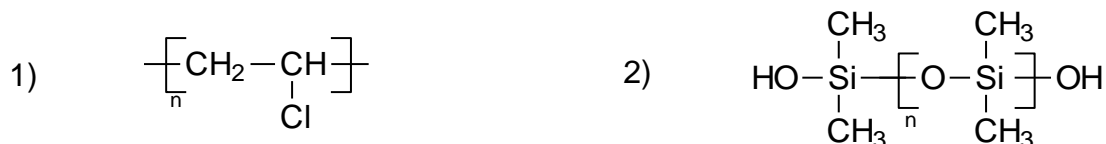
Oprogramowanie

- komputer kompatybilny z IBM PC
- karta do akwizycji danych pomiarowych PCL 818L
- programy sterujące pracą systemów pomiarowych:
 - VISIDAQ[®]
 - LabView[®]
- Programy do opracowywania wyników pomiarowych:
 - Microcal Origin v. 6.0
- Inne programy używane do pisania pracy:
 - Microsoft Word
 - ChemWindow
 - CorelDRAW 7

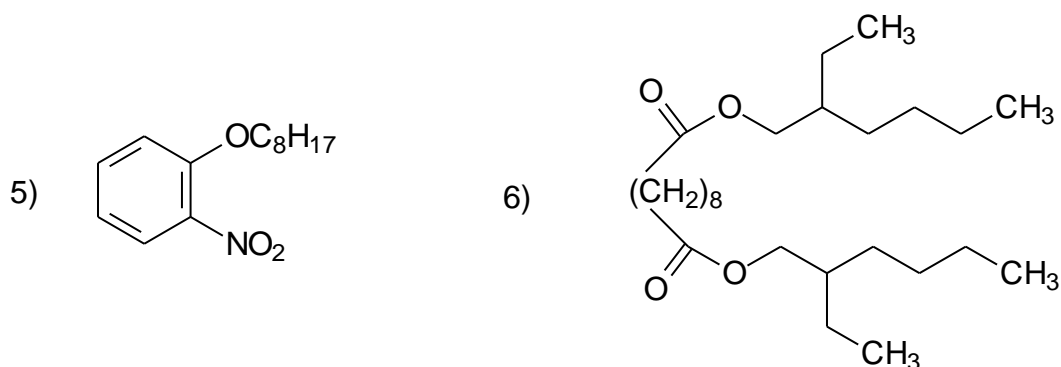
10. Stosowane odczynniki

Składniki membran

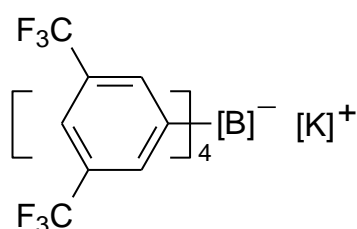
- materiały polimerowe: 1) polichlorek winylu (PVC), 2) Silopren K 1000 (polidimetylosiloksan z terminalnymi grupami silanowymi), 3) odczynnik sieciujący (K 11), 4) Polisiloksan PSX 851



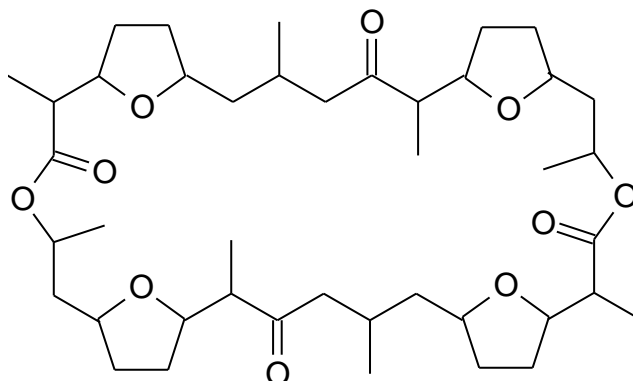
- plastyfikatory: 5) eter o-nitrofenylooktylowy (o-NPOE), 6) sebacynian bis(2-etyloheksylu) (DOS)



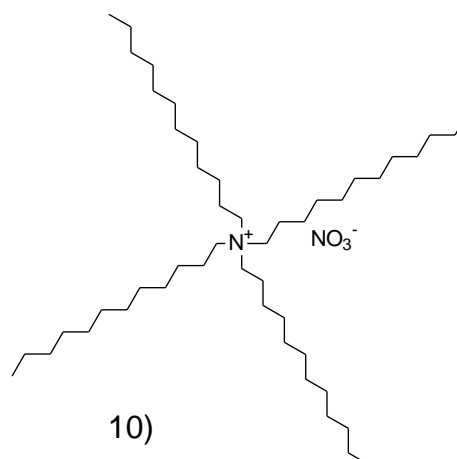
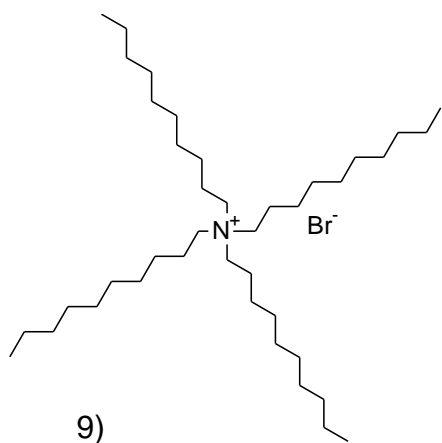
- sole lipofilowe: 7) tetra[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]boran potasu (KTFPB)



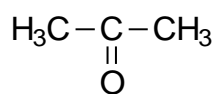
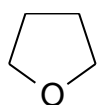
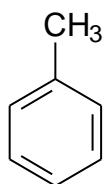
- jonofory: 8) nonaktyna



- czwartorzędowe sole amoniowe: 9) bromek tetradecyloamoniowy (TDAB),
10) azotan tetradodecyloamoniowy (TDDAN)



- rozpuszczalniki organiczne: 11) toluen 12) tetrahydrofuran (THF), 13) aceton
14) metanol, 15) etanol

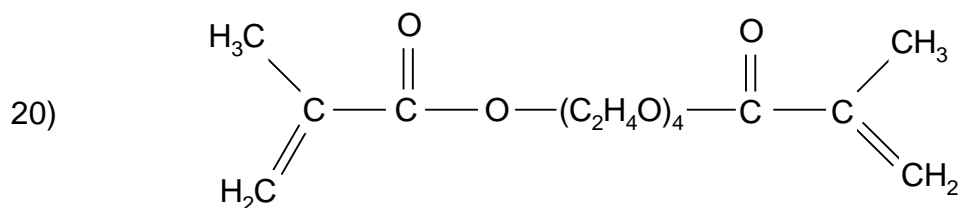
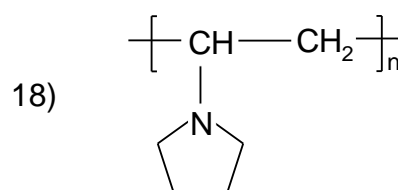
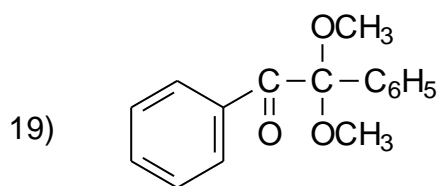
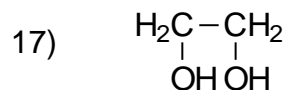
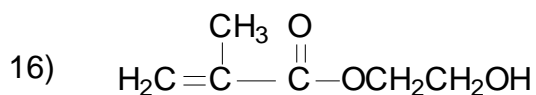


14) CH₃OH

15) C₂H₅OH

Składniki pHEMA

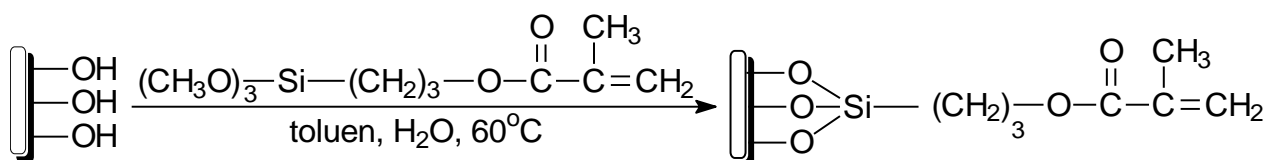
- 16) metakrylan 2-hydroksyetylu (HEMA), 17) glikol etylenowy (EG),
 18) poliwinylpiperolidyna (PVP), 19) 2,2-dimetoksyfenyloacetofenon (DMPAP),
 20) dimetakrylan glikolu tetraetylenowego (TEGDMA)

