

Санкт-Петербургский государственный университет

Руденко Илья Владимирович

Выпускная квалификационная работа

Разработка и экспериментальная апробация мультианалитных массивов полимерных оптических сенсоров для анализа биологических жидкостей

Уровень образования: бакалавриат

Направление: 04.03.01 «Химия»

Основная образовательная программа: СВ.5014.2016 «Химия»

Профиль: базовый

Научный руководитель: к.х.н.,
доцент Института химии СПбГУ
Пешкова Мария Анатольевна

Рецензент: д.х.н., профессор
Института химии СПбГУ
Кирсанов Дмитрий Олегович

Санкт-Петербург
2020

Оглавление

Введение	4
1. Обзор литературы	6
1.1. Оптические датчики на основе ионофоров.....	6
1.2. Применение оптических сенсоров в реальных объектах	9
2. Экспериментальная часть.....	19
2.1. Реактивы и материалы	19
2.2. Оборудование	20
2.3. Технология изготовления жидкой мембранной композиции, оптодов и массива для измерения	21
2.4. Проведение измерений и обработка экспериментальных данных.....	22
3. Обсуждение результатов	24
3.1. Вывод теоретического уравнения отклика	24
3.2. Оптимизация сенсорной системы для анализа пота.....	25
3.3. Оптимизация материалов для анализа крови.....	33
3.4. Оптимизация материалов и геометрии массива сенсоров для анализа гидропонных сред.....	37
Заключение.....	43
Выводы.....	44
Список цитированной литературы.....	45

Введение

Сенсорные системы используются уже на протяжении более 100 лет. В последнее время эта область науки имеет всё большее применение в лабораторной практике. Вместе с этим в научных исследованиях, посвященных сенсорам, уделяется большое внимание и их теоретическому описанию, в особенности это касается класса химических сенсоров. Согласно определению IUPAC, химический сенсор — это устройство, преобразующее концентрацию или другую величину, описывающую содержание компонента в пробе, в аналитический сигнал [1]. При этом на данный момент наиболее актуальны системы, которые способны предоставлять информацию не о концентрации вещества в растворе, а об его активности, так как именно информация об ионных активностях используется в практически важных областях знаний, например, в медицине. Примером таких химических сенсоров могут служить оптоды — оптические химические сенсоры, которые преобразуют информацию об активности аналита в исследуемой водной фазе в оптический аналитический сигнал.

Оптоды пригодны для исследования объектов различной природы, начиная от простых двухкомпонентных систем (например, растворов солей) до сложных биологических жидкостей (таких как кровь, слюна и т.д.). Они позволяют проводить неразрушающий анализ вещества, при этом возможно проведение on-line или in-line дистанционного анализа, так как оптоды не нуждаются в прямом доступе к энергопитанию. Данный класс сенсоров является весьма перспективным для внедрения в рутинную аналитическую практику: он не требует долгой и трудоёмкой пробоподготовки, считывание аналитического сигнала может осуществляться с помощью дешёвых и простых в использовании приборов, например, цветной фотокамеры [2]. Оптический сигнал возникает вследствие специфического взаимодействия активных компонентов оптода с аналитом, в результате которого оптические свойства, например, цвет или флуоресценция сенсора, изменяются. Одним из дальнейших путей развития данной области является изучение различных материалов и активных молекул, которые позволят оптимизировать отклик рассматриваемого класса сенсоров.

Изучение литературных источников позволяет сделать вывод, что системы на основе оптических сенсоров хотя и активно разрабатываются в лабораториях, гораздо реже применяются в реальных условиях. Основная проблема, которая решалась в ходе

работы, – это возможность применения сенсорных систем *in situ*. В ходе исследования были опробованы различные материалы для создания датчиков, работоспособных в реальных условиях. Подобраны наиболее оптимальные материалы для проведения анализа биологических жидкостей. Также предложена рабочая модель массива оптических сенсоров, в перспективе позволяющая проводить анализ пота в режиме *in situ* с использованием камеры телефона. Полученные результаты могут быть обобщены и для создания сенсорных массивов, применимых для других аналитических задач.

1. Обзор литературы

1.1. Оптические датчики на основе ионофоров

В оптических сенсорах в качестве распознающих молекул используются различные аналит-селективные материалы, чувствительные как к нейтральным, так и к заряженным частицам [3]. Особое место среди активных веществ, обуславливающих селективность сенсора, занимают ионофору — нейтральные или заряженные вещества, которые селективно связываются с аналитом. В качестве традиционного примера оптода на основе ионофора выступают гидрофобные объёмные оптические сенсоры, представляющие собой пластифицированную поли(винилхлоридную) (ПВХ) матрицу или иную полимерную матрицу со схожими свойствами, в которой содержатся липофильные активные компоненты — один или несколько ионофоров, по крайней мере один из которых является индикатором, изменяющим свои оптические свойства. Данные липофильные индикаторы в результате протонирования или комплексообразования способны изменять свои оптические свойства, такие как положение максимума светопоглощения в видимом диапазоне излучения, то есть цвет, (так называемые хромоионофору) [4] или интенсивность люминесценции (так называемые люминофору) [5] и пр. Появление отклика катион-селективных объёмных оптодов, содержащих такие активные частицы, обусловлено процессом ионного обмена между фазой раствора и фазой сенсора, в результате чего изменяется соотношение протонированной/депротонированной форм (для рН-индикаторов) и/или закомплексованной/свободной форм (для металл-индикаторов) оптически активной частицы.

Наиболее распространены оптоды, сочетающие в себе рН-индикатор, отвечающий за изменение оптических свойств сенсора, и селективный ионофор, отвечающий за отклик к иону-аналиту. Рассмотрим общий вид отклика оптодной мембраны, в котором заряженный аналит I^+ переходит в результате ионного обмена из фазы анализируемого раствора в фазу мембраны и селективно связывается с нейтральным ионофором, образуя заряженный комплекс. При этом для сохранения электронейтральности индикатор в фазе мембраны депротонируется и протон переходит в раствор. Схема отклика представлена на Рис. 1.

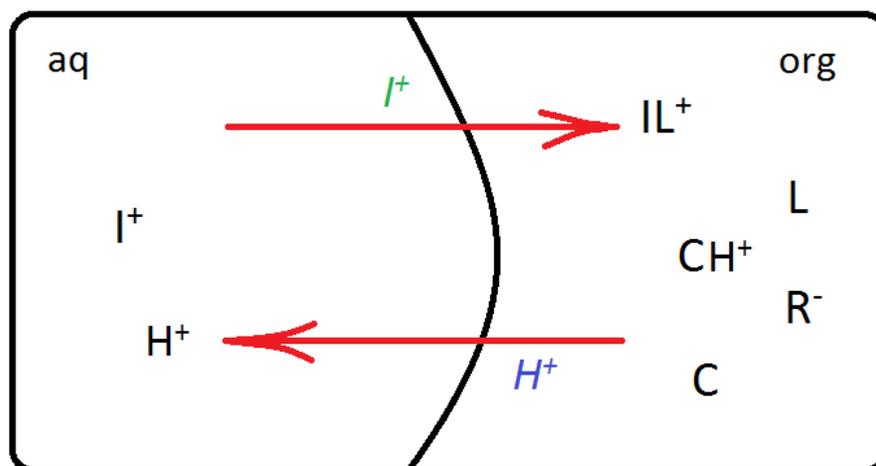
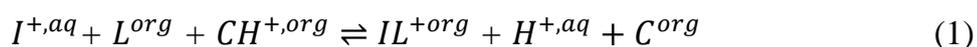


Рис. 1. Механизм отклика оптодной мембраны, содержащей нейтральный ионофор L , однозарядный аналит I^+ , катионообменник R^- с однозарядным гидрофильным противоионом M^+ , нейтральный индикатор C с протонированной формой CH^+ ; aq , org — фаза раствора и фаза мембраны соответственно.

Уравнение ионного обмена между оптодной и водной фазами имеет следующий вид:



Основываясь на уравнениях электронейтральности и материального баланса в фазе сенсора, можно получить уравнение отклика, в неявном виде связывающее аналитический сигнал оптода $\alpha = [C]/C_{tot}$ (доля депротонированного индикатора в фазе мембраны) с измеряемым соотношением активностей аналита и протона в растворе [6]:

$$\frac{a_I}{a_H} = \frac{1}{K_{exch}} \frac{\alpha}{(1 - \alpha)} \left(\frac{R_{tot} - (1 - \alpha)C_{tot}}{L_{tot} - (R_{tot} - (1 - \alpha)C_{tot})} \right), \quad (2)$$

где K_{exch} — константа ионного обмена (равновесия (1)), индекс tot означает общие (брутто) концентрации компонентов в мембране.

Отклик катион-селективного оптода (это зависимость оптического сигнала от логарифма активности аналита) задан неявной функцией от составов раствора и оптода [7] и обычно представляет собой S-образную кривую зависимости оптического сигнала от логарифма активности аналита (при заданном рН), либо от рН (при заданной активности катиона), либо от логарифма отношения активностей аналита и протона в растворе. Пример такой кривой представлен на Рис. 2.

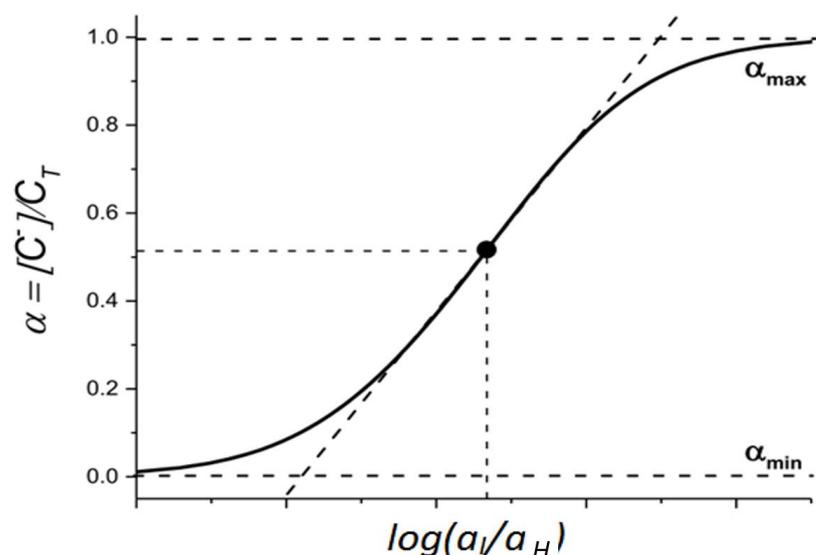


Рис. 2. Кривая оптодного отклика, построенная в координатах: α (доля депротонированной формы) – $\lg(a_i/a_H)$ (десятичный логарифм отношения активности ионов аналита к активности ионов водорода).

Важными характеристиками кривой отклика являются предел обнаружения, динамический диапазон, медиана отклика. Предел обнаружения – это минимальное и максимальное содержание аналита в пробе, которое можно надёжно отличить от фона данным методом. На Рис. 2 горизонтальные прямые соответствуют максимальному (сверху) и минимальному (снизу) значению доли депротонированной формы хромоинофора. Выделяют нижний предел обнаружения (на Рис. 2 соответствует точке пересечения нижней пунктирной прямой и касательной к графику к точке перегиба) и максимальный предел обнаружения (точка пересечения верхней горизонтальной прямой и касательной к точке перегиба). Медиана отклика (или середина рабочего диапазона) – это отрезок, соответствующий половине максимума оптического сигнала (достигается при $\alpha = 0,5$). Рабочий диапазон – это концентрационный диапазон, то есть определяемый с помощью кривой отклика интервал активностей.

Одним из основных ограничений работы оптических сенсоров является время проведения анализа (время отклика, время экспонирования). Зависимость изменения оптических свойств от времени обычно описывается затухающей экспоненциальной зависимостью (Ур. 3), а скорость этого процесса определяется диффузией ионов (Ур. 4).

$$y = y_0 + Ae^{\frac{-x}{\tau}}, \quad (3)$$

где τ – это характеристическое время (является параметром системы и показывает скорость затухания экспоненты).

$$t_{95\%} = 1,13 \frac{d^2}{D_m}, \quad (4)$$

где d – толщина мембраны, $t_{95\%}$ - время достижения равновесия на 95 %, D_m – средний коэффициент диффузии частиц в мембране.

Согласно рекомендациям IUPAC, время отклика – это время, необходимое для достижения однородной концентрации форм индикатора во всем объеме сенсорной фазы. Обычно за время отклика принимают время, за которое концентрации соответствуют 95% от равновесных значений.

Аналитическим сигналом в оптодах является изменение определённого оптического свойства (светопоглощение, интенсивность люминесценции и пр.) в ответ на количественное содержание аналита в контактирующем образце. Оптический сигнал можно зарегистрировать даже при помощи цветной фотокамеры и получить информацию о содержании аналита в растворе с помощью цифровой обработки изображений. Также зарегистрировать изменение оптических свойств можно с помощью спектральных приборов (спектрофотометра для регистрации поглощения видимого света, спектрофлуориметра для регистрации люминесценции и т.д.).

1.2. Применение оптических сенсоров в реальных объектах

Оптоды закономерно представляются перспективными кандидатами для создания неинвазивных гибких сенсорных платформ для использования *in situ*, однако их возможности в данном направлении разработаны недостаточно. Мембраны оптических сенсоров могут размещаться на оптических волокнах, на планарных подложках, а также изготавливаться в виде микро- и наночастиц. Платформы оптических сенсоров на основе планарных подложек позволяют интегрировать на одном субстрате селективные к разным анализатам датчики (мультианалитные массивы сенсоров). В работе [13] для проведения мультианалитного анализа использовались оптические сенсоры в форме планшетов для микротитрования, изготовленные путем отливки мембран в стандартную 96-луночную полипропиленовую пластину. Помимо этого, альтернативным вариантом нанесения оптодов был метод трафаретной печати

мембран на оптически прозрачном субстрате с 96-луночным паттерном. Оптоды в форме планшетов для микротитрования были использованы для одновременного определения катионов натрия и калия.

