



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34994 (13) A

(51) 6 G01N21/55. 30/93

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ОПТИЧНИЙ ПЕРЕТВОРЮВАЧ ДЛЯ БЕЗПОСЕРЕДНЬОГО ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РЕЧОВИНИ У РІДКІЙ ПРОБІ

(21) 99074335

(22) 27 07 1999

(24) 15 03 2001

(46) 15 03 2001, Бюл. № 2, 2001 р

(72) Пилецький Сергій Анатолійович, Костюкевич Катерина Вікторівна, Ширшов Юрій Михайлович, Снопко Борис Анатолійович

(73) ІНСТИТУТ ФІЗИКИ НАПІВПРОВІДНИКІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) 1 Оптичний перетворювач для безпосереднього якісного та кількісного визначення речовини в рідкій пробі складений із джерела р-поляризованого світла скляної призми повного внутрішнього відбитка з металеву плівкою на якій закріплений хімічно зв'язаний з нею чутливи самоорганізований моношар органічних молекул і фотоприймача пов'язаних між собою оптичним зв'язком, який відрізняється тим, що самоорганізований моношар утворений із двохкомпонентної системи молекул із різною довжиною вуглецеводневого ланцюга одна з яких є структурним аналогом ідентифікованої речовини

2 Оптичний перетворювач по п. 1, який відрізняється тим, що металева плівка на поверхні призми є золотом, а функціональна група молекул чутливого шару, яка утворює хімічний зв'язок із поверхнею золоті плівки містить сірку, при цьому одна зі складових чутливого шару є алкантолом із довжиною вуглецеводневого ланцюга більш 9 а друга складова повинна бути структурним аналогом ідентифікованої речовини що містить сірку

Винахід належить до фізико-хімічних методів аналізу зокрема до визначення якісного та кількісного складу досліджуваної рідкої проби з використанням оптоелектронного твердотілого перетворювача поверхня якого модифікована органічною матрицею, що самоорганізується, а принцип дії заснований на резонансі поверхневих плазмонів

Такі пристрої, що дозволяють робити швидкий якісний і кількісний аналіз рідких проб, можуть знайти застосування у медицині і сільському господарстві фармацевтичній і харчовій промисловості, моніторингу навколишнього середовища, а також для фізико- і біохімічних досліджень у різноманітних галузях науки

Відомий біосенсор United States Patent 5629213, Analytical biosensor, Steven E. Kornguth et al., May 13 1997, G01N 033/543, G01N 033/552, G01N 033/547, робота якого заснована на використанні явища поверхневого плазмонного резонансу Система для визначення речовини включає скляну призму, тонку металеву плівку і чутливу плівку багаточастотної структури а) тонкий органічний полімерний шар матеріалу, що унаслідок своєї поліаніонної природи адсорбується на металевій плівці, б) шар полікатионного полімерного матеріалу полілізину, що зв'язується з поліаніонним і в) зовнішній шар біологічної природи, пов'язаний із полілі-

зином, що забезпечує специфічне зв'язування з речовиною, що визначається

Біосенсор дозволяє виявити присутність у рідкій пробі молекул біологічної природи, для котрих заздалегідь необхідно виробити біоафінних партнерів зв'язування, і визначити їхню концентрацію

Недоліком є те, що утворення чутливого шару відбувається в три стадії, причому використувані матеріали є полімерними, що потребує операцій центрифугування, контрольованого випару розчинника і полімеризації, тобто складного і дорогого устаткування Крім того, до складу чутливого шару входять малостабільні дорогі біологічні реагенти імунологічного тестування Метод центрифугування є макроскопічним, він дає неоднорідні і великі по товщині (300 - 400 нм) покриття, що веде до погіршення чутливості і помилок у розрахунках

Відомий пристрій для знаходження і дослідження речовини в рідкій пробі United States Patent 5561069, Surface plasmon resonance detector having collector for eluted ligate, Bingham-Burke et al., Oct 1 1996, G01N 033/543, що використовує явище поверхневого плазмонного резонансу, чутливий елемент якого містить металеву плівку, мо-

(19) UA (11) 34994 (13) A

дифіковану похідними органічної речовини - декстрана

Такий пристрій дозволяє контролювати і досліджувати речовини в рідкій пробі, для чого необхідно надходження і закріплення ще однієї речовини, що є сполучною між детектованою речовиною. Можлива заміна сполучної речовини.