Związki nieorganiczne

- NaOH (wodorotlenek sodu)
- HCl (kwas solny)
- NaCl (chlorek sodu)
- Na₂SO₄ (siarczan sodu)
- NaNO₃ (azotan sodu)
- NH₄NO₃ (azotan amonu)
- LiNO₃ (azotan litu)
- Mg(NO₃)₂ (azotan magnezu)
- KNO₃ (azotan potasu)
- NaH₂PO₄ (dwuwodoroortofosforan sodu)
- NaClO₄ (nadchloran sodu)
- bufony (pH = 4, pH = 7, pH = 9)

11. Przygotowanie podłoży CHEMFETów i nanoszenie membran

Powierzchnie ISFETów odtłuszczono przemywając acetonem i metanolem. Następnie poddano procesowi silanizacji w celu uaktywnienia grup hydroksylowych (-OH) powstałych w wyniku kontaktu warstwy izolacyjnej ISFETa (dwutlenku krzemu) z wodą i wprowadzenia grup metakrylanowych (Rys. 15). Czujniki wraz z mieszaniną (8,95mL toluen, 1mL metakrylan 3-(trimetoksysilylo)propylu, 50μL demineralizowana woda) umieszczono w kolbie stożkowej z zamontowaną chłodnicą zwrotną. Układ ogrzewano przez 1h w temperaturze 60°C kilkakrotnie mieszając.



Rys. 15 Schemat procesu silanizacji powierzchni ISFETa

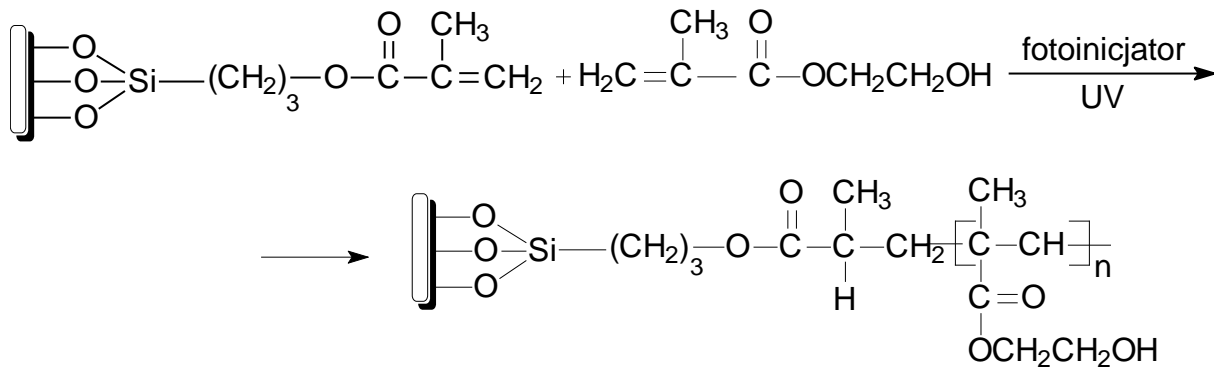
Chemiczny etap (silanizację) wprowadzono w celu kowalencyjnego związania pośredniej warstwy hydrożelu (pHEMA), stanowiącej zbuforowany roztwór elektrolitu wewnętrznego z powierzchnią czujnika. Na tak przygotowane podłoże nakroplono kapilarą 1 μL roztworu o składzie przedstawionym w Tab. 1.

Składniki hydrożelu		Ilość [mg]
HEMA	metakrylan 2-hydroksyetylu	601,1
EG	glikol etylenowy	371
DMAP	2,2-dimetoksyfenoacetofenon	11,2
PVP	poliwinylopirolidyna	9,3
TEGDM	dimetakrylan glikolu tetraetylenowego	10

Tab. 1. Skład mieszaniny hydrożelu

Następnie elektrody umieszczono w komorze polimeryzacyjnej z laminarnym przepływem gazu obojętnego (N₂) i po 10 min. naświetlano promieniowaniem UV (λ=254nm) przez 3 min. Po zainicjowaniu fotopolimeryzacji pozostawiono czujniki przez 3,5h w komorze

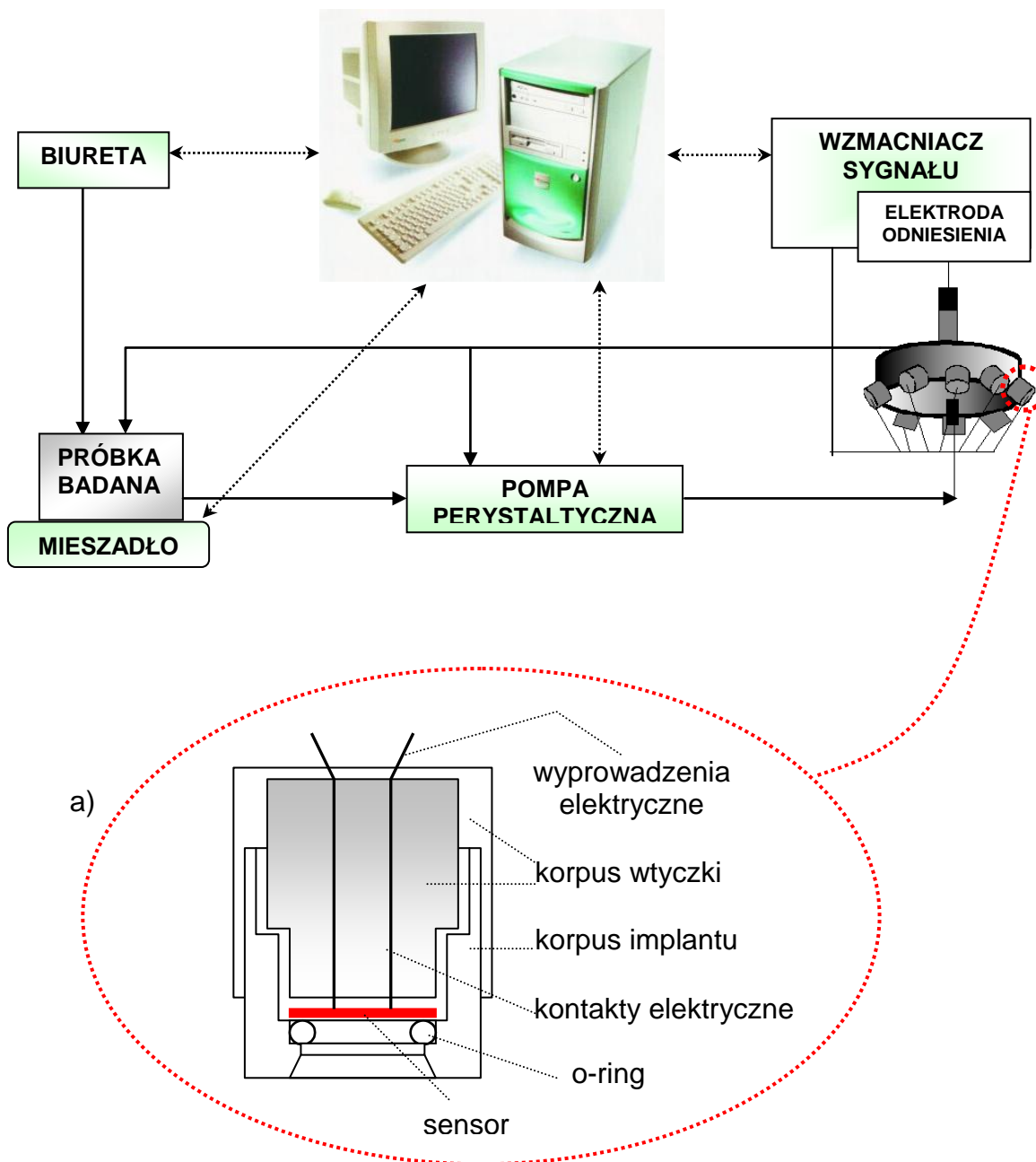
polimeryzacyjnej z gazem obojętnym w celu zakończenia reakcji. Proces fotopolimeryzacji pHEMA przedstawia poniższa reakcja:



Chemicznie dołączona do powierzchni ISFETa warstwa pHEMA została zbadana pod mikroskopem. Charakteryzowała się bardzo dobrą adhezją i po jej nasyceniu azotanem amonu NH_4NO_3 (przez 3,5h) umożliwiała naniesienie membran czułych na jony amonowe lub azotanowe (V).