Тема мультианалитного анализа с помощью оптических сенсоров, нанесенных на планшет для микротитрования, также рассмотрена в работе [14]. В ней оптическая система использовалась для определения полианионов (таких как ксантан, альгинат, каррагинан, пентозан) в пищевых продуктах (Рис. 3).

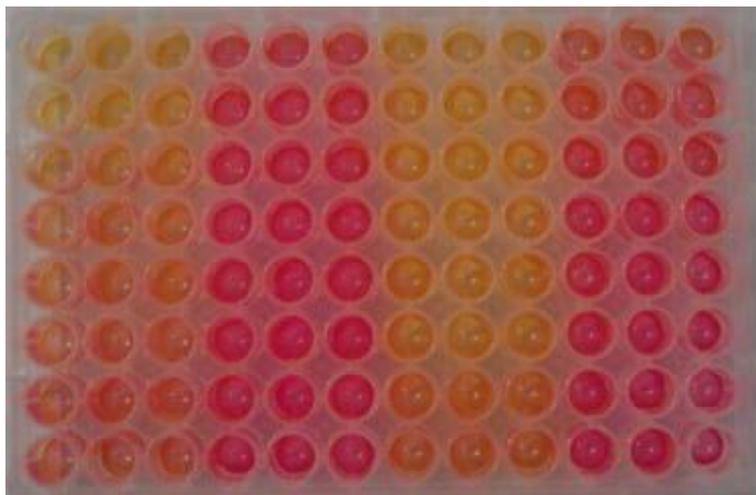


Рис. 3. Вид микропланшета после титрования: 0 мкг/мл каррагинана (первая половина планшета) и 10 мкг/мл каррагинана (вторая половина пластины) с протамином при 540 нм. Желтые лунки: поликатионный титрант взаимодействует с полианионным анализом. Оранжевые лунки: взаимодействие между поликатионным титрантом и полианионным анализом уже закончено, и избыток титранта начинает взаимодействовать с чувствительной к поликатиону пленкой. Розовые лунки: более высокие концентрации титранта взаимодействуют с гораздо большим количеством красителя (каждая группа из трех лунок содержит одинаковую концентрацию титранта) [14].

Однако, анализ проводился в лабораторных условиях с длительной и сложной пробоподготовкой. В работе [15] аналогичным образом при помощи оптодов на основе флуоресцеиновых индикаторов, нанесенных в лунки полипропиленового планшета, анализировали анионные поверхностно-активные вещества.

Интересный мультианалитный массив с возможностью применения *in vivo* был представлен авторами [16]. Конструкция представляла собой дисперсию оптодных

микрочастиц, изменяющих цвет в зависимости от содержания аналита в растворе, в полиэтиленгликоле. Частицы были инкапсулированы в ацетат целлюлозы (Рис. 4).

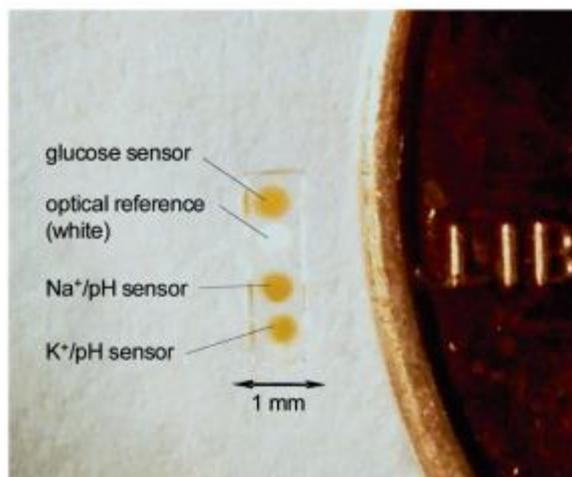


Рис. 4. Массив сенсоров на основе оптодных микрочастиц, селективных к катионам калия, натрия и глюкозы [16].

Предполагалось, что такая сенсорная система способна производить одновременный мониторинг pH среды, катионов калия и глюкозы *in vivo*. Однако устройство не было протестировано в живых системах.

В литературе есть примеры успешно апробированных в реальных условиях аналитических систем. Например, созданы датчики пота для контроля метаболического статуса спортсмена во время тренировки [18-20]. Но подавляющее большинство *in situ* анализаторов биологических жидкостей имеют электрохимическую природу, за счет чего усложняется их конструкция, появляется необходимость в источнике питания, электрических контактах, микрофлюидных чипах, периодической градуировке, затрудняется регистрация и интерпретация сигнала неподготовленным пользователем. При помощи таких электрохимических устройств авторами предлагается определение глюкозы [20-22], мочевой кислоты [22-23] и тирозина [23], лактат-аниона и аскорбиновой кислоты [22], кортизола [24], некоторых ионных компонентов [20, 22, 25] для диагностики состояния спортсменов при нагрузке, подагры, стресса, сахарного диабета.

Использование оптических систем могло бы упростить анализ, но в литературных источниках описано совсем мало примеров сенсорных массивов оптодов, которые могут быть использованы для анализа реальных систем *in situ*. К

таким работам можно отнести, например, хорошо зарекомендовавшие себя планарные массивы оптодов, позволяющие с помощью детектирования затухания люминесценции определять изменение концентрации кислорода в биоплёнках в режиме on-line [27-28]. Авторы работы использовали полимерную матрицу, а также полученную золь-гель – методом матрицу. В данной работе оптический сигнал регистрировался методом фотографирования с помощью цифровой фотокамеры (Рис. 5, 6). Камера представляла собой CCD-камеру с монохромным охлаждением PCO или цветную CMOS-камеру μEye . [27].

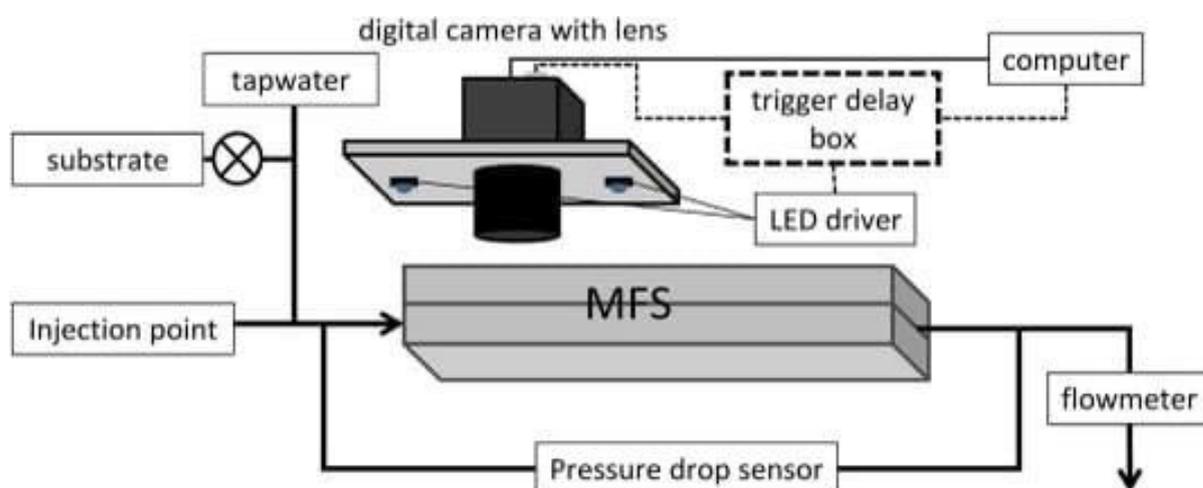


Рис. 5. Схематическое описание мембранного симулятора загрязнения, включающего систему смешивания воды, датчик падения давления, расходомер и установку визуализации для обнаружения O_2 [26].

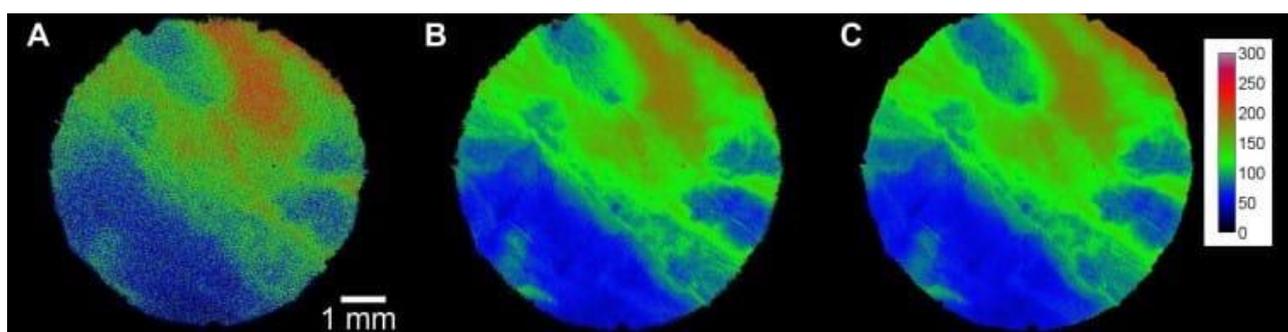


Рис. 6. Изображения распределения O_2 в инкубаторе для роста биопленок, полученные с помощью 12-битной системы камер PCO с установленным объективом микроскопа (2-кратное увеличение). Концентрации O_2 на изображениях рассчитываются на основе визуализации в течение жизни (A), отношения изображений, полученных в бескислородных условиях и в оксигенированных условиях (B) и отношения интенсивности люминесценции изображений, записанных в бескислородных и

оксигенированных условиях, соответственно (С). Цветная полоса показывает концентрацию O_2 в мкмоль/л [26].

Авторы работы использовали полимерную матрицу, а также полученную золь-гель – методом матрицу. В данной работе оптический сигнал регистрировался методом фотографирования с помощью цифровой фотокамеры. Также актуальным является применение оптических сенсоров для анализа в режиме on-line для питательных растительных (гидропонных) сред. В работах [28-29] в режиме реального времени производился мониторинг гидропонных сред на содержание калия и кальция с использованием объемных оптодов. Перспективным оказывается использование оптодов в медицинских исследованиях за счёт экспрессности анализа и микроразмеров анализируемой пробы. Авторам [30] благодаря использованию рН-селективных оптических сенсоров по образцам слёзной жидкости удалось получить хорошие результаты при диагностике синдрома сухих глаз, главным образом, им удалось решить проблему сложности отбора проб слезной жидкости (для клинического анализа требуется проба от 40 до 100 мкл, для анализа с использованием оптодов – достаточно 20 мкл жидкости).

Оптоды, в особенности люминесцентные, отличаются высокой амплитудой сигнала. Это позволяет использовать их для визуализации и зондирования при решении практических задач в области биологии и биотехнологии. Например, авторам [31] удалось визуализировать распределение кислорода и рН на человеческой коже при распылении плёнообразующего люминесцирующего оптодного спрея. Сенсорный спрей использовался для визуализации физиологического заживления участка донорской кожи на вентральном бедре пациента (Рис. 7).

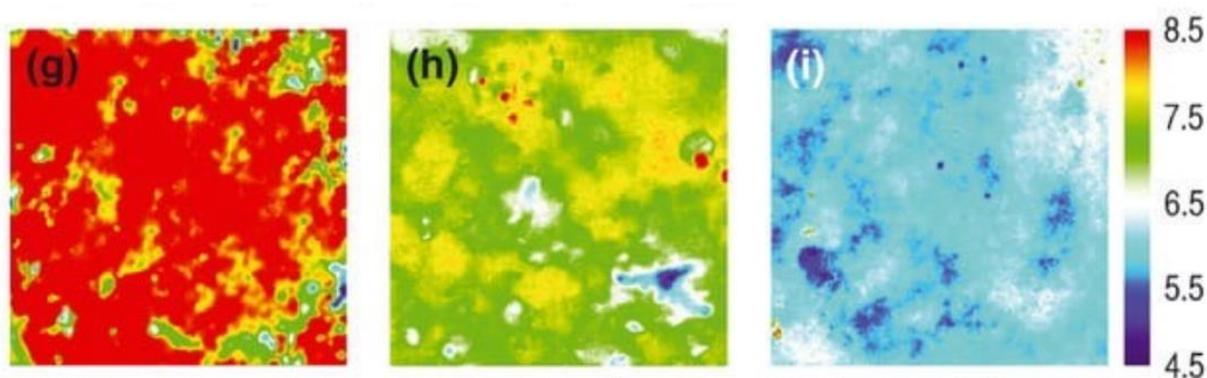


Рис. 7. Визуализация физиологического заживления участка донорской кожи вентрального бедра в выделенной области (ROI). Распределение pH в области ROI: (g) – в 1-й день после операции, (h) – 6-й день после операции, (i) – 14-й день после операции. Голубоватые цвета указывают на окружающую неповрежденную (или почти неповрежденную) кожу. Зеленый и красный цвета представляют области длительного воспаления и частичной грануляции [31].

В другой исследовательской группе [32] путём иммобилизации оптодов внутри агарозной мембраны (среде для размножения бактерий) удалось получить визуализацию кислотности среды в период всего жизненного цикла развития микроорганизмов. В работе [33] удалось применить производные бор-азадипиррометена для изготовления фотоиндуцированных флуоресцентных датчиков с модуляцией электронного переноса. Данные датчики были применены в экологическом исследовании кораллового рифа: изучалось, как меняется pH поверхности рифа в зависимости от фотосинтетической активности водорослей-симбионтов.

Для практического применения массивов оптических сенсоров важно оптимизировать сам процесс проведения анализа. Этими вопросами занимались в работе [35]. Авторы вырабатывали системный подход к вычислению расположения оптических датчиков для различных геометрий, типов биологических тканей и областей применения.

При анализе литературных источников выявлено, что механизмы функционирования оптических сенсоров широко исследованы и потенциально они могут быть использованы *in situ*. Но существует ряд ограничений, которые не позволяют эффективно применять оптоды в этих целях. Эти ограничения можно классифицировать, условно разделив сенсорную систему для применения в реальных объектах на 4 слоя и оптимизировать каждый по-отдельности (Рис. 8). Рассмотрим массив на основе колориметрических датчиков, пригодных для фотографирования в качестве метода регистрации сигнала.