Недостатком є те, що утворення чутливого шару відбувається в два етапи, що робить цей процес складним і дорогим. Крім того великі товщини шару декстрана (більш 100 нм) неможливість одержання плівок однорідних по товщині, неоднорідні умови зв'язування з речовиною, що досліджується призводять до неконтрольованих помилок у розрахунках. Сполучну речовину для кожного випадку необхідно спеціально розробляти.

Найбільше близьким до оптичного перетворювача, що заявляється можна вважати біосенсор United States Patent 5620850 Molecular recognition at surfaces derivatized with selfassembled monolayers Bamdad, Cynthia C et al, Apr 15 1997, C12Q 001/68 G01N 033/53, C07K 005/00. Такий біосенсор поверхневого плазмонного резонансу являє собою оптичну систему, що містить джерело р-поляризованого світла, скляну призму повного внутрішнього відбитка з металевою плівкою на ній, що модифікована органічною плівкою з трьох шарів, де перший шар є самоорганізований і фотоприймач.

Біосенсор розпізнає біологічну молекулу завдяки специфічному зв'язуванню з біофінім партнером, що з'єднується за допомогою хелатного агента через металевий іон із першим шаром, що є самоорганізованим і закріпленим на металевій поверхні хімічним зв'язком.

Недоліком є 3-х стадійна організація чутливої плівки, що робить процес складним і дорогим. Крім того отриманий у результаті шар утворюється просторово-неоднорідним, що веде до втрати чутливості і помилкових результатів. Необхідність використання біологічних реагентів (імунологічного тестування) робить такий чутливий шар дорогим, малостабільним і обмежує кількість об'єктів розпізнавання.

Таким чином аналіз наведених біохімічних сенсорів, робота яких заснована на явищі поверхневого плазмонного резонансу показує, що шари таких оптичних пристроїв не дають оптимального сполучення простого і недорогого методу одержання і відповідної якості (однорідність, товщина) для прямого якісного та кількісного визначення речовини в рідкій пробі.

В основу винаходу, що заявляється поставлена задача збільшення чутливості, точності здешевлення перетворювача, розширення кола об'єктів розпізнавання при значному спрощенні створення чутливого шару.

Поставлена задача досягається тим, що в оптичному перетворювачі для прямого якісного та кількісного визначення речовини в рідкій пробі, що містить джерело р-поляризованого світла, скляну призму повного внутрішнього відбитка з металевою плівкою на якій закріплений за допомогою хімічного зв'язку самоорганізований моношар органічних молекул і фотоприймач пов'язані між собою оптичним зв'язком, що самоорганізований мо-

ношар утворений із двохкомпонентної системи молекул із різною довжиною вуглецеводневого ланцюга, одна з яких повинна бути структурним аналогом ідентифікованої речовини.

Оптичний перетворювач, що заявляється, відрізняється також тим, що металева плівка на поверхні призми є золотою, а функціональна група молекул чутливого шару, утворюючи хімічний зв'язок із поверхнею золотої плівки, містить сірку, причому одна зі складових чутливого шару може бути алкантіолом із довжиною ланцюга більш 9, а друга складова повинна бути структурним аналогом ідентифікованої речовини, що містить сірку.

Збільшення чутливості і точності досягається тим, що в оптичному перетворювачі для прямого якісного та кількісного визначення речовини в рідкій пробі чутливий шар є не багатшаровою структурою, а моношаровою матрицею органічних молекул, що самоорганізована. Такий моношар, утворений із двохкомпонентної системи молекул із різною довжиною вуглецеводневого ланцюга, одна з яких є структурним аналогом ідентифікованої речовини, утворюється щільним, однорідним по товщині в області десятків-сотень ангстрем, що створює однорідні умови зв'язування з ідентифікованою речовиною і дозволяє уникнути помилок у розрахунках концентрації. Розширення кола об'єктів пов'язане з тим, що для будь-якої цікавлячої речовини хімічної або біологічної природи завжди можна організувати чутливу моношарову матрицю, оскільки завжди можна одержати (синтезувати) його аналог спроможний до хімічного зв'язування з металевою підкладкою. Здешевлення випливає зі значного спрощення методу одержання чутливого шару, що є одностадійним у зв'язку з тим, що поставлена задача детектування вирішується організацією тільки одного моношару. Сформувати чутливий шар, запропонований у винаході, що заявляється, можна зануренням призми з металевою плівкою в розчин, що містить двохкомпонентну суміш молекул, на 24-72 години з наступним промиванням у чистому розчиннику і сушінням, на зразку з будь-якою геометрією, при цьому не потрібно складного або дорогого устаткування і спеціальних умов, тобто процес відбувається з високим виходом і відтворенням при умовах, характерних для більшості промислових і наукових організацій.