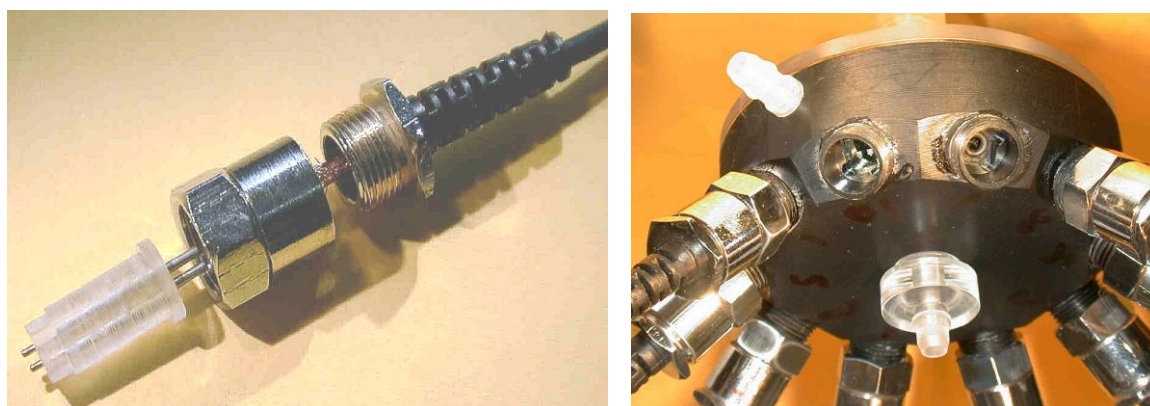
12. Metodyka pomiarów ISFETów i CHEMFETów

Pomiary wykonywano w układzie przepływowym przedstawionym na Rys. 16. Badanych 10 miniaturowych sensorów umieszczono w implantach w głowicy przepływowej o konfiguracji gwiazdy z centralnie umieszczoną elektrodą referencyjną (odniesienia) Ag/AgCl.



Rys. 16 Schemat układu przepływowego a) przekrój implantu

Badane ISFETy wykazują dużą wrażliwość na natężenie padającego światła więc zastosowano głowicę przepływową (Rys.17) wykonaną z materiału nieprzepuszczalnego dla promieniowania świetlnego, dzięki czemu wyeliminowano możliwość wystąpienia zakłóceń sygnału ISFETów. Konstrukcja implantu pozwoliła na ścisłe dopasowanie mikroczujników (5*5 mm) z tylnym wyprowadzeniem kontaktów elektrycznych. Nagwintowane ścianki implantu umożliwiły dokręcenie nakrętki wtyczki ze sprężystymi kontaktami (Rys.17), dociskając podłoże czujnika do o-ringa umożliwiając uszczelnienie układu. Wyeliminowano tym samym możliwość skrętu wtyczki podczas montażu czujników i w konsekwencji możliwość uszkodzenia naniesionych membran.

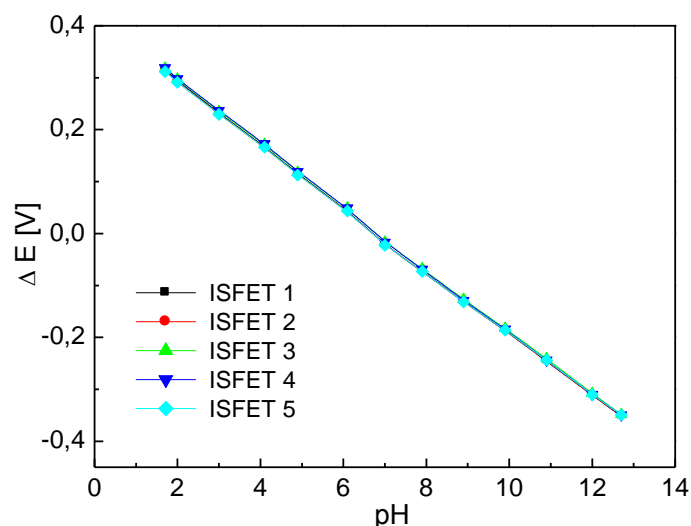


Rys. 17 Zdjęcie wtyczki i celki przepływowej

Wyznaczając krzywe kalibracji $\Delta E=f(\text{pH})$ pH roztworów zmieniano dodając roztwory: NaOH i HCl, kontrolując pH roztworu szklaną elektrodą pH-metryczną. Wykonując pomiar $\Delta E=f(\log a_i)$ roztwory kalibracyjne: 0,1M NaNO₃ i 0,1M NH₄NO₃ dozowano do układu za pomocą biurety automatycznej do roztworu, który wraz z próbką badaną wpływając do celki dolnym otworem wlotowym, obmywały elektrodę odniesienia i mikro sensory. Przepływ roztworu przez celkę wymuszono za pomocą pompy perystaltycznej. Pomiar potencjału membran jonoselektywnych 10 CHEMFETów prowadzono przy stałych parametrach $I_{DS}=100\mu\text{A}$ i $U_{DS}=0,5\text{V}$. Generowany sygnał mierzono za pomocą układu pomiarowego, w skład którego wchodzi dziesięciokanałowy wzmacniacz. Rejestracje sygnału wyjściowego czujników prowadzono przez komputer kompatybilny z IBM PC. Opracowywania wyników pomiarowych wykonano w programie Microcal Origin v. 6.0.

13. Pomiary ISFETów jako sensorów pH

ISFETy z tylnym wyprowadzeniem kontaktów elektrycznych otrzymano z Instytutu Technologii Elektronowej. Nowe przetworniki wymagały przetestowania jako sensory pH co jest konieczne przy ich dalszej modyfikacji. Dlatego też wykonano pomiary charakterystyk ISFETów w roztworach w zakresie pH od 12,7 do 1,7 (Rys. 18) i rejestrowano zmiany sygnału czujników w różnych warunkach prądowo-napięciowych (U_{DS} , I_{DS}). pH roztworu kontrolowano przy pomocy szklanej elektrody pH-metrycznej wprowadzając ją do zlewki z roztworem pompowanym przez układ pomiarowy. Otrzymane krzywe kalibracji wykazywały liniową odpowiedź z nachyleniem od 57 mV/pH do 64 mV/pH.



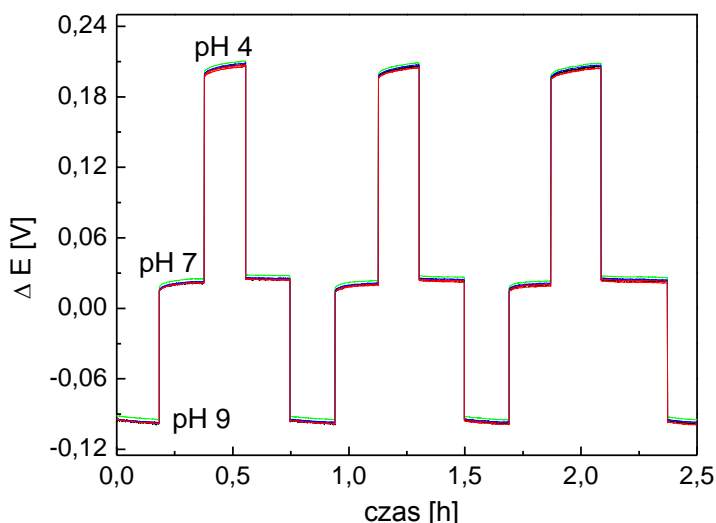
Rys. 18 Krzywe odpowiedzi pH-ISFETów $\Delta E=f(\text{pH})$

Średnie nachylenia odcinków prostoliniowych krzywych kalibracji wykonanych w różnych warunkach prądowo – napięciowych przedstawiono w Tab.2. Do dalszych pomiarów ISFETów i CHEMFETów wybrano warunki prądowo – napięciowe: $I_{DS}= 100\mu\text{A}$ i $U_{DS}=0,5\text{V}$, ponieważ dla takich warunków otrzymano najbardziej powtarzalne krzywe odpowiedzi.