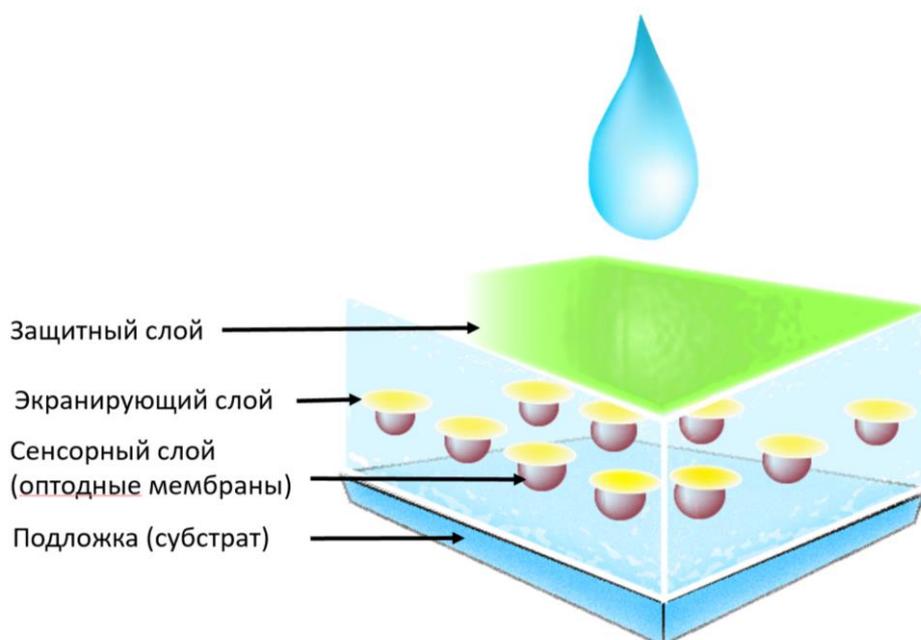


Рис. 8. Основные слои оптодной платформы.

Первый слой (самый верхний, Рис. 8) – защитный. Он позволяет решить проблему загрязнения сенсорного слоя макромолекулами, содержащимися в биологических жидкостях. Помимо этого, он может выполнять и другие функции, например, предотвращать деактивацию фермента в случае ферментных сенсоров, блокировать буферные анионы среды, предотвращать образование сгустков в случае анализа крови. Для этого его дополнительно функционализируют, к примеру, иммобилизацией полианионов гепарина. Поскольку биологические жидкости и другие анализируемые образцы являются водными растворами, защитный слой должен быть гидрофильным (обратимо пропускать ионы водной среды). Наиболее часто используют ацетат и другие производные целлюлозы, а также материалы с варьируемой гидрофильностью (НЭМА-РЕGМА сополимеры) Основной проблемой при использовании защитного покрытия является увеличение времени отклика сенсоров, за счет, конечной толщины защитного слоя. К тому же гидрофильные полимеры часто склонны к сильному набуханию, что приводит, во-первых, к механической неустойчивости конструкции, а во-вторых, к сильному гистерезису отклика, особенно в образцах малого объема. Защитный слой, помимо инертности относительно взаимодействия с липофильными компонентами оптодной мембраны, должен плотно контактировать с сенсорным слоем, иметь минимальную толщину, оптимальный размер пор.

Еще одной распространенной проблемой в случае использования оптических сенсоров является собственный цвет образца либо автолюминесценция. В случае эмиссии как аналитического сигнала можно подобрать индикаторы, излучение которых не поглощается исследуемым образцом, а также длины волн возбуждения, при которых не происходит люминесценция образца. В случае же колориметрических сенсоров, которые обычно являются прозрачными пленками, проблему оптических помех со стороны образца можно решить при помощи экранирующего непрозрачного слоя. Такой слой должен хорошо пропускать аналит к поверхности сенсорной мембраны и при этом служить непрозрачным, в идеале – белым фоном для фотографирования сенсоров. Само собой, в случае использования такого слоя подложка должна быть прозрачной, т.е. датчики должны быть доступны для фотографирования. Такой слой можно изготовить путем диспергирования микрочастиц с хорошим отражением, например, диоксида титана, в ионопроводящем геле. Способ кажется простым, но мало разработан на практике: в [12] применяли дисперсию частиц тефлона в полиэтиленгликоле, что позволило эффективно отфильтровать цвет цельной крови.

Третий слой – сенсорный. Оптимизировать его можно как с точки зрения химических характеристик (подбор селективных компонентов, оптимизация состава оптодной композиции, подбор матрицы, индикатора и пластификатора), так и с точки зрения процесса изготовления (геометрия и способ нанесения оптодных мембран, объем наносимой капли раствора сенсорной композиции и т.п.). Для нанесения оптодных мембран в зависимости от аналитических задач наиболее часто используются капельное нанесение мембран на подложку (как вручную, так и с помощью автоматизированных систем дозирования) и нанесение мембран методом спин-коатинга (получение тонких плёнок на раскрученной подложке).

Нижний, четвёртый слой – подложка (субстрат). Субстрат может быть как гидрофильным, так и гидрофобным. Он не должен взаимодействовать с пластификатором и другими компонентами сенсорного слоя. При этом должна наблюдаться высокая адгезия липофильного сенсорного слоя к подложке. За счёт использования прозрачной подложки можно расширить возможности регистрации оптического сигнала методом фотографирования (фотографировать с различных направлений). Помимо этого, материал подложки должен быть механически стабилен.

Тонкость и гибкость подложки может расширить возможности использования *in situ*. Из непрозрачных материалов для подложки эффективно используется тефлон, помимо прочего выступающий в роли внутреннего баланса белого. В [36] авторы предлагают использовать в качестве подложки полипропилен для осуществления мультианалитного анализа пота.

На сегодняшний день в большинстве мировых научных групп, занимающихся разработкой химических сенсоров, активно проводятся исследования в области оптохимических датчиков (оптодов) как в перспективном и бурно развивающемся направлении неразрушающего анализа [8-11]. При этом в литературе описано не так уж много электрохимических и оптических сенсорных платформ, пригодных для *in situ* определения ионных компонентов в микрообразцах со сложной матрицей. Поэтому целью работы является разработка универсального подхода к созданию массивов оптических сенсоров для решения прикладных аналитических задач *in situ*. Разработанные и рассмотренные в работе массивы будут направлены на мониторинг таких жидкостей, как пот, кровь и гидропонная среда.

Для достижения всех задач был составлен подробный план исследования. Красным обозначены задачи, которые были выполнены экспериментально. За счёт более глубокого литературного поиска удалось оптимизировать протокол исследования и оставшиеся стадии проведения работы.

План исследований:

1. Разработка массива датчиков для анализа пота на кожном покрове (актуальными являются датчики пота для мониторинга состояния спортсменов, также оптические сенсорные платформы для проведения потового теста – необходимого этапа ранней диагностики муковисцидоза). В качестве аналитов для создания системы тестирования пота были выбраны катионы калия, натрия и анионы хлора.

- Подбор составов сенсорных слоев для получения отклика в физиологическом диапазоне активностей, селективных к катионам натрия, калия и хлорид-анионам на планарной (тефлоновой) подложке.
- Подтверждение работоспособности мультисенсорной системы, позволяющей одновременно определять содержание трёх исследуемых аналитов

(экспериментальное подтверждение возможности проведения мультианалитного анализа).

- Подбор оптимального субстрата, удовлетворяющего основным требованиям для анализа пота *in situ*.
- Исследование работоспособности системы с экранирующим слоем (в качестве экранирующего слоя использовать диоксид титана).
- Подбор оптимального защитного слоя.
- Изготовление и апробирование массива оптодов, селективных к ионам натрия, калия и хлора, для использования непосредственно на кожном покрове.

2. Разработка системы для анализа крови.

- Подбор составов сенсорных слоев для получения отклика в физиологическом диапазоне активностей, селективных к катионам натрия, калия и хлорид-анионам на планарной (тефлоновой) подложке.
- Подбор оптимальной подложки.
- Исследование применимости защитных слоёв для анализа состава крови на ионы калия, натрия и хлора (все предложенные мембраны представлены в экспериментальной части).
- Проверка работоспособности защитных слоёв при непосредственном контакте с кровью.
- Создание прототипа тестовой системы, который может быть использован в диагностических целях при анализе крови.

3. Разработка платформы для анализа гидропонных сред

- Подбор составов сенсорных слоев для получения отклика в необходимом диапазоне активностей, характерном для гидропонных питательных сред.
- Теоретический поиск и экспериментальная проверка наиболее оптимальных планарных подложек для проведения анализа в режиме *on-line*.
- Исследование и экспериментальная апробация потенциальных кандидатов в качестве защитного слоя, применимых для гидропонных сред.
- Создание и тестирование готового прототипа, способного определять важнейшие для гидропоники аналиты по градуировочным зависимостям.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы и материалы

Для изготовления оптодных мембран использовались следующие реактивы: нейтральный хромоионофор этиловый эфир тетрабромфенолфталеина (Ch VIII, TPBE), нейтральный хромоионофор 9-(диэтиламино)-5-[(2-октидецил)имино]бензо[а]-феноксазин (Ch III, EТН 5350), калий-селективный нейтральный ионофор 2-додецил-2-метилпропан-1,3-диил бис[N-[5'-нитро(бензо-15-краун-5)-4'-ил]карбамат] (К III), натрий-селективный нейтральный ионофор тетраэтиловый эфир (4-трет-бутилкаликс[4]арен)-тетрауксусной кислоты (Na X, EТН 9009), 4,5-диметил-3,6-диоктилокси-о-фенилен-бис(трифторацетат ртути) (СI II, EТН 9009), нейтрально заряженный хромоионофор 9-(диметиламино)-5-[4-(15-бутил-1,13-диоксо-2,14-диоксанадещил)фенилимино]бензо[а]-феноксазин (Ch I, EТН 5418), нейтрально заряженный хромоионофор 9-(диэтиламино)-5-[4-(16-бутил-2,14-диоксо-3,15-диоксаэйкозил)фенилимино]бензо[а]феноксазин (Ch II, EТН 2439), тетра[3,5-бис(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-метокси-2-пропил)фенил]борат натрия (NaHFPB), пластификатор бис(2-этилгексиловый)эфир себаценовой кислоты (DOS), ионная добавка тетракис(4-хлорфенил)борат калия (КТрСIРВ), растворители тетрагидрофуран (ТГФ) и циклогенсанон (ЦГ). Все используемые реактивы произведены Sigma-Aldrich (Швейцария): DOS, КТрСIРВ, ПВХ, ТГФ, ЦГ. В качестве реактивов для приготовления исследуемых растворов использовались KNO₃, NaCl, LiCl, KCl марки «осч» производства «РЕАХИМ» (Украина).

Были опробованы материалы – кандидаты на роль подложки (субстрата) для массива оптических сенсоров. Использовали следующие материалы: предметное стекло (толщина 1 мм, Carl Zeiss, Германия); листы поли(метилметакрилата), поликарбоната, тефлона (Shaff Piano Supply Co., США); полиуретан (водонепроницаемый лейкопластырь Teneris); полипропиленовая пленка (клеякая лента с удаленным липким слоем производства 3M, США); полиэфирные листы с гидрофильным покрытием (9984, толщина 99 мкм, 3M, США).

Помимо подложек, полимерные материалы исследовались в качестве защитного слоя: полиэфирные листы с гидрофильным покрытием (9984, толщина 99 мкм, 3M, США); мембранные фильтры (Whatman Cyclopore polycarbonate and polyester

membranes, размер пор 0.1 мкм), Рис. 9а; армированный ацетат целлюлозы (размер пор 0.2 мкм), Рис. 9б; нитроцеллюлоза (размер пор 0,22 мкм), Рис. 9в; поликарбонатная трековая мембрана (размер пор 0,2 мкм), Рис. 9г.

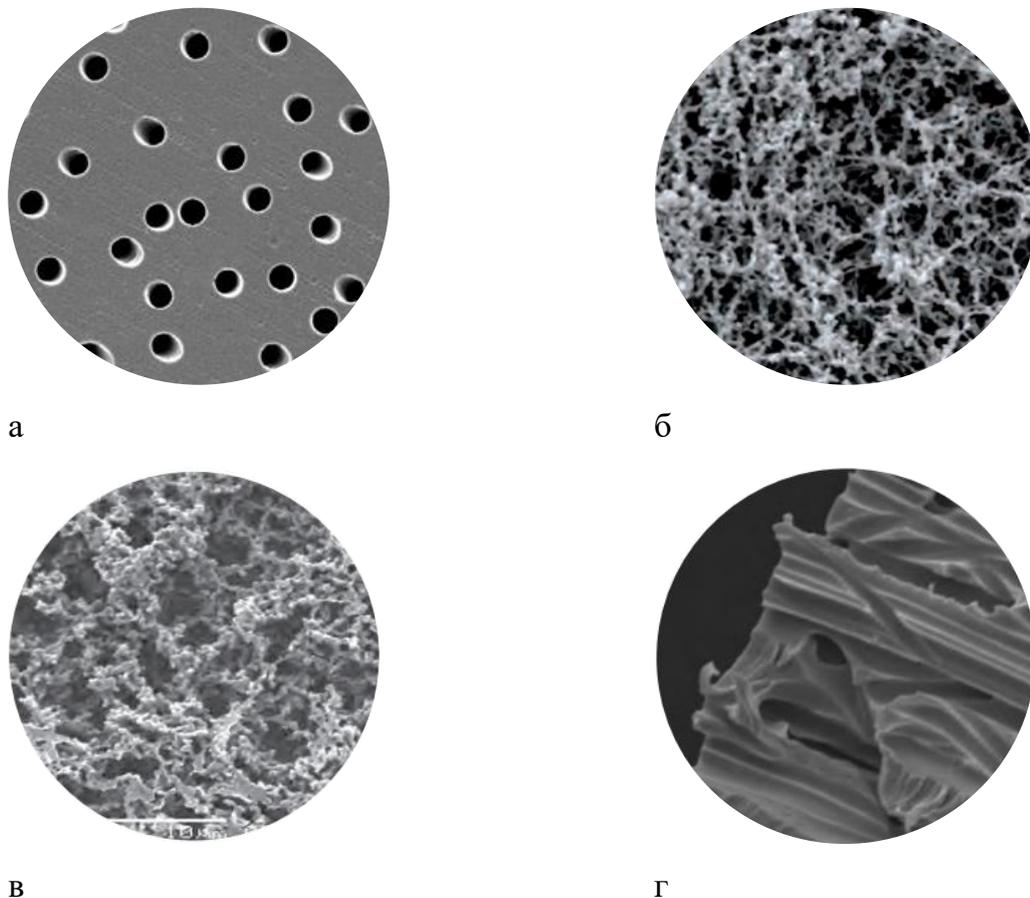


Рис. 9. SEM-изображения мембран, исследованных в качестве защитного слоя: а – поликарбонатная трековая мембрана (Whatman); б – ацетат целлюлозы; в – нитроцеллюлоза; г – поликарбонатная трековая мембрана (все – GVS Life Sciences).