Оптимальне досягнення поставленої задачі реалізується в оптичному перетворювачі, що заявляється коли металева плівка на поверхні призми є золота, а функціональна група молекул чутливого шару, утворюючи хімічний зв'язок із поверхнею золотої плівки, містить сірку. Золото вибирається переважним металом через свої інертні властивості, що є істотним для роботи рідинного біохімічного сенсору, а функціональна група, що містить сірку, є найбільш активною при утворенні хімічного зв'язку з золотом.

На фіг 1 наведена резонансна крива поверхневого плазмонного резонансу.

На фіг 2 показана блок-схема пристрою, що заявляється, де 1 - джерело р-поляризованого світла, 2 - призма з провідниковою плівкою, модифікованою селективною моношаровою органічною матрицею, 3 - блок керування поворотом призми, 4

- блок подачі рідкої проби, 5 - фоточутливий елемент, 6 - комп'ютерна система

На фіг 3 показана схема організації органічної моношарової матриці на металевій поверхні

На фіг 4 наведена експериментальна кінетична крива (сенсорограма) при детектуванні адсорбції барбітурової кислоти на чутливу поверхню оптичного перетворювача, модифіковану моношаровою органічною матрицею (1) - веронал у концентрації 200 г/мл, (2 - 8) - барбітурова кислота в діапазоні концентрацій 1 нг/мл - 1 мг/мл.

На фіг 5 наведена експериментальна калібрована крива для кількісного визначення барбітурової кислоти в рідкій пробі в діапазоні концентрацій 1 нг/мл - 1 мг/мл

У винаході, що заявляється, оптичний перетворювач для якісного та кількісного визначення речовини в рідкій пробі є сенсорним приладом, робота якого заснована на використанні явища поверхневого плазмонного резонансу (Поверхневі поляритони. Електромагнітні хвилі на поверхнях і межах поділу середовищ. За редакцією В. М. Агратовича, Д. Л. Миллса. М.: Наука, 1985, 525 с.; Поверхневі поляритони в напівпровідниках і діелектриках Н. Л. Дмитрук, В. Г. Литовченко, В. Л. Стрижевський. Київ: Наукова думка, 1989, 375 с.)

Поверхневі електромагнітні хвилі, або поверхневі плазмони (ПП), - особливий вид макроскопічних електромагнітних хвиль, що поширюються уздовж поверхні поділу середовищ, тобто на відстанях, що не перевищують довжини хвилі використовуваного випромінювання. Умовою існування ПП є наявність у робочому діапазоні негативної діелектричної проникності в одного із середовищ, що граничають. Для металів діелектрична проникність обумовлена плазмою вільних електронів є негативною в широкому спектральному діапазоні. Найбільш частим методом збудження ПП є з використанням призми в умовах порушеного повного внутрішнього відбитка і геометрії, при якій металеву плівку наносять безпосередньо на призму. У сенсорному застосуванні робоча сторона призми, покрита тонким металевим шаром і контактує з досліджуваною пробю, опромінюється з боку більш щільного середовища. Інтенсивність світла, відчуває повний внутрішній відбиток від межі поділу скло-метал і вимірюється відбиток як функція кута падіння. Коли р-поляризовані електромагнітні хвилі збудять поверхневі плазмони на межі поділу метал - досліджувана проба, у залежності, що вимірюється, буде спостерігатися ослаблення повного внутрішнього відбитка і ми зможемо зафіксувати результуючий відгук у виді резонансної кривої (фіг 1). Форма кривої плазмонного резонансу і, зокрема, положення мінімуму, залежать як від показника заломлення призми, оптичних констант і товщини шару, у якому збуджується поверхневий плазмонний резонанс так і від оптичних параметрів і товщини шару, що контактує з шаром - носієм плазмонних коливань. Міряючи зміну резонансних умов виникнення плазмонного ефекту, тобто отслеживая зміну положення мінімуму плазмонного резонансу в часу (фіг 4), ми можемо судити про процеси взаємодії, що відбуваються на металевій поверхні й оцінити їх кількісно.