U_{DS} [V]	0,1	0,1	0,5	0,5	1	1	2	2
I_{DS} [μA]	100	500	100	500	120	500	220	500
ΔE [mV/pH]	64	57	64	60	61	61	59	60

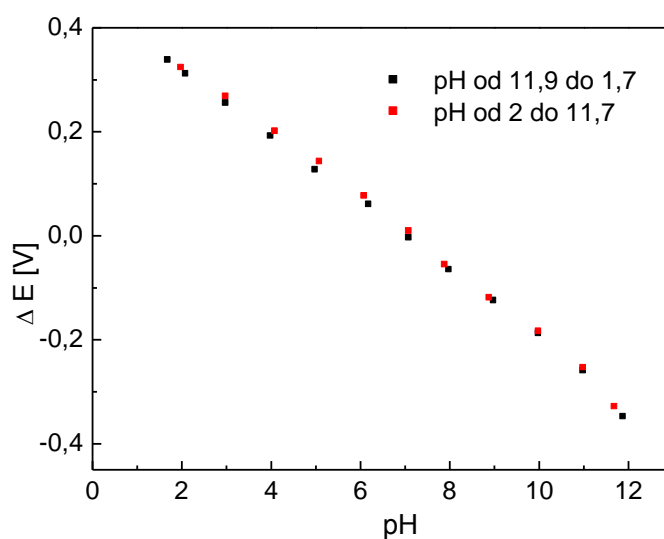
Tab. 2 Nachylenia odcinków prostoliniowych krzywych odpowiedzi ISFETów wyznaczone w różnych warunkach prądowo – napięciowych

Wyznaczono również powtarzalność sygnałów ISFETów (Rys. 19) w roztworach buforowych o pH = 4, pH = 7, pH = 9. Odchylenie standardowe wartości średniej potencjału zmierzonego wynosiły: $\pm 1,4$ mV (buforu pH = 4), $\pm 1,5$ mV (dla buforu pH = 7), $\pm 0,7$ mV (dla buforu pH = 9) co świadczy o dobrej powtarzalności wskaźników mikrosensorów.



Rys. 19 Krzywe odpowiedzi pH-ISFETów podczas zmiany sygnału czujników w czasie $\Delta E=f(\text{czas})$ w roztworach buforowych

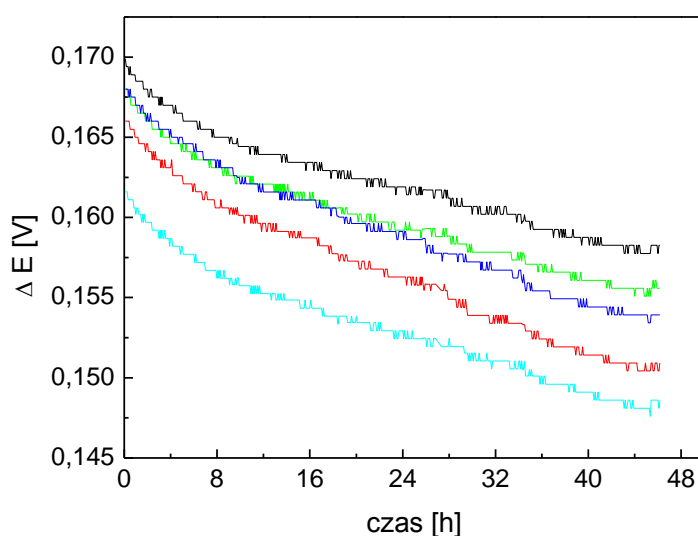
W wybranych warunkach prądowo - napięciowych ($I_{DS}=100\mu A$, $U_{DS}=0,5V$) próbowano zarejestrować zjawisko histerezy przy zmianach pH w zakresie od 11,9 do 1,7 i z powrotem od 2 do 11,7 (Rys. 20).



Rys. 20 Krzywe odpowiedzi przy zmianach pH w zakresie od 11,9 do 1,7 i od 2 do 11,7

Analizując krzywe odpowiedzi zauważono, że w zakresie pH od 1,7 do 2 i od 7 do 12 wartości różnic potencjału krzywych odpowiedzi wynosiły ok. $\pm 2,5$ mV, zaś w zakresie pH od 2 do 7 wartość ta była wyższa i wynosiła ok. ± 12 mV. Na podstawie krzywych odpowiedzi nie można jednoznacznie stwierdzić występowania zjawiska histerezy, a odchylenia od prostoliniowości mogły być spowodowane błędami pomiarowymi.

Badanie stabilności sygnału ISFETów (Rys. 21) przeprowadzono podczas 48 godzinowego pomiaru mikrosensorów zanurzonych w buforze o pH = 4 w warunkach ciągłego przepływu. Na podstawie wyników stwierdzono spadek potencjału o ok. 10 mV w ciągu dwóch dni.



Rys. 21 Sygnał ISFETów w roztworze buforowym (pH =4) w czasie

Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że ze względu na dobre parametry pracy, ISFETy tylnym wyprowadzeniem kontaktów elektrycznych wyprodukowanych w Instytucie Technologii Elektronowej w Warszawie mogą być z powodzeniem wykorzystywane w ciągłych pomiarach pH. Ponadto struktura ich umożliwia dalszą modyfikację, naniesienie warstwy receptorowej pozwalającej zaprojektowanie mikrosensory czułe np. na jony azotanowe (V) i amonowe.

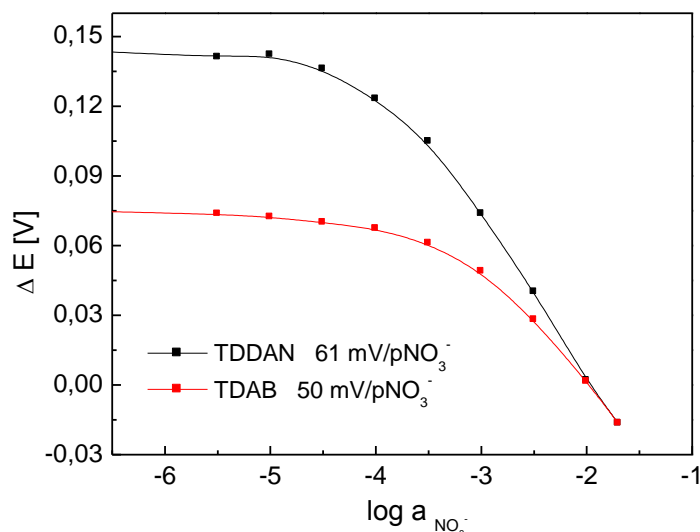
14. Pomiary CHEMFETów do oznaczania jonów azotanowych (V)

Jako materiał polimerowy w CHEMFETach do oznaczania jonów azotanowych (V) zastosowano polichlorek winylu (PVC). Dzięki łatwej dostępności i niskiej cenie użyto go do optymalizacji składników membrany. PVC ze względu na wysoką temperaturę zeszklenia ($T_g=80^{\circ}\text{C}$) wymaga dodatku plastyfikatora (rozpuszczalnika organicznego) w membranie w ilości 60-70%, dlatego też zastosowano o-NPOE jako plastyfikator. Selektywność warstwy polimerowej na azotany(V) uzyskano przez wprowadzenie do membran czwartorzędowych soli amoniowych o różnej długości podstawników alifatycznych, zawierających różne przeciwjony (bromek tetradecyloamoniowy (TDAB), azotan tetradecyloamoniowy (TDDAN)). Skład membran przedstawiono w Tab.3

Ilość [mg]	Składniki membrany			
	Matryca		Jonofor	
	PVC	Plastyfikator o-NPOE	TDAB	TDDAN
a	32,3	65,9	1,05	-
b	31,6	66,5	-	1,1

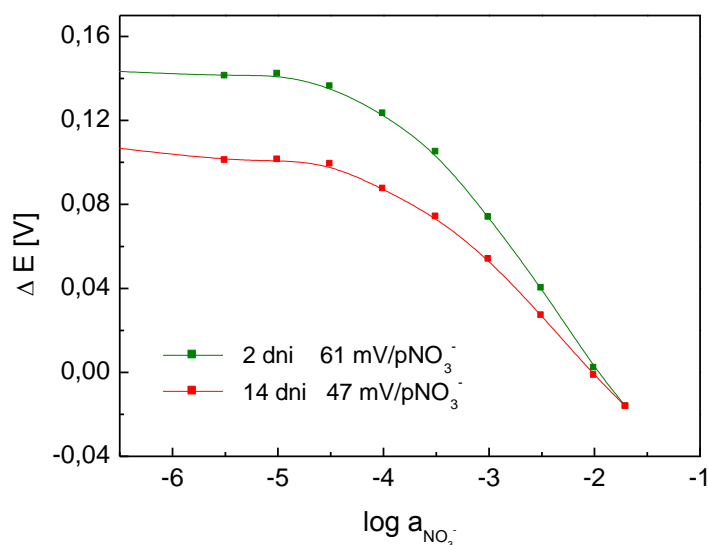
Tab. 3. Skład membrany czulej na jony azotanowe (V)

Roztwór membranowy rozpuszczono w 0,75 mL THF naniesiono na ISFETy automatyczna pipeta w ilości 15 μL (na 1 mikrosensor) i pozostawiono na 24h na czas odparowania rozpuszczalnika. Tak przygotowane NO_3^- -CHEMFETy zamontowano do układu pomiarowego (Rys. 17) i wyznaczono krzywe kalibracji w 0,1M NaCl (Rys. 22).