Водные растворы готовились на деионизованной воде путём растворения точной навески соли в воде и дальнейшего разбавления. При необходимости фиксировался рН. В качестве кислотно-основной буферной системы использовалась 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота (HEPES) 0.01 М (чистотой более 99.5 %, производства «Carl Roth» (Германия)).

2.2. Оборудование

Значения рН растворов измеряли с помощью стеклянного электрода ИСЛ 43-07, насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения («Измеритель», Гомель, Беларусь) и рН-метра/иономера («Экотест-120», Россия). Регистрация аналитического сигнала

(изменение цвета) производилась при помощи стереомикроскопа МСП-2 (ЛОМО, Россия) с встроенной цифровой камерой (МС-5), подключенной к компьютеру.

Аликвоты отбирали при помощи механических дозаторов (Ленпипет, Россия), мембранную композицию для изготовления оптодов отбирали микродозатором (объем дозирования 0.1–2.5 мкл, Biohit, Финляндия) и шприцем для хроматографических исследований объемом 10 мкл (Hamilton). В качестве источников света использовалась лампа накаливания (Natural light, 60 Вт, Philips). Мембранная композиция растворялась на роллер-миксере марки J.P. Selecta, модель MOVIL-ROD (Испания).

2.3. Технология изготовления жидкой мембранной композиции, оптодов и массива для измерения

Мембранная композиция с массой сухого вещества 50 мг готовилась растворением необходимых количеств ПВХ и пластификатора (DOS) в 0.35 мл ТГФ. Массовая доля ПВХ составляла 36 %. После этого добавлялись активные компоненты: ионофор, ионная добавка (КТрСІРВ) в виде аликвоты более концентрированного раствора в ЦГ. Такой способ приготовления позволил избежать взятия очень маленьких навесок и обеспечить высокую точность задания оптодной мембраны. Мембранная композиция во всех случаях представляла собой однородную жидкость с различной окраской в зависимости от сочетания различных активных компонентов.

Массив датчиков представлял собой стеклянную или тефлоновую, или полипропиленовую подложку. В случае стеклянной подложки высверливали на заданную глубину отверстия для нанесения 8, 19 или 24 оптодных мембран). Диаметр полученных отверстий составил 1.3 мм, глубина — 150–200 мкм. Раствор мембранной композиции в ТГФ объемом ~ 0.1 мкл наносился при помощи механического микродозатора или хроматографического шприца в каждое из углублений. Толщина мембран составила в области центра 10–15 мкм. Фотография готового датчика представлена на Рис. 10.

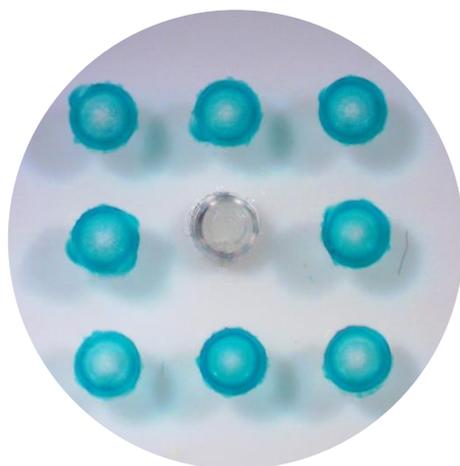


Рис. 10. Фотография готового массива колориметрических объёмных оптодов.

Обработка аналитического сигнала осуществлялась следующим образом: после нанесения мембран на стеклянную подложку через 2–3 минуты наносили анализируемый раствор, далее оптоды фотографировались. После снимки подвергались цифровому анализу цвета: цвет датчика оптического сенсора преобразовывался в вектор в пространстве RGB, и проводилось количественное описание соответствующих интенсивностей цветовых компонент (Image J Freeware). Причём интенсивность каждой компоненты, являясь функцией активности аналита в растворе, находится также в корреляции с такими факторами, как толщина оптодной мембраны, освещённость, положение источника освещения и т. д. Чтобы минимизировать их влияние использовалась цветокоррекция по балансу белого и нормализация аналитического сигнала, осуществляемая путём деления одной цветовой компоненты на другую.

2.4. Проведение измерений и обработка экспериментальных данных

Запись снимков цифровой камерой производилась в затемненной комнате при белом освещении. Для этого источники света и микроскоп с цифровой камерой устанавливали в определенном месте и не меняли их расположение в течение всего эксперимента. Камера была установлена над массивом сенсоров, капля исследуемого раствора объемом 0.3–0.5 мл наносилась сверху на оптодные мембраны, сигнал регистрировали через 10 мин после контакта оптода с раствором. На Рис. 11 представлена фотография установки, применявшейся при фотографировании.

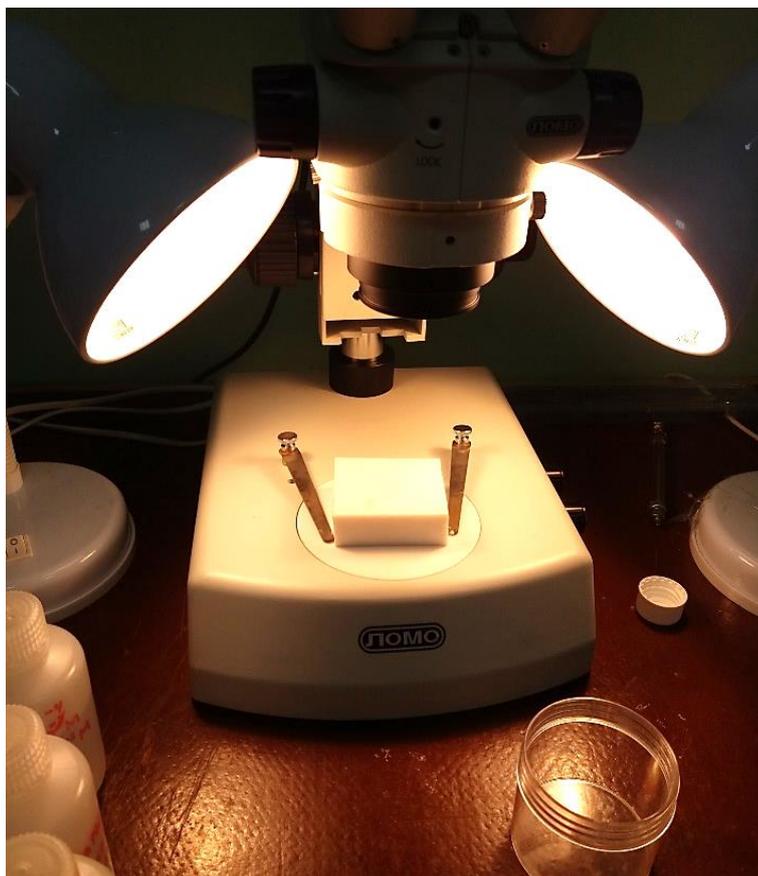


Рис. 11. Установка для проведения измерений с оптодами.

Расчет коэффициентов активности проводили по уравнению третьего приближения теории Дебая-Хюккеля (уравнение Дэвис). Обработка полученных данных производилась при помощи программы OriginPro 9.1.

3. Обсуждение результатов

3.1. Вывод теоретического уравнения отклика

Уравнение отклика для колориметрического оптода, содержащего нейтральный индикатор и положительно заряженный аналит мы рассмотрели в литературном обзоре. Сейчас рассмотрим более подробно механизм отклика для отрицательно заряженного аналита и нейтрального индикатора. Это необходимо для расчета составов хлорид-селективных сенсоров. Такая система включает в себя следующие компоненты (схематично отклик представлен на Рис. 12): нейтральный ионофор L , который имеет функцию I^- -селективного лиганда, комплекс аналита с ионофором IL^- , нейтральный индикатор C , селективно связывающийся с протоном CH^+ .

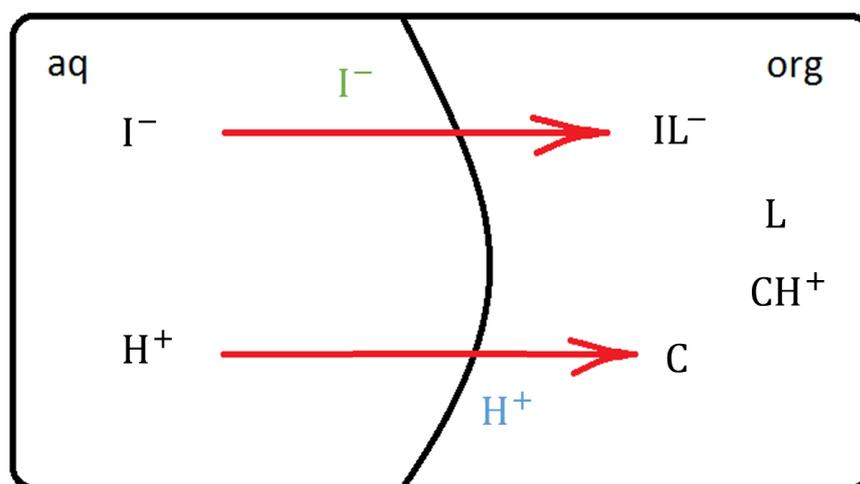
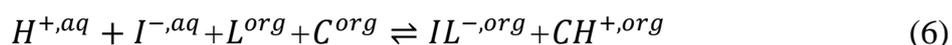


Рис. 12. Механизм отклика оптодной мембраны, содержащей нейтральный ионофор L , нейтральный индикатор C и заряженный аналит I^- ; aq , org — фаза раствора и фаза мембраны соответственно.

Запишем равновесие необменной сорбции, устанавливающееся между раствором и мембраной:



Тогда константа такого процесса выглядит следующим образом:

$$K_{coex} = k_X k_H \frac{K_{XL}}{K_a} \quad (7)$$

Здесь константа ионного обмена является произведением ионных коэффициентов распределения Эйзенмана, константы кислотности индикатора и

константы устойчивости комплекса ионофор-аналит (K_{IL^-}) [40]. Далее запишем выражения для материального баланса относительно ионофора (8) и индикатора (9) в мембране (органической фазе):

$$L_{tot} = [L] + [IL^-] \quad (8)$$

$$C_{tot} = [CH^+] + [C] \quad (9)$$

В выражениях (8) и (9) L_{tot} и C_{tot} – брутто-концентрации ионофора и индикатора в мембране соответственно. Далее запишем уравнение электронейтральности для фазы мембраны:

$$[CH^+] = [IL^-] \quad (10)$$

Решая систему уравнений (6)–(10) относительно активности аналита и активности парного иона в водной фазе, получим выражение отклика объёмного колориметрического оптода:

$$a_I a_H = K_{exch}^{-1} \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \frac{(1-\alpha)C_{tot}}{L_T - (1-\alpha)C_{tot}}, \quad (11)$$

где $\alpha = [C] / C_{tot}$ — доля депротонированного индикатора в фазе мембраны.

3.2. Оптимизация сенсорной системы для анализа пота

Первым этапом работы была настройка динамического диапазона отклика путём подбора состава оптодной мембраны для каждого аналита. Для проведения данного эксперимента сначала производился теоретический расчёт кривой отклика таким образом, чтобы середина динамического диапазона соответствовала физиологическому содержанию ионов в поте у здорового человека (средние значения: $a_{Na} = 5 \cdot 10^{-2}$ М, $a_K = 7 \cdot 10^{-3}$ М, $a_{Cl} = 3 \cdot 10^{-2}$ М).

Для расчёта использовались Ур. 2 (катионы натрия и калия) и Ур. 11 (хлорид-анион). Расчёт проводился при значении рН, соответствующему среднему рН пота (5.4). При этом оптический сигнал (α) был принят за 0,5. Константы ионного обмена и коэкстракции были взяты из литературных данных. В качестве подложки использовался тефлон, преимуществами которого являются гидрофобность поверхности, высокая интенсивность оптического сигнала. Помимо этого, тефлон выступает в роли внутреннего стандарта белого. Время экспонирования оптодных мембран при всех калибровках – 10 минут. Регистрация аналитического сигнала производилась методом фотографирования с помощью цветной фотокамеры

микроскопа. Используемые соотношения активных компонентов мембраны представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Оптимальные составы оптодных мембран, позволяющие определять содержание аналита в физиологическом диапазоне, характерном для пота.