Чутливий елемент перетворювача, що заявляється (фіг 2 - 2) був виконаний нами з викорис-

танням призми повного внутрішнього відбитка, має кут при основі 68° , на робочу поверхню якої наносили шар золота (45 нм). Золота плівка піддавалася модифікації моношаровою органічною матрицею, що вибрано взаємодіє з цікавлячою речовиною (адсорбує її). Через призму на металеву поверхню падає промінь (фіг 2 - 1) р-поляризованого лазерного світла (633 нм). Сканування зразків у необхідному діапазоні кутів здійснюється на обертівій платформі за допомогою крокового двигуна (фіг 2 - 3). Для приведення в контакт робочої сторони металеві плівки з рідкою пробю передбачена проточна кювета з герметизуючим шаром із силіконової гуми об'ємом 100 μ л. подача проби здійснюється перистальтичним насосом (фіг 2 - 4). Сигнал, відбитий від металеві поверхні фіксується фотодіодом (фіг 2-5). Аналіз кутового положення і форми резонансної кривої реєструється керуючою програмою (фіг 2-6), що дозволяє одержувати в реальному масштабі часу кінетичну криву або сенсорограму (фіг 4), що відбиває процеси адсорбції речовини моношаровою органічною матрицею з досліджуваної рідкої проби. Результати вимірів математично опрацьовуються по спеціально розробленому алгоритмі.

Для прикладу, із широкої розмаїтості об'єктів, що можуть бути ідентифіковані методом, що заявляється, були обрані барбітурати. Барбітурати є депресантами центральної нервової системи і використовуються в медицині як безпечні засоби, снотворні і протисудорожні засоби. Проте існує і негативна сторона зловживання цими речовинами: вони можуть бути використані в якості наркотичних засобів. При хронічному використанні барбітуратів розвивається звикання і смерть може наступити як від понад дозування, так і від різкого припинення прийому. Тому дуже важливим є можливість визначення рівня барбітуратів у мочі та плазмі крові.

Різноманітні типи молекулярно-організованих систем розглянуті докладно в книзі: A. Ulman, An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly Academic Press, Boston, 1991. Теорія про формування плівки, що самоорганізується, із суміші двох органосіркових молекул із різноманітною довжиною вуглецеводневого ланцюга коадсорбцією описана у Colin. D. Bain and George M. Whitesides Formation of monolayer by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. J. Am. Chem. Soc. 1989, v. 111, № 18, 7164 - 7175. Існують посилаєння (Gabriel P. Lopez, Hans A. Biebuyck, Ralph Harter, Amit Kumar, and Georg M. Whitesides Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of protein adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 10774-10781, Kathleen T. Kinnear and Harold G. Monbouquette Direct electron transfer to Escherichia coli fumarate reductase in self-assembled alkanethiol monolayers on gold electrodes Langmuir 1993, 9, 2255-2257) на використання поверхонь, модифікованих гідрофобними алкантіолами з довгим ланцюгом або їхніми сумішами для закріплення біологічних об'єктів за рахунок електростатичних, гідрофобних і ковалентних взаємодій.

Хемосорбція сполук, що містять сірку, із довжиною вуглеводневого ланцюга більш 9 на благородних металах із (0,1-1,0) mM розчину методом

занурення на 24-72 годин з наступним промиванням у чистому розчиннику і сушінням, у результаті котрої молекули закріплюються на підкладці з утворенням хімічного зв'язку, формують щільні, механічно і термічно (до 150°C) стабільні моношарові покриття в області десятків сотень ангстрем. Вибір розчинника визначається типом використовуваного рецепторного компонента з переважним використанням етилового спирту і води, оскільки вони недорогі, нетоксичні і легко піддаються очищенню. Така плівка цілком покриває металеву поверхню вуглеводневими панцюгами і термінальні функціональні групи визначають в остаточному підсумку властивості модифікованої поверхні.