Rys. 22 Krzywe odpowiedzi NO₃⁻-CHEMFETów zawierających różne jonofory w 0,1M NaCl

Na podstawie wyznaczonych krzywych kalibracji NO₃⁻-CHEMFETów z membranami o składzie przedstawionym w Tab.3, stwierdzono najwyższe nachylenie odcinka prostoliniowego krzywej kalibracji ok. 61 mV/pNO₃⁻ w 0,1M NaCl dla NO₃⁻-CHEMFETów zawierających TDDAN jako wymiennicz jonowy w warstwie receptorowej. Dla zoptymalizowanego składu membrany NO₃⁻-CHEMFETów przeprowadzono pomiary w czasie. Zaobserwowano spadek nachylenia (o 14 mV/pNO₃⁻ po 16 dniach) mikrosensorów umieszczonych w układzie przepływowym w 0,1 M NH₄NO₃ (Rys.23)



Rys. 23 Krzywe odpowiedzi NO₃⁻-CHEMFETów zawierających TDDAN jako wymiennicz jonowy w membranie wyznaczone w 0,1 M NaCl

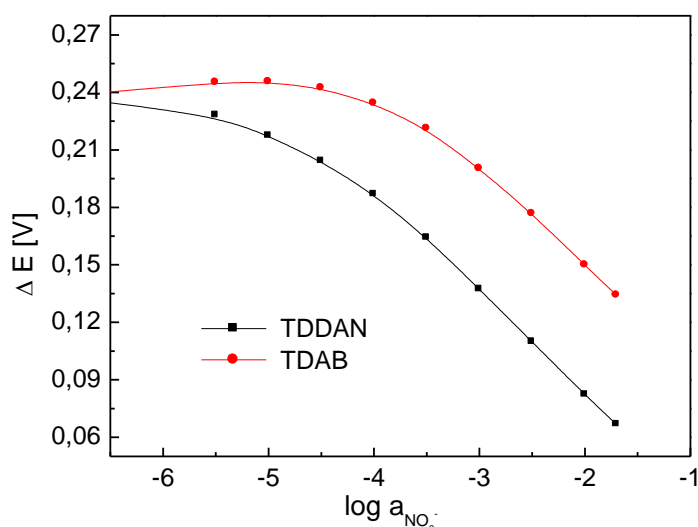
Z powodu krótkiego czasu życia NO_3^- -CHEMFETów z membranami zawierającymi PVC wynikającego z niedostatecznej adhezji membrany do podłoża ISFETu i wymywaniem elektroaktywnych składników z membrany do kontaktującego się z nią roztworu wodnego przygotowano mikrosensory z membranami polisiloksanowymi. Membrany polisiloksanowe nie wymagają dodatku plastyfikatora ze względu na ich małą temperaturę zeszklenia ($T_g \leq -110^\circ\text{C}$). Spodziewano się, że dzięki lepszej adhezji takich membran do podłoża ISFETów wzrośnie ich czas życia.

Zastosowanie matrycy innej niż PVC wymagało ponownej oceny wpływu zawartości soli lipofilowej na parametry pracy NO_3^- -CHEMFETów. Dlatego też badano mikrosensory z membranami polisiloksanowymi zawierającymi dwa różne jonofory (TDDAN, TDAB). Odważono składniki membran przedstawionych w Tab.4 i naniesiono roztwór rozpuszczony w 1,08 mL THF automatyczna pipeta -10 μL (na 1 mikrosensor).

Ilość [mg]	Składniki membrany			
	Matryca PSX 851	Jonofor		Fotoinicjator DMAP
		TDAB	TDDAN	
a	98	1	-	1
b	98	-	1	1

Tab. 4. Skład membrany polisiloksanowej czulej na jony azotanowe (V)

Następnie elektrody umieszczono w komorze polimeryzacyjnej z laminarnym przepływem gazu obojętnego (N_2) i po 5 min. naswietlano promieniowaniem UV ($\lambda=254\text{nm}$) przez 3 min. Po zainicjowaniu fotopolimeryzacji pozostawiono czujniki przez 24h w komorze polimeryzacyjnej z gazem obojętnym w celu zakończenia reakcji polimeryzacji. Tak przygotowane NO_3^- -CHEMFETy zamontowano do układu pomiarowego i wyznaczono krzywe kalibracji w 0,1M Na_2SO_4 (Rys. 24). Jonową selektywność NO_3^- -CHEMFETów oceniono na podstawie potencjometrycznych współczynników selektywności $K_{\text{NO}_3^-,B}$ wyznaczonych metoda FIM (Równanie 10). Krzywe kalibracji czujników z wybranymi membranami wyznaczono w roztworach zawierających wybrane jony przeszkadzające o stężeniach 0,1M. Wyniki pomiarów zestawiono w Tab.5.



Rys. 24 Krzywe odpowiedzi NO_3^- -CHEMFETów z membranami zawierającymi w swoim składzie różne jonofory (TDDAN, TDAB) wyznaczone w 0,1M Na_2SO_4

E [mV/p NO_3^-]		B, jon przeszkadzający	log $K_{\text{NO}_3^-, \text{B}}$	
a	b		a	b
49,6	52,4	Cl^-	- 2,38	- 2,88
51,1	52,9	SO_4^-	- 2,84	- 3,34

Tab. 5 Wartości współczynników selektywności i nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych kalibracji NO_3^- -CHEMFETów zawierających w membranie TDDAN i TDAB

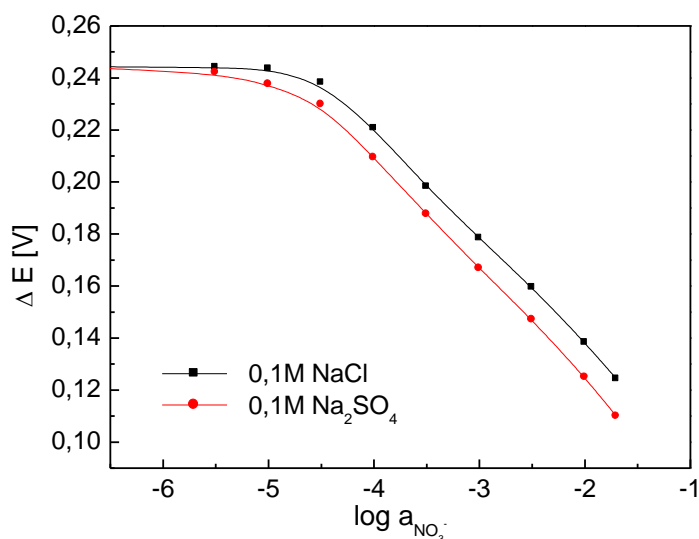
Na podstawie powyższych wyników stwierdzono wyższą selektywność na jony NO_3^- względem jonów przeszkadzających oraz wyższe nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych odpowiedzi mikrosensorów zawierających w składzie membrany TDDAN (b) jako wymiennicz jonowy (Rys. 24).

Kolejnym etapem badań nad NO_3^- -CHEMFETami było przetestowanie innego polimeru (siloprenu) jako matrycy membranowej. Polimer ten (polidimetylosiloksan z terminalnymi grupami silanolowymi (K 100) sieciowany jest chemicznie za pomocą odczynnika sieciującego K11 w reakcji kondensacji. Skład zaproponowanych membran siloprenowych przedstawiono w Tab.6.