<i>Ион</i>	<i>Индикатор (ммоль/кг DOS)</i>	<i>Ионофор (ммоль/кг DOS)</i>	<i>Ионообменник (ммоль/кг DOS)</i>
Na ⁺	ETH5418 (15)	Na X (75)	КТрСІРВ (37,5)
СІ ⁻	ETH5294 (25)	СІ II (40)	—
К ⁺	ETH5294 (30)	К III (ВМЕ-44) (150)	КТрСІРВ (75)

В качестве активных компонентов оптодной мембраны для определения активности катионов натрия использовались ETH5418 в качестве хромоионофора, ионная добавка КТрСІРВ и селективный к натрию лиганд – ионофор Na X. Согласно расчёту, физиологическое содержание катионов натрия соответствует середине отклика при следующем соотношении: ETH5418 = 15 ммоль/кг DOS, КТрСІРВ = 37.5 ммоль/кг DOS, Na X = 75 ммоль/кг DOS.

Для катионов К⁺ было определено оптимальное соотношение активных компонентов сенсорного слоя: ETH5294 = 30 ммоль/кг DOS, КТрСІРВ = 75 ммоль/кг DOS, К III = 150 ммоль/кг DOS.

Для хлорид-анионов середина отклика достигается при интересующих значениях активности при: ETH5294 = 25 ммоль/кг DOS, СІ II = 40 ммоль/кг DOS.

Полученные градуировочные зависимости изображены на Рис. 13.

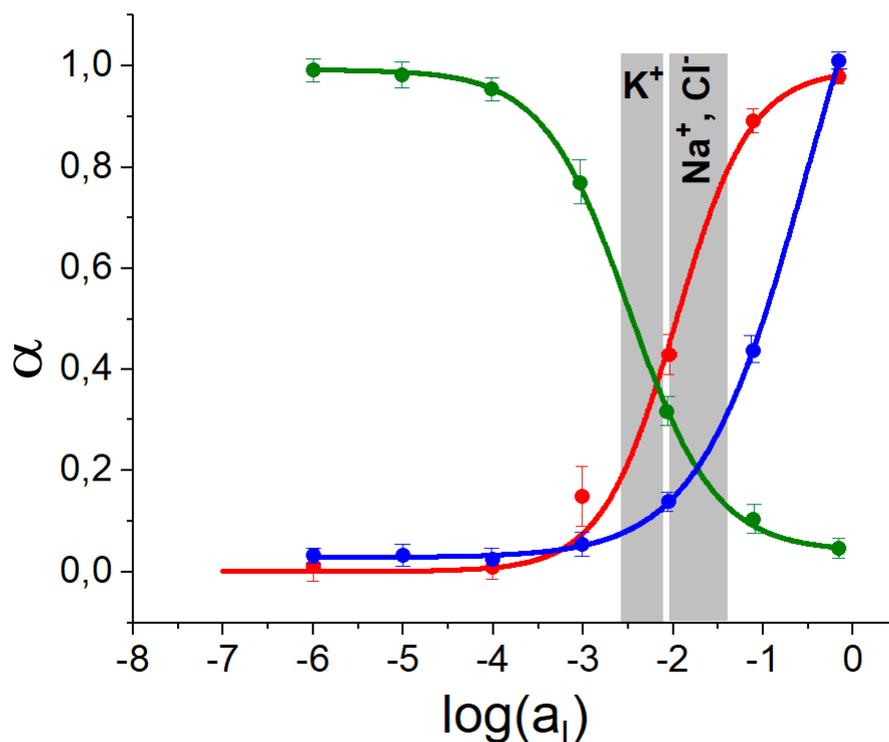


Рис. 13. График зависимости оптического сигнала (α) от логарифма активности соответствующего аналита (красная кривая – катиона калия для EТН5294 и К III; синяя кривая – катиона натрия для EТН5418 и Na X; зелёная кривая – хлорид-аниона для EТН5294 и Cl II) при рН = 5,4, 10^{-2} М НЕРЕС (серым цветом отмечены физиологические диапазоны в поте).

Из графика видно, что диапазоны отклика сенсоров в достаточной степени перекрывают физиологические диапазоны содержания ионов в поте и составляют от 2 до 3 порядков по оси активностей, что позволяет проводить измерения в широком диапазоне. Полученные результаты достаточно неплохо сходятся с рассчитанными по Ур. 2. Таким образом, путем применения уравнения отклика оптодов динамический диапазон сенсоров для трёх ионов был настроен для определения физиологических активностей аналитов. Следующим этапом была оптимизация условий проведения мультианалитного анализа. Задача состояла в проверке работоспособности массива трех типов оптодов для одновременного определения содержания трёх аналитов в растворе и определении перекрестного влияния ионов на отклик оптодных мембран. Анализ проводился на тефлоновой подложке в аналогичных условиях. Исследовались те же составы сенсорного слоя (время экспонирования 10 минут). Были приготовлены

стандартные растворы смеси катионов Na^+ , K^+ , Cl^- в диапазоне концентраций $10^{-5} \dots 10^{-1}$ моль/л. Результаты приведены на Рис. 14.

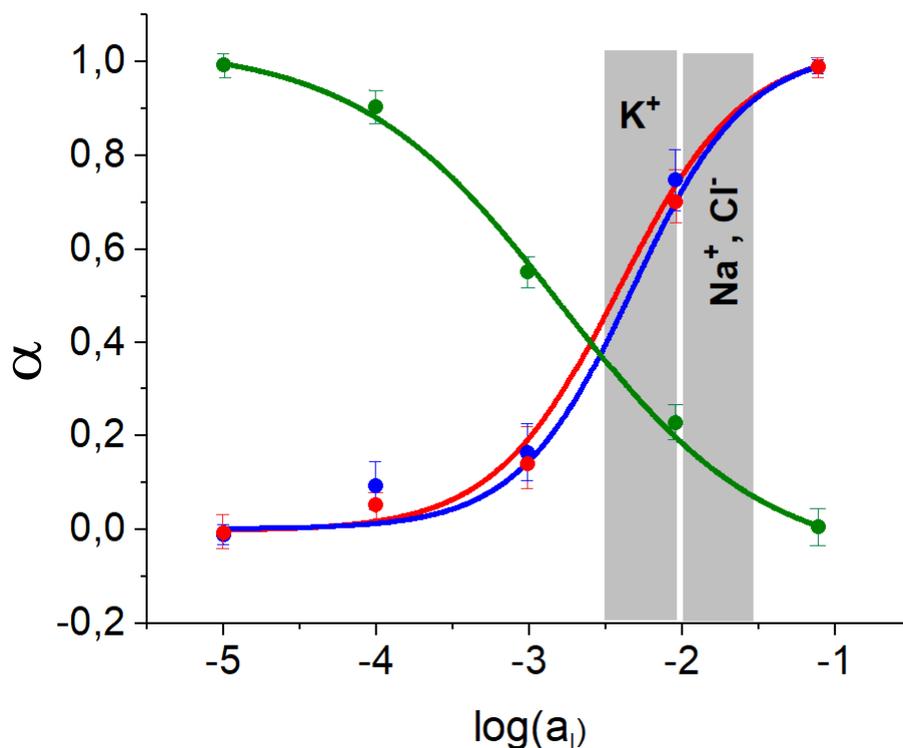


Рис. 14. Графики зависимости оптического сигнала (α) от логарифма активности аналита при калибровке сенсорной системы раствором, содержащем ионы K^+ , Na^+ , Cl^- (рН = 5,4, 10^{-2} М HEPES); красная кривая – для катиона калия; синяя кривая – для катиона натрия; зеленая кривая – для хлорид-аниона) (серым цветом отмечен физиологический диапазон соответствующего аналита в поте).

Из графиков видно, что диапазон отклика на катионы натрия и калия сместился в область более низких концентраций. Этот факт требует воспроизведения и дополнительного изучения, однако полученные зависимости позволяют определять интересующие ионы в необходимых диапазонах концентраций.

В итоге, удалось получить мультисенсорную систему, способную определять содержание катионов калия, натрия и анионов хлора при совместном присутствии в физиологическом диапазоне.

Следующий этап работы состоял в подборе оптимальных слоёв (подложки и защитного слоя) и отработки метода фотографирования для применения системы *in situ*. Сигнал обрабатывался путём цифрового анализа цвета сенсоров при помощи

программного обеспечения Image J, которое усредняет цветовые компоненты по пикселям выбранной области и позволяет количественно оценить их интенсивности. Сигнал представляет собой усреднение по всем пикселям изображения оптода. Он включает в себя отношение значений двух компонент цвета.

В качестве подложки, удовлетворяющей основным предъявляемым требованиям (прозрачность, химическая и механическая стабильность (инертность), большая амплитуда отклика), был выбран полипропилен. Этот полимерный материал обладает оптимальными характеристиками с точки зрения физических и химических свойств. Для крепления системы на кожу предполагалось использовать полиуретановый пластырь, который отлично пропускает кислород, тем самым не нарушая газообмен между кожным покровом и атмосферой, а также обладающий гипоаллергенными свойствами. Наиболее простым способом являлось бы прямое использование полиуретана в качестве подложки, но этот материал взаимодействует с активными компонентами сенсорного слоя и пластификатор переходит в подложку.

Поэтому в качестве подложки использовался более инертный прозрачный полимер – полипропилен, иммобилизованный на полиуретановый пластырь для крепления на кожу (Рис. 15).

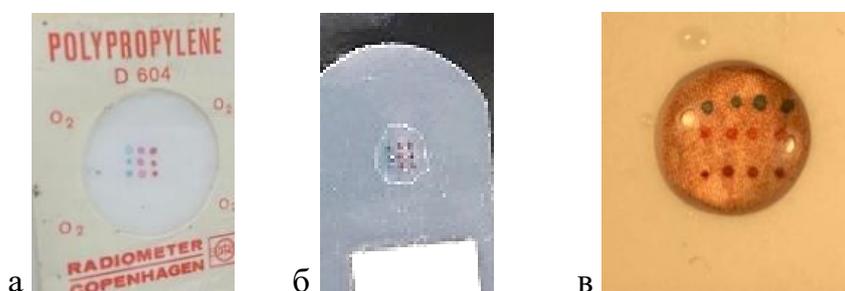


Рис. 15. а – оптические мембраны, нанесённые на полипропиленовую подложку на фоне тефлона; б – иммобилизованная на полиуретановый пластырь пропиленовая подложка; в – градуировка системы с тефлоновой маской.

Градуировка проводилась на белом фоне с использованием тефлоновой маски, которая за счёт гидрофобных свойств позволяла удалять всю жидкость между точками и концентрировать раствор только в области проведения анализа (не позволяла раствору растекаться по всей подложке и попадать на липкий слой полиуретана). Также тефлоновая маска выступала в роли баланса белого (Рис. 15в). Исследовались те же составы оптических мембран, что и в предыдущих случаях. В результате получены

калибровочные зависимости (примеры для калий- и хлорид-селективных сенсоров приведены на Рис. 16).

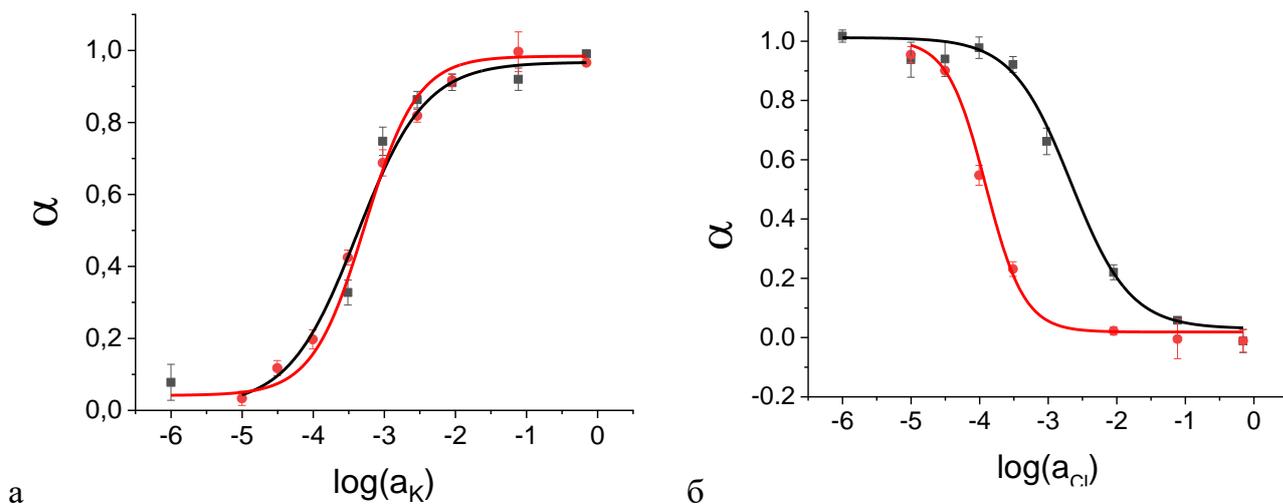


Рис. 16. Графики зависимости оптического сигнала (α) от логарифма активности аналита при калибровке мультисенсорной системы раствором, содержащем ионы K^+ , Na^+ , Cl^- ($pH = 5.50$, 10^{-2} М HEPES) в день нанесения (чёрные символы) и через 2 дня выдерживания в анализируемой среде (красные символы); приведены усредненные данные от 9 оптодов; сплошные линии – сигмоидный (больцмановский) фитинг; а – отклик калий-селективного оптода; б – отклик хлор-селективного оптода (подложка – полипропилен, иммобилизованный на полиуретановый пластырь).

При повторной регистрации оптического сигнала на полипропиленовой подложке кривые отклика имеют прежнюю форму. Ширина динамического диапазона отклика и амплитуда сохраняются, при этом наблюдается смещение медианы отклика в область более низких концентраций. Такой эффект наблюдается, скорее всего, за счёт вымывания активных компонентов мембраны. Поэтому длительность функционирования такой системы ограничена.

Важным параметром, зачастую ограничивающим применение сенсоров, является время отклика. Для системы без использования защитного слоя (только с подложкой) исследование времени отклика приведено на Рис. 17.