Для якісного і кількісного визначення барбітурової кислоти у водяних розчинах золота поверхня чутливого елемента оптичного перетворювача, що заявляється, модифікувалася в такий спосіб:

1. Готували 1 mM розчин додекантіопа $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ в етиловому спирті (а), готували 1 mM розчин малонілпомочевини $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$ (то-барбітурова кислота) у 50 % суміші води й етилового спирту (б), утворювали суміш розчинів (а) і (б) у співвідношенні 1 : 20.

2. Хемосорбцію здійснювали шляхом занурення свіжевикотворених золотих плівок в утворену суміш на 24 години при температурі $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

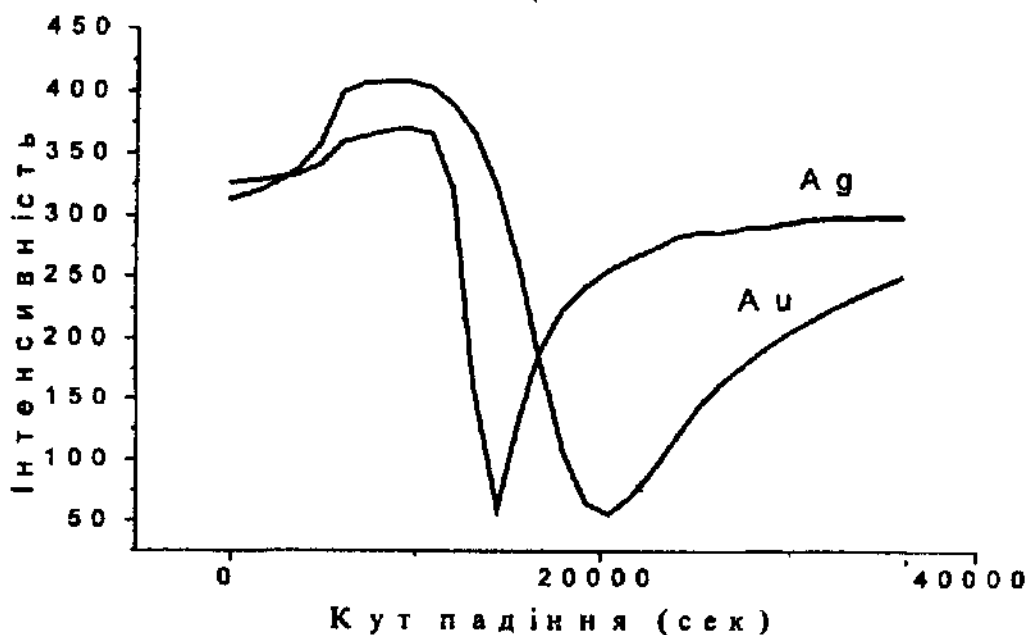
3. Ретельне промивання в чистому етанолі протягом 30 хвилин при температурі $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

4. Сушіння в потоку чистого повітря.

Приготовлена в такий спосіб органічна моношарова матриця з високим ступенем селективності адсорбує молекули малонілпомочевини $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2$ (барбітурова кислота). Матрицю призовдили в контакт із водяним розчином барбітурової кислоти при різноманітних концентраціях у діапазоні 1 нг/мл - 1 мг/мол. Для перевірки селективності чутливого елемента здійснювали контакт із водяним розчином аналога барбітурової кислоти - барбіталом $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$ (веронал). Час інкубації досліджуваної проби з модифікованою поверхнею чутливого елемента - 20 хвилин.

Типова кінетична крива залежності зміщення резонансного кута від концентрації барбітурової кислоти подана на фіг. 4 (2-8). При цьому адсорбції вероналу взагалі не спостерігається (фіг. 4 (1)).

Проведений експеримент підтверджує можливість прямого якісного і кількісного визначення речовини в досліджуваній рідкій пробі на твердотільній металевій поверхні, модифікованій органічною моношаровою матрицею, за допомогою пристрою, що фіксує резонанс поверхневих плазмонів.