Ilość [mg]	Składniki membrany		
	Matryca		Jonofor TDAB
	Silopren K 1000	Odczynnik sieciujący K 11	
	67,5	6,5	1

Tab. 6 Skład membrany siloprenowej czulej na jony azotanowe (V)

Roztwór membranowy o powyższym składzie rozpuszczono w 0,5 mL THF naniesiono pipeta automatyczna 8 μ L (na jeden mikrosensor) i pozostawiono na 24h w celu odparowania rozpuszczalnika i usieciowania membran. Następnie zamontowano NO₃⁻ -CHEMFETy do układu pomiarowego i wyznaczono krzywe kalibracji w roztworach: 0,1 M NaCl i 0,1 M Na₂SO₄ (Rys. 25). Wyniki NO₃⁻ -CHEMFETów przedstawiono w Tab.7.



Rys. 25 Krzywe odpowiedzi NO₃⁻ -CHEMFETów z membranami siloprenowymi zawierającymi TDAB wyznaczone w roztworach: 0,1M NaCl i 0,1M Na₂SO₄

E [mV/pNO ₃ ⁻]	B, jon przeszkadzający	log K _{NO₃⁻,B}
40,7	Cl ⁻	- 3,38
43,8	SO ₄ ²⁻	- 3,84

Tab. 7 Wartości współczynników selektywności i nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych kalibracji NO₃⁻-CHEMFETów (TDAB) w roztworach 0,1M soli jonów B

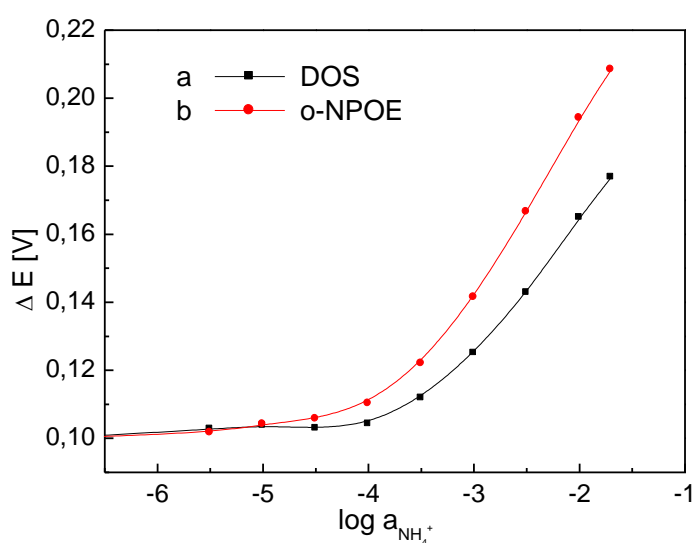
Na podstawie wyników przedstawionych badań stwierdzono, że mikrosensory zawierające w składzie membrany wymiennicz jonowy – TDDAN wykazują wyższą selektywność na jony NO₃⁻ względem jonów przeszkadzających w matrycach z PVC jak również polisiloksanowych. Stwierdzono ponadto, że czujniki z membranami polisiloksanowymi charakteryzują się wyższą stabilnością długoterminową w porównaniu z czujnikami z membranami z PVC.

15. Pomiary CHEMFETów do oznaczania jonów amonowych

W dalszym etapie prac badawczych optymalizowano skład membran selektywnych na jony amonowe. W membranie zastosowano jonofor – nonaktywne selektywna na jony NH_4^+ . Jako materiał polimerowy użyto PVC, który wymaga odpowiedniego plastyfikatora. Wyznaczone krzywe odpowiedzi dla NH_4^+ -CHEMFETów z membranami zawierającymi w swoim składzie dwa różne plastyfikatory (Tab. 8): apolarny DOS (stała dielektryczna $\epsilon_r=3,88$) – membrana a i polarny o-NOPE ($\epsilon_r=24$) – membrana b, przedstawiono na Rys.26. Składniki membran rozpuszczono w 0,75 mL THF, na czujniki nakropiono 15 μL takiego roztworu.

Ilość [mg]	Składniki membrany				
	Matryca			Jonofor nonaktywna	Sól lipofilowa KTFPB
	PVC	Plastyfikator			
		DOS	o-NOPE		
a	32,3	64,5	-	2	1,2
b	32,5	-	64,3	2	1,2

Tab. 8 Skład membrany czulej na jony NH_4^+ z PVC z różnymi plastyfikatorami



Rys. 26 Krzywe odpowiedzi NH_4^+ -CHEMFETów zawierające różne plastyfikatory wyznaczone w roztworze 0,1 M NaCl

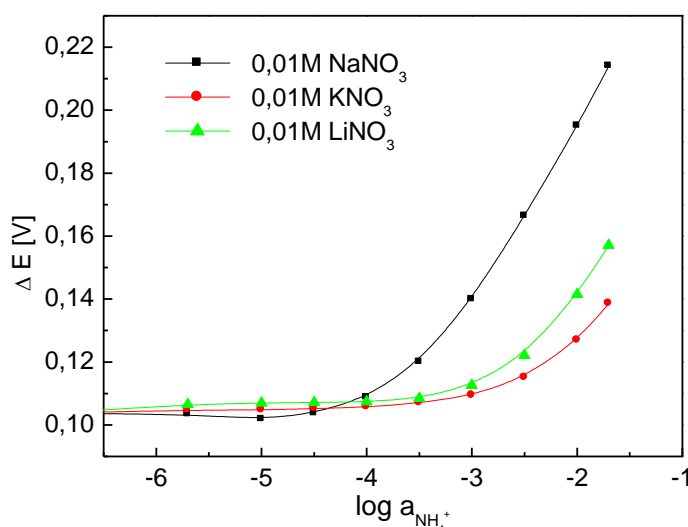
Nachylenia odcinków prostoliniowych krzywych kalibracji wyznaczone w roztworze 0,1 M NaCl były wyższe dla sensorów z membranami zawierającymi o-NPOE (48,9 mV/pNH₄⁺) w porównaniu do czujników z membranami plastyfikowanymi DOS (40,2 mV/pNH₄⁺).

Kolejne pomiary NH₄⁺-CHEMFETów przeprowadzono używając membrany polisiloksanowe (Tab. 9). Składniki membran rozpuszczono w 0,53 mL THF i naniesiono pipeta automatyczna 15μL roztworu na jeden mikrosensor. Oczekiwano polepszenia parametrów pracy, a szczególnie spodziewano się dłuższego czasu życia mikroczujników dzięki lepszej adhezji membran polisiloksanowych do podłoża przetwornika.

Ilość [mg]	Składniki membrany			
	Matryca PSX 851	Fotoinicjator DMAP	Jonofor nonaktywna	Sól lipofilowa KTFPB
	48,5	0,5	1,3	0,8

Tab. 9. Skład membrany polisiloksanowej czulej na jony amonowe

Wyznaczone krzywe odpowiedzi NH₄⁺-CHEMFETów z membranami o powyższym składzie w roztworach jonów przeszkadzających przedstawiono na Rys. 27.



Rys. 27 Krzywe kalibracji NH₄⁺-CHEMFETów w różnych roztworach przeszkadzających o stężeniu 0,01M

Nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych kalibracji i współczynniki selektywności czujników wyznaczone metodą FIM przedstawiono w Tab. 10

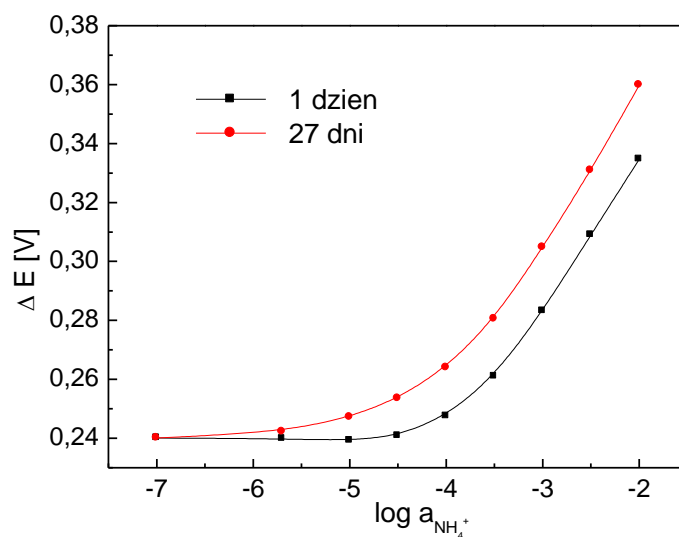
E [mV/pNH ₄ ⁺]	B, jon przeszkadzający	log K _{NH₄⁺,B}
52,6	Na ⁺	- 1,96
22,2	K ⁺	- 0,95
43,2	Li ⁺	- 0,96

Tab. 10 Wartości współczynników selektywności i nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych kalibracji NO₃- CHEMFETów (TDAB) w roztworach 0,1 M soli jonow B

Przeprowadzono również serię pomiarów NH₄⁺-CHEMFETów z membranami siloprenowymi o składzie przedstawionym w Tab. 11. Składniki membran rozpuszczono w 0,3 mL THF i naniesiono pipeta automatyczna 10μL roztworu na jeden mikrosensor. Wyznaczono krzywe kalibracji czujników z takimi membranami w roztworze 0,01M NaNO₃ w czasie (Rys.28).