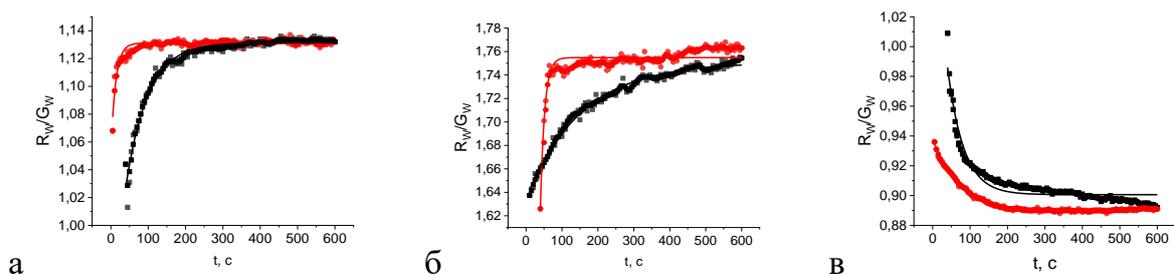


Рис. 17. Кинетические кривые зависимости оптического сигнала от времени при калибровке мультианалитной системы раствором, содержащем ионы K^+ , Na^+ , Cl^- ($pH = 5.50$, 10^{-2} М НЕРЕС) в день нанесения (красные символы) и через 2 дня выдерживания в анализируемой среде (чёрные символы): а – отклик калий-селективного оптода; б – отклик натрий-селективного оптода; в – отклик хлорид-селективного (подложка – полипропилен, иммобилизованный на полиуретановый пластырь; регистрация кривой отклика проводилась при переходах активностей аналита от 0,0010 до 0,0032 М); красные символы показывают калибровку при нанесении сенсоров на подложку, чёрные символы – через 2 дня выдерживания оптодов в анализируемом растворе.

Из кинетических кривых следует, что равновесие достигается на 95 % через 100-150 секунд, то есть не больше, чем через 3 минуты после начала анализа. Такое быстрое достижение равновесия обеспечивает возможность проведения анализа *in situ*. Помимо кинетических кривых, для данных сенсорных систем оценивалась воспроизводимость (сенсорная платформа была помещена на 2 суток в смешанный раствор с активностью аналитов 0,001 М). Из графиков видно, что время достижения равновесия на 95 % увеличилось примерно в 2 раза (от 100-150 секунд до 200-300 секунд). Это также говорит о частичном вымывании компонентов мембраны, в первую очередь пластификатора (который обеспечивает гибкость полимерных цепей матрицы ПВХ в полимерной мембране и, как следствие, увеличивает скорость диффузии аналита к селективным молекулам). Однако такое увеличение времени отклика не является критичным, поскольку анализ пота может и подождать 10 мин. Таким образом, в целом полипропиленовая подложка по основным характеристикам отклика является перспективным кандидатом для использования при анализе пота.

Следующим этапом исследования была апробация калибровки оптодных мембран на коже. Для этого был сфотографирован участок кожи предплечья (Рис. 18).



Рис. 18. а – фрагмент кожи, используемый в качестве фона для проведения калибровки; б – система, для которой проводилась калибровка.

В данном случае проводилось две калибровки в одинаковых условиях освещения, с одинаковыми растворами, временем экспонирования и другими параметрами, но с различными устройствами для фотографирования. Фотографирование производилось на цветную камеру микроскопа и на мобильный телефон. Далее представлено сравнение данных, полученных при регистрации сигнала на разных устройствах, на примере сенсоров калия и натрия (Рис. 19).

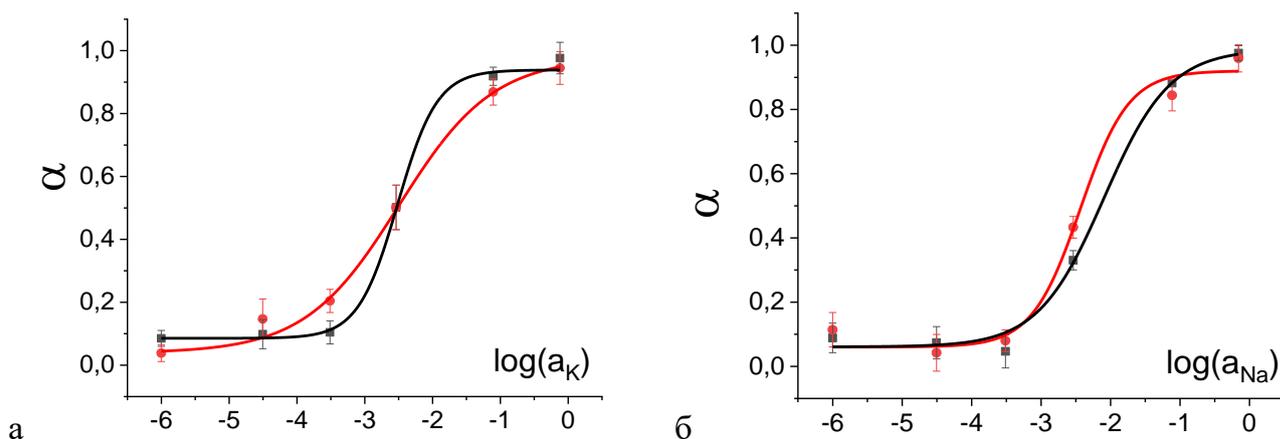


Рисунок 19. Графики зависимости оптического сигнала (α) от логарифма активности аналита при калибровке мультианалитной системы раствором, содержащем ионы K^+ , Na^+ , Cl^- ($pH = 5.52$, 10^{-2} М НЕРЕС) при регистрации оптического сигнала на камеру микроскопа (чёрные символы) и мобильного телефона (красные символы): а – отклик калий-селективного оптода, содержащего ЕТН5294 и К III; б – отклик натрий-селективного оптода, содержащего ЕТН5418 и Na X (подложка – полипропилен, иммобилизованный на полиуретановый пластырь; фон – имитация кожи).

Из представленных зависимостей видно, что изменение цвета фона (по сравнению с белым) приводит к увеличению погрешности, очевидна необходимость в

проницаемом белом слое, экранирующем цвет образца. Динамический диапазон остается прежним, за счёт увеличения погрешности чувствительность регистрации смартфоном снижается, но в целом регистрация оптического сигнала на коже позволяет получать информацию об активности аналита, необходимую в диагностических целях. При сравнении регистрации на фотокамеру микроскопа и телефона видно, что для микроскопа характерно более низкое значение погрешности. Но основные параметры отклика остаются постоянными и в практическом приложении более важным является возможность регистрации оптического сигнала при помощи фотокамеры телефона. В рамках данного блока осталось несколько нерешённых практических задач. Обозначим эти задачи для полноты картины исследования.

Во-первых, не исследована возможность использования экранирующего слоя для устранения негативных эффектов нестабильности источников освещения. Таким слоем будет служить плотная дисперсия частиц TiO_2 в каком-либо ионопроводящем геле.

Во-вторых, предполагается подробно исследовать различные защитные слои. Кандидаты, потенциально подходящие для этой цели, подобраны, но практически не исследованы. К защитному слою, в связи со спецификой использования (необходимость ношения на коже), предъявляется несколько требований, а именно: размер пор должен быть таким, чтобы исследуемые ионы легко проникали через защитный слой, мембрана защитного слоя должна быть тонкая; защитный слой должен быть инертным (не взаимодействовать с активными компонентами мембраны); а также быть биосовместимым, поскольку именно этот компонент будет непосредственно контактировать с кожей. В план исследований также включается проверка работоспособности прототипа в реальных условиях.

3.3. Оптимизация материалов для анализа крови

Разработка платформы для проведения анализа крови проводилась по тому же принципу, что разработка платформы для анализа пота. Были изготовлены оптоды составов, оптимальных для определения калия, натрия и хлорид-аниона в крови. Составы были оптимизированы ранее в научной группе. Регистрировался оптический сигнал оптодов в смешанных растворах. Результаты представлена на Рис. 20.

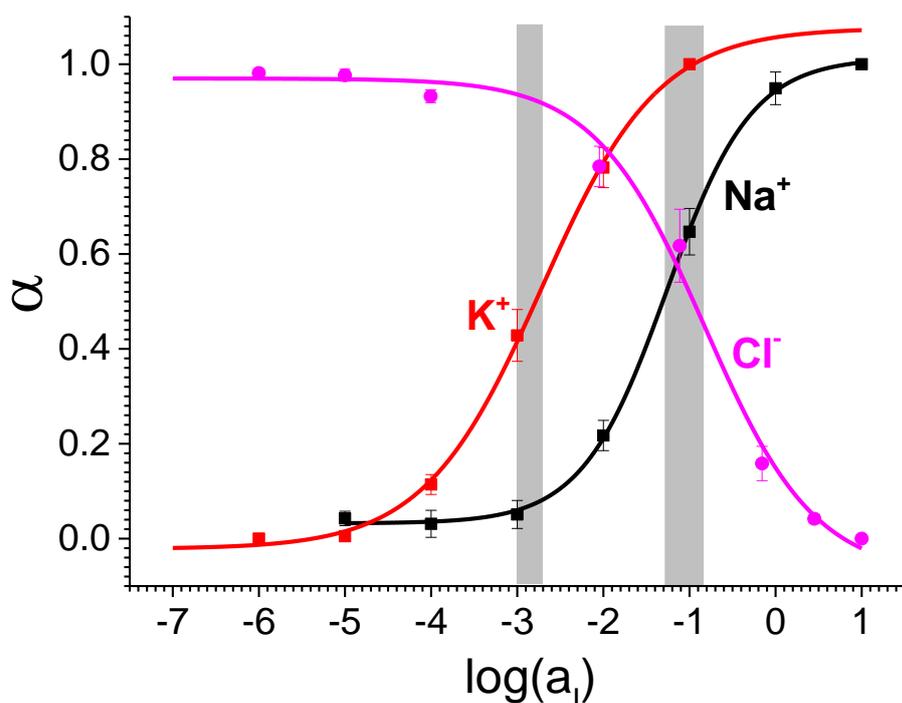


Рис. 20. Экспериментальные кривые отклика изготовленных K^+ -, Na^+ -, Cl^- -селективных оптодов, полученные в смешанных растворах солей соответствующих ионов при рН 7.4. Цветом выделены физиологические диапазоны концентраций катионов.

Для анализа крови наиболее важным составляющей является защитный слой, так как в ней содержатся клетки и крупные молекулы.

В качестве защитных покрытий для массива сенсоров были опробованы полупроницаемая полиэфирная мембрана 9984 производства 3М и диализный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 12-14 кДа (Orange Scientific, Бельгия).

Основной проблемой при использовании защитного покрытия является увеличение времени отклика сенсоров, за счет, во-первых, конечной толщины защитного слоя, а во-вторых, за счет неплотного прилегания защитного слоя к поверхности сенсоров. На Рис. 21 представлено сравнение усредненных времен отклика двух массивов оптодов, нанесенных на тефлоновую подложку: один из массивов был накрыт фильтром 9984 (б), а другой был контрольным (а). Фильтр соприкасался с оптодами своей гидрофобной стороной, тогда как гидрофильная сторона контактировала с раствором. Защитный слой удерживался на подложке при помощи цианакрилатного клея. Регистрировали переход цвета оптодов при смене контактирующего буферного раствора с рН=9.18 на буферный раствор с рН=1.68.

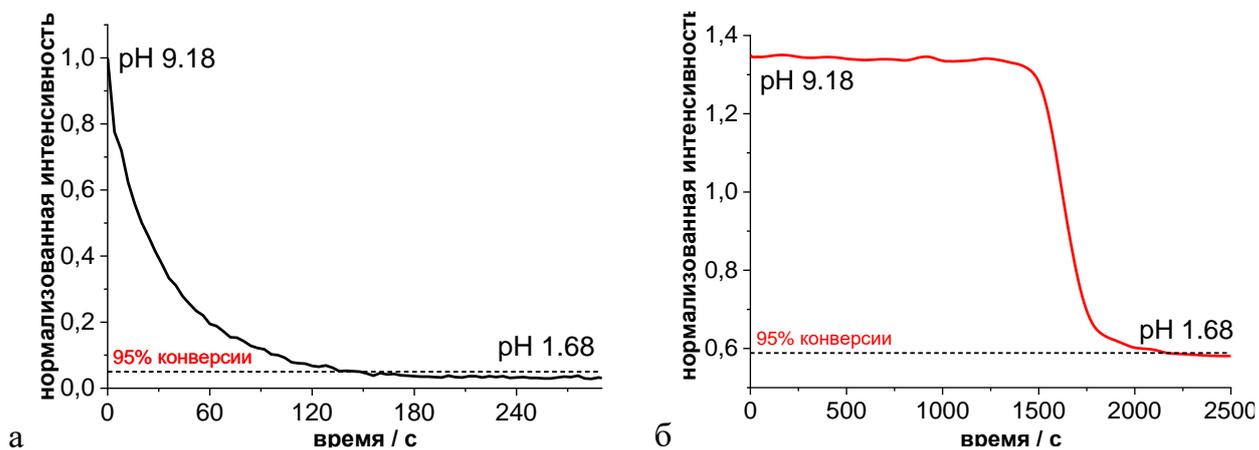


Рис. 21. Кинетический отклик массива из 8 натрий-селективных оптодов на изменение рН контактирующего раствора с 9.18 до 1.68; а – массив без защитного покрытия, время достижения 95% равновесного сигнала 2.5 мин; б – с покрытием 9984 (3М), 35 мин.

Из Рис. 21 видно, что нанесение защитного покрытия 9984 резко увеличивает время отклика массива, и может быть использовано только для таких задач, при которых высокая скорость получения результата анализа не является принципиальным требованием.

Рис. 22 демонстрирует изменение во времени натриевого отклика массива сенсоров, нанесенных на гидрофильную поверхность полиэфирных листов 9984 и покрытых диализным фильтром (12-14 кДа). На Рис. 24а представлены градуировочные графики, полученные со свежеприготовленными датчиками и через неделю после первого измерения. Рис. 24б демонстрирует соответствующее изменение времени отклика массива в 10^{-3} М NaCl.

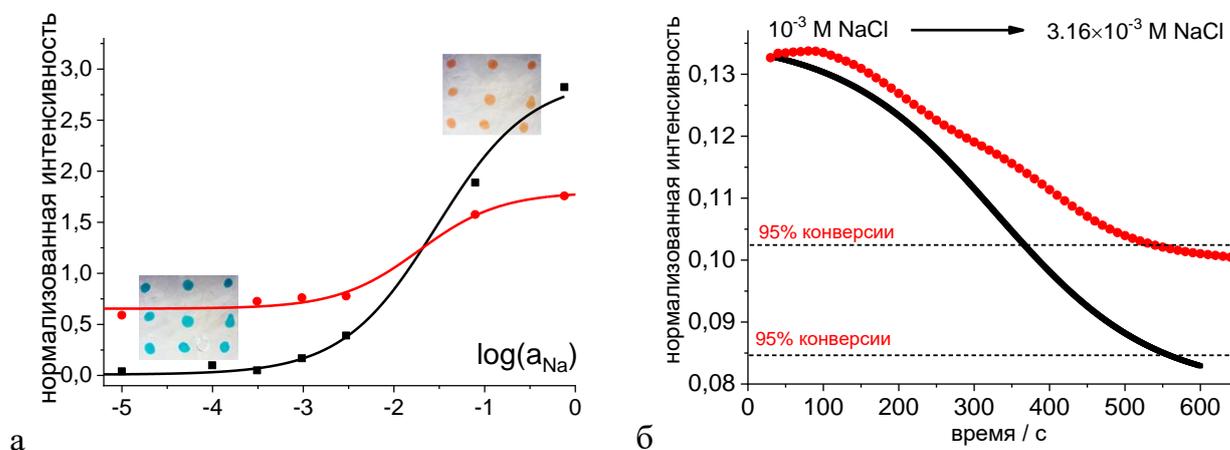


Рис. 22. а – отклик оптодов с покрытием 9984 на содержание натрия в растворе, в день нанесения (черные символы) и через неделю хранения (красные символы). Приведены усредненные данные от 9 оптодов. Сплошные линии – сигмоидный (больцмановский) фитинг. Фото на графиках соответствуют растворам 10^{-6} М NaCl (полностью протонированная форма оптода), 1 М NaCl при рН 7.35 (полностью депротонированная форма оптода); б – кинетические кривые отклика массива натрий-селективных оптодов с покрытием 9984 в 10^{-3} М NaCl в день нанесения (черные символы) и через неделю хранения (красные символы).

Из Рис. 22 видно, что диализный фильтр с размером пор 12-14 кДа в качестве защитного покрытия приводит к не такому значительному увеличению времени отклика массива, как покрытие 9984: вне зависимости от срока хранения массива, время отклика составило порядка 9 мин.

Таким образом, для анализа крови из двух исследованных вариантов подходит только ацетатный фильтр. Это связано с тем, что гемодиализный фильтр 9984 в этом случае – слишком толстая мембрана и недопустимо увеличивает время отклика. Далее рассмотрим градуировочные зависимости для оптических сенсоров с защитным слоем до и после контакта с цельной кровью (Рис. 23).

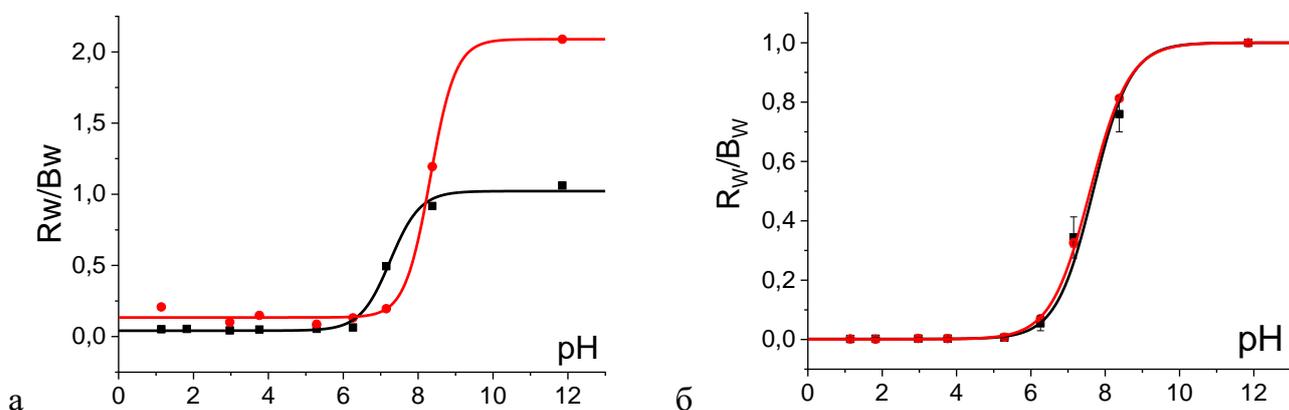


Рис. 23. а – отклик оптодов без покрытия на рН до контакта с кровью (красные символы) и после вымачивания платформы в крови в течение 1 часа (черные символы); б – отклик оптодов с защитным покрытием на рН до контакта с кровью (красные символы) и после вымачивания платформы в крови в течение 1 часа (черные символы). Сплошные линии – сигмоидный (больцмановский) фитинг.

Из представленных графиков видно, что использование защитного покрытия позволяет предотвратить загрязнение оптодной мембраны. По Рис. 23а видно, что при контакте оптодной мембраны без защитного слоя с кровью происходит смещение диапазона отклика и резкое уменьшение амплитуды за счёт блокирования поверхности сенсора. Для платформы с защитным покрытием наблюдается сохранение аналитических характеристик, таких как диапазон отклика, пределы обнаружения, медиана отклика. Таким образом, защитное покрытие позволяет решить проблему загрязнения сенсорного слоя клетками и макромолекулами, содержащимися в крови, а также предотвратить образование сгустков, мешающих регистрации оптического сигнала. Не все теоретически рассмотренные материалы для использования в качестве защитного слоя были экспериментально исследованы (предложенные материалы описаны в экспериментальной части). После снятия карантина предполагается продолжить исследование данных материалов для оптимизации платформы оптических сенсоров.

3.4. Оптимизация материалов и геометрии массива сенсоров для анализа гидропонных сред

Оптимизация составов сенсорного слоя (настройка динамического диапазона отклика) проводилась ранее в научной группе аналогично подбору диапазона, описанному выше (для анализа пота и крови). В Табл. 2 представлены исследуемые составы. Графики зависимости оптического сигнала от активности аналита в мультианалитном растворе приведены на Рис. 24.

Таблица 2. Оптимальные составы оптодных мембран для измерения, в диапазонах концентраций, характерных для гидропонных сред.

<i>Ион</i>	<i>Индикатор (ммоль/кг DOS)</i>	<i>Ионофор (ммоль/кг DOS)</i>	<i>Ионообменник (ммоль/кг DOS)</i>
Na ⁺	ETH5418 (15)	Na X (75)	37.5 КТрСІРВ
NH ₄ ⁺	ETH5350 (10)	nonactin (150)	11 КТрСІРВ
Cl ⁻	ETH5294 (10)	Cl II (50)	—
K ⁺	ETH5294 (30)	K III (BME-44) (150)	75 КТрСІРВ
Ca ²⁺	ETH2439 (20)	Ca I (ETH1001) (100)	60 NaHFPB
Mg ²⁺	ETH5418 (10)	Mg I (500)	11 КТрСІРВ

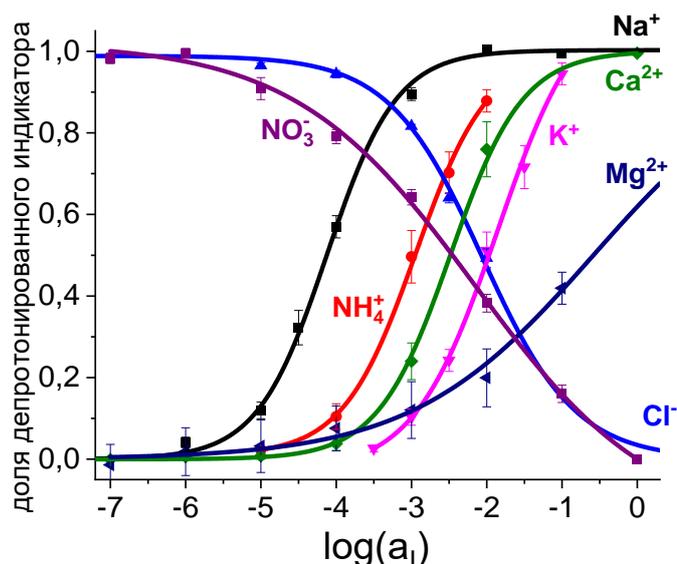


Рис. 24. Градуировочные зависимости для оптодов в средах, моделирующих питательные растворы для гидропоники, $pH = 5.9 \pm 0.1$. Символы – экспериментальные данные, сплошные линии – сигмоидный фитинг. Усреднение по показаниям 4-8 сенсоров идентичного состава.

Оптимизация материалов и геометрии массива датчиков проводилась аналогично предыдущим двум описанным выше платформам. Проведение анализа гидропонных сред *in situ* является наиболее простым среди трёх рассматриваемых сред. Специфика заключается в возможности длительного использования толстой планарной подложки и дистанционной регистрации сигнала в режиме *on-line*. Мембранная композиция получалась стандартным способом: на подложки при помощи шприца для газовой хроматографии наносились капли (0,1 мкл) раствора полимерной сенсорной композиции в тетрагидрофуране (ТГФ), после испарения ТГФ получались окрашенные сенсорные пленки. Для оценки инертности материала подложки на предмет взаимодействия с компонентами сенсорной композиции, производилась регистрация оптического отклика сенсоров на изменение pH контактирующего раствора сразу после испарения растворителя и через неделю после первой градуировки. На Рис. 25 представлены результаты измерений и фотографии датчиков, нанесенных на различные подложки. Отклик оптодов, нанесенных на полиэфирные листы изучался в условиях, о которых будет сказано ниже.

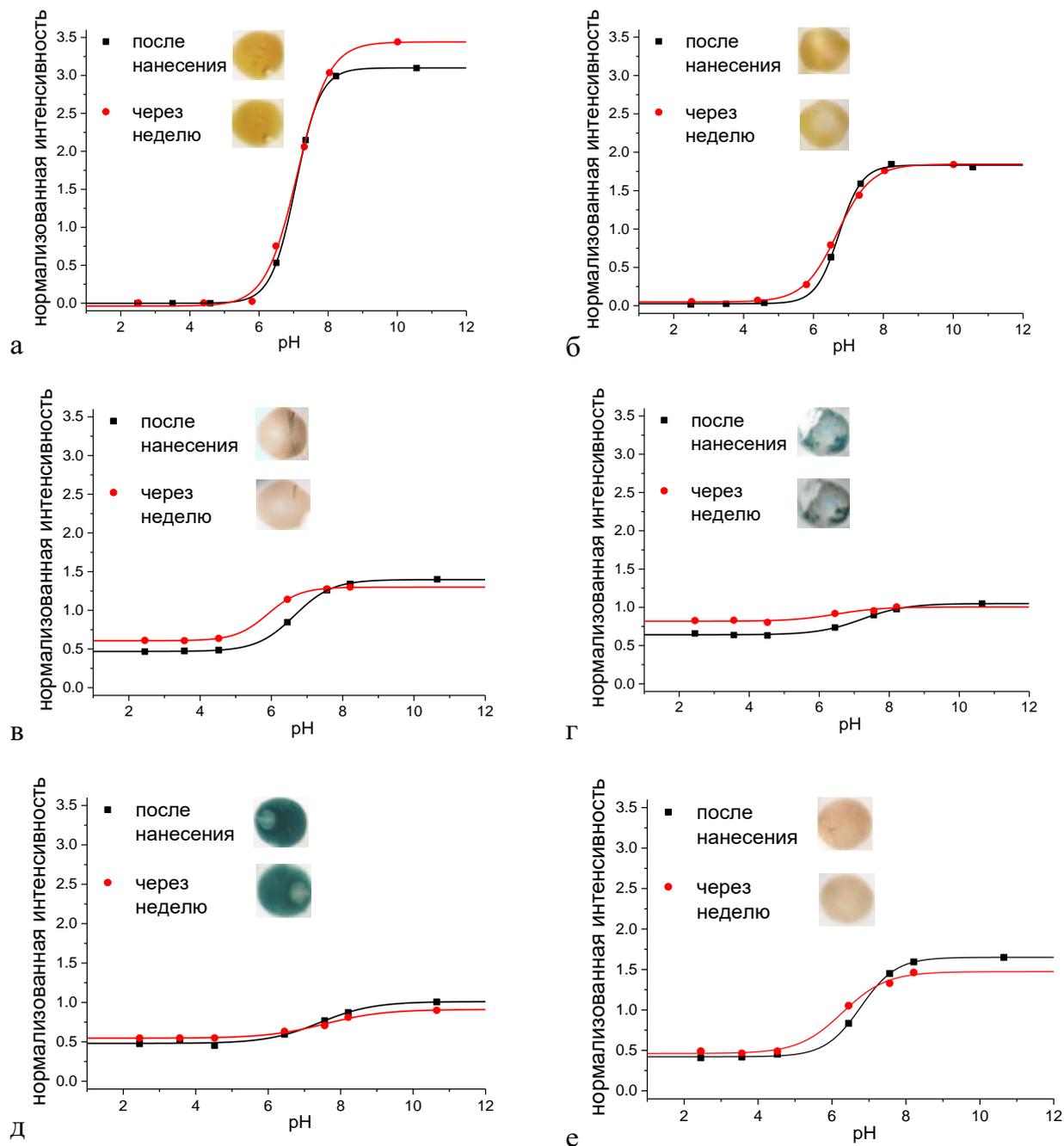


Рис. 25. Отклик оптодов, нанесенных на различные подложки, в день нанесения (черные символы) и через неделю хранения (красные символы): а – на тефлоне; б – на стекле; в – на поли(метилметакрилате); г – на поликарбонате; д – на полистироле; е – на полипропилене. Приведены усредненные данные от 4-8 оптодов. Сплошные линии – сигмоидный (больцмановский) фитинг. Фото на графиках соответствуют раствору с рН 6.5.