Ilość [mg]	Składniki membrany			
	Matryca		Jonofor nonaktywna	Sól lipofilowa KTFPB
	Silopren K 1000	Odczynnik sieciujący K 11		
	68,6	7,7	2	1,2

Tab. 11. Skład membrany czulej na jony amonowe



Rys. 28 Krzywe kalibracji NH_4^+ -CHEMFETów w czasie wyznaczone w roztworze 0,01M NaNO_3

Po jednym dniu kondycjonowania czujników nachylenie odcinka prostoliniowego krzywych kalibracji wynosiło 44,5 mV/p NH_4^+ , zaś po 27 dniach czujniki wykazywały wyższe nachylenie (54,2 mV/p NH_4^+). Wynika to z potrzeby dłuższego kondycjonowania mikrosensorów zawierających polisiloksany jako materiały polimerowe matryc.

Na podstawie przedstawionych wyników stwierdzono, że NH_4^+ -CHEMFETy z membranami z PVC plastyfikowany o-NPOE wykazują lepsze parametry pracy w porównaniu do czujników z membranami plastyfikowanych DOS. Również zauważono, że dłuższe kondycjonowanie NH_4^+ -CHEMFETów zawierające polisiloksany podwyższa parametry pracy mikrosensorów.

16. Podsumowanie i wnioski końcowe

W pracy „Potencjometryczne mikrosensory z zastosowaniem ISFETów do monitorowania jonów w układzie przepływowym” przedstawiono badania poświęcone opracowaniu miniaturowych sensorów potencjometrycznych – ISFETów, NH_4^+ -CHEMFETów i NO_3^- -CHEMFETów przystosowanych do analizy przepływowej. Stosowano metodę potencjometryczną, tj. wykonano pomiary SEM ogniw pomiarowych zanurzonych w roztworze w warunkach bezprądowych. Na podstawie uzyskiwanych krzywych kalibracji określono parametry pracy mikrosensorów. Jonową selektywność polimerowych membran oceniono na podstawie potencjometrycznych współczynników selektywności wyznaczanych metodą FIM. Opracowanie jonoselektywnych CHEMFETów wymagało wyznaczenia parametrów pracy przetworników ISFETów wykonanych w Instytucie Technologii Elektronowej (ITE) w Warszawie, które niemodyfikowane stanowią czujniki do pomiaru pH. Dalsze badania dotyczyły optymalizacji składu membran selektywnych na jony azotanowe (V) i amonowe. Przetestowano kilka materiałów polimerowych jako matryce membranowe CHEMFETów (PVC, polisiloksany) oraz sprawdzono wpływ struktury niektórych składników membran na parametry pracy sensora. Badając czas życia mikrosensorów w pracy zastosowano krótszy czas (do 1 miesiąca) niż zalecany w literaturze czas testowania czujników (od 3 do 6 miesięcy) ze względu na późne dostarczenie ISFETów z ITE.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ze względu na korzystne parametry pracy (czułość, powtarzalność) ISFETy z tylnym wyprowadzeniem kontaktów elektrycznych wyprodukowanych w Instytucie Technologii Elektronowej mogą być z powodzeniem wykorzystywane w ciągłych pomiarach pH i możliwa jest ich dalsza modyfikacja. Uzyskano teoretyczną odpowiedź pH w zakresie od 12,7 do 1,7. Na podstawie pomiarów wyznaczono warunki prądowo -napięciowe ISFETów dla dalszych pomiarów. Badania nad jonoselektywnymi mikrosensorymi z membraną PVC, czułych na jony NO_3^- wskazywały na optymalną strukturę jonoforu – TDDAN, natomiast w przypadku czujników selektywnych na jony NH_4^+ korzystniejszym (szerszy zakres prostoliniowy krzywej odpowiedzi) plastyfikatorem okazał się polarny o-NPOE. Skonstruowane czujniki charakteryzowały się wysoką selektywnością na oznaczane jony oraz zakresem prostoliniowym krzywej odpowiedzi w zakresie $4,5 \cdot 10^{-4}$ - $1,7 \cdot 10^{-1}$ M. Ze względu jednak na krótki czas życia czujników opartych na membranach z plastyfikowanego PVC, wynikający z niedostatecznej adhezji membrany do powierzchni ISFETów zastosowano matryce polisiloksanowe w konstrukcji czujników. CHEMFETy z membranami polisiloksanowymi

charakteryzowały się porównywalną selektywnością na oznaczane jony jednak czas życia takich mirkosensorów był zdecydowanie lepszy (po miesiącu pracy otrzymano wyższe nachylenie oraz szersze odcinki zakresu prostoliniowego krzywych kalibracji).

Reasumując stwierdzono, że badane potencjometryczne mirkosensory charakteryzują się parametrami pracy dzięki którym możliwe jest szybkie wykonanie oznaczenia przy zadawalającej dokładności i precyzji. Takie urządzenia mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach naszego życia np. w analizie środowiskowej czy chemii klinicznej. Szczególnie przydatne są w monitorowaniu jonów w procesach technologicznych gdzie wymagana jest szybka informacja o analizie.

17. Literatura

- [1] Aura Ochrona Środowiska, SIGMA – NOT, ISSN 0137-3668, 4, 2000.
- [2] N. Jaffrezic-Renault, A. Senillou, C. Martelet, K. Wan, J.M. Chovelon, *Sensors and Actuators B*, **59**, 1999, 154-164.
- [3] A. Bratov, N. Abramova, C. Dominguez, A. Baldi, *Anal. Chim. Acta*, **408**, 2000, 57-64.
- [4] L. Campanella, C. Colapicchioni, M. Tomassetti, A. Bianco, S. Dezzi, *Sensors and Actuators B*, **24-25**, 1995, 188-193.
- [5] N. Abramova, Yu Borisov, A. Bratov, P. Gavrilenko, C. Dominguez, V. Spiridonov, E. Suglobova, *Talanta*, **52**, 2000, 533-538.
- [6] Muñoz, C. Jimenez, A. Bratov, J. Bartroli, S. Alegret & C. Dominguez, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 12. No. 7 pp. 577-585, 1997.
- [7] P. Bergveld, *Sensors and Actuators B*, **88**, 2003, 1-20.
- [8] Michał Chudy, Rozprawa doktorska 2001.
- [9] Wang Donghong, Chen Weiping, Wang Mingjiang, Yu Dun, Wang Guihua, *Sensors and Actuators B*, **66**, 2000, 6-8.
- [10] M. L. Hamlaoui, R. Kherrat, M. MARRAKCHI, N. Jaffrezic-Renault, A. Walcarius, *Materials Science and Engineering C*, **21**, 2002, 25-28.
- [11] R.W. Cattral, I.C. Hamilton, *Ion-Selective Electrode Rev.*, **6**, 1984, 125.
- [12] H. Freiser, *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 1987, 539
- [13] R. Zielińska, E. Mulik, A. Michalska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, *Anal. Chim. Acta*, **451**, 2002, 243-249.
- [14] Nadejda V. Kolytcheva, Oleg M. Petrukhin, Natalia V. Filipieva, Helmut Müller, *Sensors and Actuators B*, 1998 491-500.
- [15] Fayi Song, Jeonghan Ha, Byungho Park, Tea Hyung Kwak, In Tea Kim, Hakhyun Nam, Geun Sig Cha, *Talanta*, **57**, 2002, 263-270.
- [16] S. Zairi, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, R. Lamartine, R. M'gaïeth, H. Maaref, M. Gamoudi, G. Guillaud, *Applied Surface Science*, **172**, 2001 225-234.
- [17] M. J. Schöning, F. Ronkel, M. Crott, M. Thust, J. W. Schultze, P. Kordos and H. Lüth, *Electrochim. Acta*, Vol. 42, Nos 20-22, pp. 3185-3193, 1997.
- [18] M. J. Schöning, Ü. Malkoc, M. Thust, A. Steffen, P. Kordoš, H. Lüth, *Sensors and Actuators B*, **65**, 2000, 288-290.
- [19] M. Esashi, T. Matsuo, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-25**, 1978, 184-192.
- [20] J. Bausells, J. Carrabina, A. Errachid, A. Merlos, *Sensors and Actuators B*, **57**, 1999, 56-62.

- [21] H. H. Van den Vlekkert et. al, Some fundamental and practical aspects of 'CHEMFETs', Thesis, University of Neuchatel, Szwajcaria, 1988.
- [22] A. Merlos, E. Cabruja, J. Esteve, *Sensors and Actuators B*, **24-25**, 1995, 228-231.
- [23] C. Jimenez, I. Marques, J. Bartroli, *Anal. Chem.*, **68**, 1996, 3801-3807.
- [24] S. Middelhoek, *Sensors and Actuators*, **82**, 2000, 2-23.
- [25] Jay Orear, Fizyka, WNT Warszawa 1993.
- [26] R. Ćwirko, M. Rusek, W. Marciniak, *Układy Scalone*, WNT Warszawa 1987.
- [27] K. Braclawski, A. Siennicki, *Elementy Półprzewodnikowe*, Warszawa 1976.
- [28] P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-17**, 1970, 70.
- [29] H. Stieve, *Sensors and Actuators*, **4**, 1983, 89.
- [30] D. N. Reinhoudt, *Sensors and Actuators B*, **24-25**, 1995, 197-200.
- [31] Ronny J. W. Lugtenberg, Richard J. M. Egberink, Johan F. J. Engbersen, David N. Reinhoudt, *Anal. Chim. Acta*, **357**, 19997, 225-229.
- [32] Ronny J. W. Lugtenberg, Zbigniew Brzózka, Alessandro Casnati, Rocco Ungaro, Johan F. J. Engbersen, David N. Reinhoudt, *Anal. Chim. Acta*, **310**, 1995, 263-267.
- [33] A. Errachid, J. Bausells, A. Merlos, J. Esteve, F. Teixidor, C. Perez-Jimenez, J. Casabo, C. Jimenez, J. Bartroli, *Sensors and Actuators B*, **26-27**, 1995, 321-324.
- [34] Z. Brzózka, M. Dawgul, D. Pijanowska, W. Torbicz, *Sensors and Actuators B*, **44**, 1997, 527-531.
- [35] W. Wróblewski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Anal. Chim. Acta*, **401**, 1999, 105-110.
- [36] M. M. G. Antonisse, R. J. W. Lugtenberg, R. J. M. Egberink, J.F.J. Engbersen, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume: 12, Issue: 4, 1997, pp viii.
- [37] Martijn M. G. Antonisse, Bianca H. M. Snellink-Ruël, Johan F. J. Engbersen, David N. Reinhoudt, *Sensors and Actuators B*, **47**, 1998, 9-12.
- [38] Martij M. G. Antonisse, Ronny J. W. Lugtenberg, Richard J. M. Egberink, Johan F.J. Engbersen, David N. Reinhoudt, *Anal. Chim. Acta*, **332**, 1996, 123-129.
- [39] J. Casabo, L. Escriche, C. Perez - Jimenez, J. A. Munoz, F. Teixidor, J. Bausells, A. Errachid, *Anal. Chim. Acta*, **320**, 1996, 63-68.
- [40] W. Wróblewski, *Miniaturowe sensory chemiczne z wykorzystaniem tranzystorów polowych i światłowodów*, Oficyna wydawnicza PW, Warszawa 2001.
- [41] W. Wróblewski, M. Chudy, A. Dybko, *Anal. Chim. Acta*, **416**, 2000, 97-104.
- [42] J. Janata, S. D. Moss, *Biomed. Eng.*, **11**, 1976, 241.
- [43] S. Caras, J. Janata, *Anal. Chem.*, **52**, 1980, 1935-1937.

- [44] A. P. Soldatkin, D. V. Gorchkov, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Materials Science and Engineering C*, **5**, 1997, 35-40.
- [45] Byung-Ki Sohn, Byung-Woog Cho, Chang-Soo Kim, Dae-Hyuk Kwon, *Sensors and Actuators B*, **41**, 1997, 7-11.
- [46] Z. Emmanuel Selvanayagam, P. Neuzil, P. Gopalakrishnakone, U. Sridhar, M. Singh, L.C. Ho, *Biosensors and Bioelectronics*, **17**, 2002, 821-826.
- [47] M. J. Schöning, S. Schütz, P. Schroth, B. Weißbecker, A. Steffen, P. Kordoš, H. E. Humel, H. Lüth, *Sensors and Actuators B*, **47**, 1998, 235-238.
- [48] A. Poghossian, M. J. Schöning, P. Schroth, A. Simonis, H. Lüth, *Sensors and Actuators B*, **76**, 2001, 519-526.
- [49] Jianguo Liu, Li Liang, Gaoxiang Li, Rushui Han, Keming Chen, *Biosensors & Bioelectronics*, **13**, 1998, 1023-1028.
- [50] M. Cremer, *Z. Biol.*, **47**, 1906, 562.
- [51] Z. Stefanac, W. Simon, *Chimia*, **20**, 1966, 436.
- [52] Z. Stefanac, W. Simon, *Microchem. J.*, **12**, 1967, 125.
- [53] L. Pioda, H. Wipf, W. Simon, *Chimia*, **22**, 1968, 189.
- [54] H. J. Berman, N. C. Hebert, *Ion Selective Microelectrodes* Plenum Press, New York and London 1974.
- [55] C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 1967, 2495.
- [56] B. Dietrich, J. Lehn, J. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 1969, 2885.
- [57] J. Lehn, J. Sauvage, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **440**, 1971.
- [58] H. J. Nielsen, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta.*, **85**, 1976, 1.
- [59] M. S. Gauri, J. D. R. Thomas, *Anal. Proc.*, **31**, 1994, 181-183.
- [60] E. Lindner, K. Toth, E. Pungor, W. E. Morf W. Simon, *Anal. Chim.*, **50**, 1978, 1627.
- [61] L. Campanella, C. Colapicchioni, G. Crescentini, M. P. Sammartino. Y. Su, M. Tomassetti, *Sensors and Actuators B*, **26-27**, 1995, 329-335.
- [62] G. S. Cha., D. Liu., M. E. Meyerhof, H. C. Cantor, A. R. Midgley, H. D. Goldberg, R. Borow, *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 12.
- [63] P. Gehrig, W. E. Morf, E. Pretsch, W. Simon, *Helv. Chim. Acta*, **73**, 1990, 203.
- [64] C. Dumschat, R. Frommer, H. Rautschek, H. Müller, H. J. Timpe, *Anal. Chim. Acta*, **243**, 1991, 179-182.
- [65] H. Müller, A. Spickermann, *Chem. Anal.*, **40**, 1995, 599-608.
- [66] J. Tietje-Girault, I. MacInnes, M. Schroder, G. Tennant, H. H. Girault, *Electrochim. Acta*, **35**, 1990, 777.
- [67] G. S. Cha, R. A. Brown, *Sensors and Actuators B*, **1**, 1990, 281.

- [68] J. A. J. Brunik, R. J. W. Lugtenberg, Z. Brzózka, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **378**, 1994, 185.
- [69] E. J. R. Sudhölter, M. Skowronska - Ptasinska, P. D. van der Wal, A. van den Berg, D. N. Reinhoudt, *Eur. Pat. Appl.* **285**, 1986, 591.
- [70] D. N. Reinhoudt, J. F. J. Engbersen, Z. Brzózka *Anal. Chem.*, **66**, 1994, 3618.
- [71] Z. Brzózka, H. A. J. Holterman, G. W. N. Honig, U. H. Verkerk, *Sensors and Actuators B*, **18-19**, 1994, 38.
- [72] Ronny J. W. Lugtenberg, Richard J. M. Egberink, Albert van den Berg, Johan F. J. Engbersen, David N. Reinhoudt, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **452**, 1998, 69-86.
- [73] S.M. Ciani, G.Eisenmann, G.Szabo, *Journal of Membrane Biology*, **1**, 1969, 1.
- [74] Yoshio Umezawa, Philippe Bühlmann, Kayoko Umezawa, Koji Tohda, Shigeru Amemiya, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 10, pp.1851 – 2082, 2000.
- [75] Z. Brzózka, W. Wróblewski, *Sensory Chemiczne*, WPW Warszawa 1998.