Максимальную амплитуду и воспроизводимость отклика продемонстрировали массивы датчиков на основе тефлоновой и стеклянной подложка. Потенциально применимой была признана также подложка из полипропилена: с течением времени амплитуда и динамический диапазон отклика изменились незначительно. Остальные

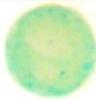
материалы привели к сильному снижению амплитуды отклика и/или значительному сдвигу динамического диапазона в более кислую область по рН. Это связано, по-видимому, с проникновением пластификатора сенсорной фазы внутрь полимерной подложки и, соответственно, резким уменьшением коэффициентов диффузии и ростом роли транспортных ограничений в отклике оптода.

Для выбранных подложек были опробованы различные методы нанесения жидкой оптодной композиции: спин-коатинг, капельное нанесение при помощи микродозатора, капельное нанесение при помощи хроматографического микрошприца. Наиболее воспроизводимым методом получения тонких пленок представляется метод спин-коатинга, однако он не дает возможности создать массив сенсоров, содержащих большое количество датчиков: – получаемые пленки имеют большую площадь и достаточно сложно переносятся с одной подложки на другую. Оптимальным методом было признано нанесение оптодных композиций при помощи микрошприца для газовой хроматографии.

Для подложек толщиной $\geq 0.5-1.0$ мм представлялось целесообразным наносить сенсорные пленки в подготовленные углубления для увеличения воспроизводимости и механической стабильности массивов. При этом использование тонких и гибких подложек типа полипропиленовой ленты может иметь ряд преимуществ.

Геометрия и толщина сенсорных пленок были оптимизированы на подложке из тефлона как обеспечивающей максимальную амплитуду отклика датчиков. Для получения углублений использовали 4 типа сверел (корончатое, два вида цилиндрических сверел, шариковое сверло), также наносили сенсорную композицию на ровную поверхность тефлоновой подложки. Оптодные пленки различной геометрии приводили в контакт с растворами 0.01 М HCl (полностью протонированная форма оптода), 0.1 М NaCl при рН 6.35 (медиана отклика оптода данного состава), 0.1 М КОН (полностью депротонированная форма оптода). Усредняя сигнал, полученный от 8-12 идентичных оптодов каждой геометрии, получили стандартные отклонения сигнала от среднего как характеристику воспроизводимости нанесения пленок (Табл. 3).

Таблица 3. Различные варианты геометрии оптодов и соответствующая воспроизводимость нанесения оптодных пленок (относительное отклонение сигнала оптодов идентичной геометрии от среднего в одинаковых условиях измерения).

	<i>шариковое сверло (объем капли 0.15 мкл)</i> 	<i>корончатое сверло (объем капли 0.30 мкл)</i> 	<i>ровная поверхность тефлона (объем капли 0.10 мкл)</i> 	<i>цилиндрическое сверло (объем капли 0.10 мкл)</i> 
0.01 M HCl	 4.1%	 5.1%	 2.0%	N/A
0.1 M NaCl (pH=7.35)	 4.9%	 5.3%	 3.7%	Ø 2 мм: 4.2% Ø 1 мм: 4.2%
0.1 M KOH	 7.1%	 9.8%	 9.1%	Ø 2 мм: 17.6% Ø 1 мм: 9.0%

Из данных Табл. 3 видно, что все типы геометрии сенсоров демонстрируют достаточную воспроизводимость нанесения (в пределах 10%), кроме цилиндрического сверла большего диаметра. При этом наилучший результат был получен с шарообразной формой сверла.

Также была исследована зависимость воспроизводимости нанесения от объема капли наносимой жидкой сенсорной композиции на примере углублений, сделанных корончатым сверлом. Результаты представлены в Табл. 4.

Таблица 4. Относительное отклонение сигнала оптодов, нанесенных в углубления, сделанные корончатым сверлом, от среднего в одинаковых условиях измерения в зависимости от объема наносимой капли жидкой сенсорной композиции.

объем капли	Анализируемый раствор		
	0.01 M HCl	0.1 M NaCl; pH=6.35	0.1 M NaOH
0.1 мкл	5.9 %	0.9%	1.5%
0.15 мкл	10.0%	1.8%	1.3%
0.2 мкл	2.2%	7.1%	0.7%
0.25 мкл	3.2%	7.0%	0.8%
0.3 мкл	0.7%	4.7%	2.0%

Видно, что объемы капли >0.15 мкл обеспечивают достаточную воспроизводимость нанесения датчиков.

В качестве потенциально применимого защитного слоя исследовались гемодиализный фильтр 9984 и ацетат целлюлозы. Для гидропонных сред к защитному слою предъявляется намного меньше требований, чем для крови. Для использования в гидропонике подходят оба варианта защитного слоя: значение времени отклика удовлетворяет требованиям мониторинга, так как происходящие изменения состава питательного раствора не будут оказывать значительного влияния на состояние растений в течение такого небольшого промежутка времени. Поэтому фильтр для диализа был признан подходящим для дальнейшего использования. Что касается влияния подложки на отклик собственно сенсоров, то несмотря на значительную амплитуду отклика свежеприготовленных датчиков, их быстрое старение (уменьшение амплитуды отклика, см. Рис. 25а) говорит о взаимодействии оптодных компонентов даже с гидрофильной стороной материала 9984, поэтому диализный фильтр целесообразнее использовать с оптимизированными ранее материалами подложки (тефлон, стекло, полипропилен).

Для использования такой сенсорной системы в практическом плане (помимо исследования дополнительных кандидатов в качестве защитного слоя) осталась одна нерешённая задача: все исследованные элементы системы не объединены в практически применимый прототип, который может быть использован при анализе активностей аналитов в гидропонных средах, и, соответственно, оценка

работоспособности этого прототипа в единой системе не проведена. Но учитывая, что удалось эффективно решить возникшие проблемы с подложкой, оптимизировать геометрию отверстия и подобрать защитное покрытие, отвечающее всем необходимым характеристикам, конструирование системы и апробирование в реальных условиях является последним этапом разработки готовой платформы, позволяющей проводить мониторинг гидропонных сред.

Заключение

В дипломной работе были исследованы перспективы применения массивов оптических сенсоров *in situ* для анализа пота, крови и гидропонных сред. Были изготовлены датчики с диапазонами отклика, соответствующими содержанию основных ионных компонентов в данных средах, была подтверждена потенциальная возможность проведения мультианалитного анализа при совместном присутствии аналитов на планарной подложке. Были выделены основные общие практические проблемы при применении сенсоров *in situ*, проанализированы пути решения этих проблем. С учётом специфики каждой аналитической задачи были исследованы различные материалы в качестве кандидатов для создания применимой мультианалитной сенсорной платформы. В этом состояла основная часть работы. Данный подход к платформе оптических сенсоров позволил путём оптимизации отдельных слоёв подобрать такие условия проведения анализа и материалы, которые в потенциале позволят использовать оптические сенсоры для *in situ* мониторинга крови, пота и гидропонных сред. Таким образом, цель работы, а именно – разработка универсального подхода к созданию массивов оптических сенсоров для решения прикладных аналитических задач *in situ*, была достигнута. Но в связи со сложившейся санитарно-эпидемиологической обстановкой, не удалось создать прототипы рабочих платформ для определения аналитов. Не удалось также многократно воспроизвести данные градуировок, разобраться в причинах их отклонений от теории и эпизодической невоспроизводимости. Также не удалось протестировать все имеющиеся в наличии материалы для использования в качестве защитных покрытий. Автор надеется закончить исследование после снятия карантинных мер.

Выводы

1. В результате анализа литературных данных удалось найти и обобщить проблемы, характерные для всех разрабатываемых устройств для *in situ* применения, предложить возможные пути решения этих проблем на примере ряда аналитически значимых задач.
2. При разработке платформы оптических сенсоров для анализа пота *in situ* настроен динамический диапазон отклика на физиологическое содержание Na^+ , K^+ , Cl^- . В результате теоретического подбора и экспериментального апробирования были выбраны наиболее оптимальные материалы для использования в платформе, что обеспечит потенциальную возможность ношения датчиков на коже. В качестве субстрата наиболее подходящим оказался полипропилен, иммобилизованный на полиуретановый пластырь с липким слоем. В роли защитного слоя наилучшие результаты продемонстрировала мембрана из ацетата целлюлозы.
3. Была исследована возможность применения оптодов для мониторинга содержания аналитов в крови. Из немногих экспериментально исследованных материалов наилучшие результаты при контакте с кровью на планарной подложке в качестве защитного слоя показал ацетат целлюлозы.
4. Для создания оптодной платформы, позволяющей определять активность аналитов в гидропонных средах, могут быть использованы планарные подложки. Лучшие характеристики, а именно, максимальную амплитуду и воспроизводимость отклика, продемонстрировали массивы датчиков на основе гидрофобного тефлона. Помимо этого, для гидропоники к защитному слою предъявляется меньше требований, чем для анализа крови, поэтому в аналитических целях могут быть использованы мембраны из ацетата целлюлозы и полиэфирные листы.

Список цитированной литературы

1. Gründler P., *Chemical Sensor, An Introduction for Scientists and Engineers* // Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2007
2. Михельсон К.Н., Пешкова М.А. *Успехи химии*, 84(6), (2015), 555
3. Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E., *Chem. Rev.*, 97, (1997), 3083
4. E.Bakker, W.Simon. *Anal. Chem.*, 64, (1992), 1805
5. M.Shortreed, E.Bakker, R.Kopelman. *Anal. Chem.*, 68, (1996), 2656
6. W.E.Morf, K.Seiler, P.R.Sørensen, W.Simon. In *Ion-Selective Electrodes. Vol. 5.* (Ed. E.Pungor). Akadémiai Kiadó, Budapest, (1989), 141
7. Seiler K., Simon W., *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 737
8. Mistlberger G, Crespo G.A., Bakker E., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 7 (2014) 483
9. Wang X.D., Wolfbeis O.S., *Anal. Chem.* 85 (2013) 487
10. Xie X., Bakker E., *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3899
11. Wencel D., Abel T., McDonagh C., *Anal. Chem.* 86 (2014) 15
12. Wang X., Stolwijk J.A., Lang T., Sperber M., Meier R.J. et al., *JACS* 134 (2012) 17011
13. S. Kim, H. Cho, G. Cha, H. Nam. *Anal. Chem.* 70, (1998), 4860
14. N. DuÈruÈst, M. Meyerhoff, N. UÈnal, S.NacÈ Anal. Chim. Acta, 699 (2011), 107
15. N. DuÈruÈst, S. NacÈ, N. UÈnal *Sens. Actuators, B* (2014) 203, 181
16. K. Tohda, M. Gratzl *Anal. Sci.* (2006) 22, 383
17. S. Delin, N. StroÈmberg *Eur. J. Soil Sci.* 62 (2011), 295
18. A. Koh, D. Kang, et al. *Science Translational Medicine* 23 (2016) 366ra165
19. X. He, T.n Xu, Z. Gu, W. Gao, L.-P. Xu, T. Pan, X. Zhang, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4296
20. E.V. Karpova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin, et al., *Anal. Chem.* 91 (2019) 3778
21. Hnin Yin Yin Nyein, Mallika Bariya et al., *Science Advances* 5 (2019) eaaw9906
22. Wenya He et al., *Science Advances* 5 (2019) eaax0649
23. Yiran Yang et al, *Nature Biotechnology* 38 (2020) 217
24. O. Parlak, S.T. Keene, *Science Advances* 4 (2018) eaar2904
25. J.T. Reeder, J. Choi, *Science Advances* 5 (2019) eaau6356
26. M. Staal, E. Prest, J. Vrouwenvelder, L. Rickelt, M. KuÈhl *Water Res.*, 45(2011) 5027
27. M. Staal, S. Borisov, L. Rickelt, I. Klimant, M. KuÈhl. *J. Microbiol. Methods*, 85 (2011) 67
28. M. Bamsey, A. Berinstain, M. Dixon *Anal. Chim. Acta*, 737 (2012) 72

29. M. Bamsey, A. Berinstain, M. Dixon *Sens. Actuators, B*, 190 (2014) 61
30. E. Lindner, D. Bordelon, M. Kim, S. Dergunov, E. Pinkhassik, E. Chaum *Electroanalysis*, 24(2012) 42
31. S. Schreml, R. Meier, K. Weiû, J. Cattani, D. Flittner, S. Gehmert, O. Wolfbeis, M. Landthaler, P. Babilas. *Exp. Dermatol.*, 21(2012) 951
32. X. Wang, R. Meier, O. Wolfbeis *Chem., Int. Ed.*, 52 (2013) 406
33. T. Jokic, S. Borisov, R. Saf, D. Nielsen, M. KuÈhl, I. Klimant *Anal. Chem.*, 84 (2012) 6723
34. P. Brunner, C. Clason, M. Freiburger, H. Scharfetter *Biomed. Opt. Express*, 3 (2012) 1732
35. P. Ahuja, M. Peshkova, B. Hemphill, M. Gratzl *Sens. Actuator B-Chem* 204 (2014) 319
36. H. Xuecheng, X. Tailin, G. Zhen, G. Wei, X. Li-Ping, P. Tingrui, Z. Xueji *Analytical Chemistry (2019)* 8b05875
37. W. Eng, V. LeGrys, M. Schechter, M. Laughon, P. Barker *Pediat. Pulmonol* (2005) 40
38. M. Desax, R. Ammann, J. Hammer, M. Schoeni, J. Barben, *Swiss Paediatric Respiratory Research* (2008) 167
39. S. Flesher, J. Collinger, S. Foldes, J. Weiss, J. Downey, E. Tyler-Kabara, S. Bensmaia, A. Schwartz, M. Boninger, R. Gaunt *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) 361ra141
40. Sandblom J.P., Eisenman G., Walker J.L. *J. Phys. Chem.*, 71, (1967), 3871