Фіг. 1

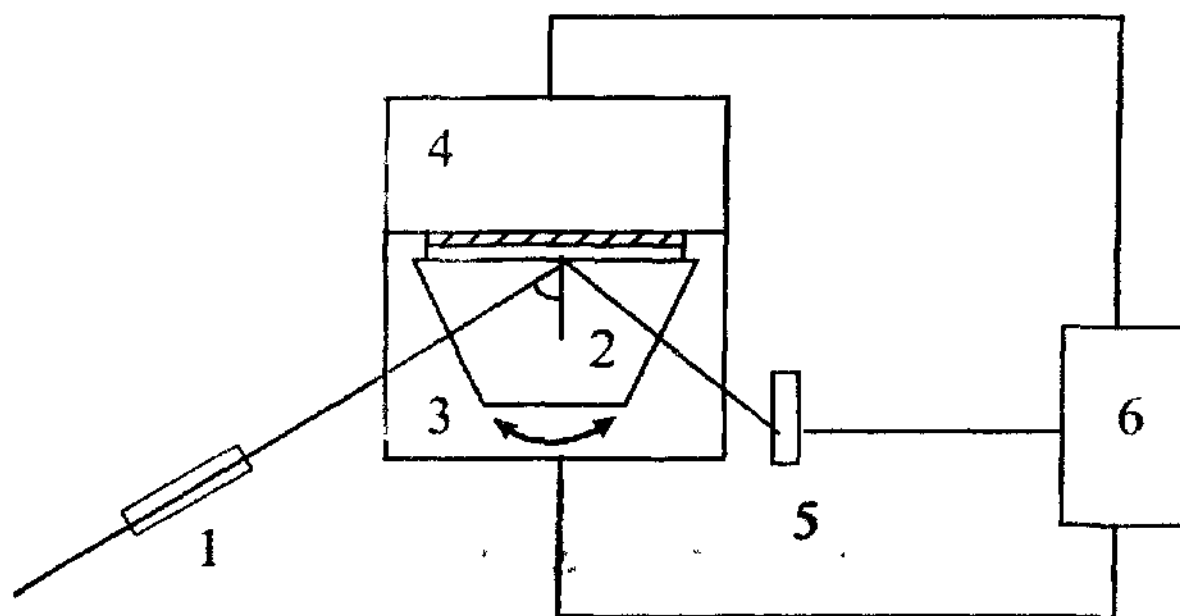


Fig. 2

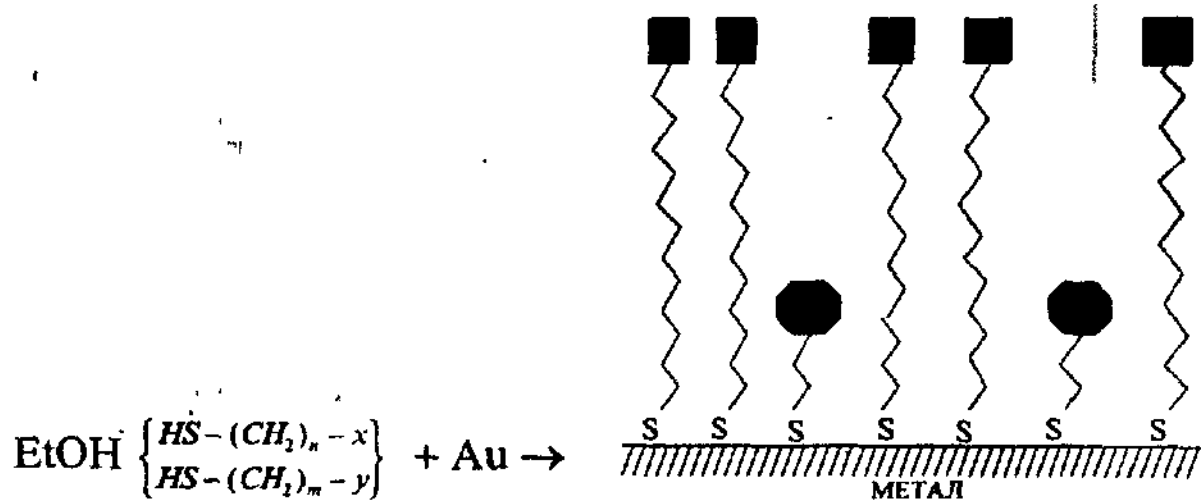
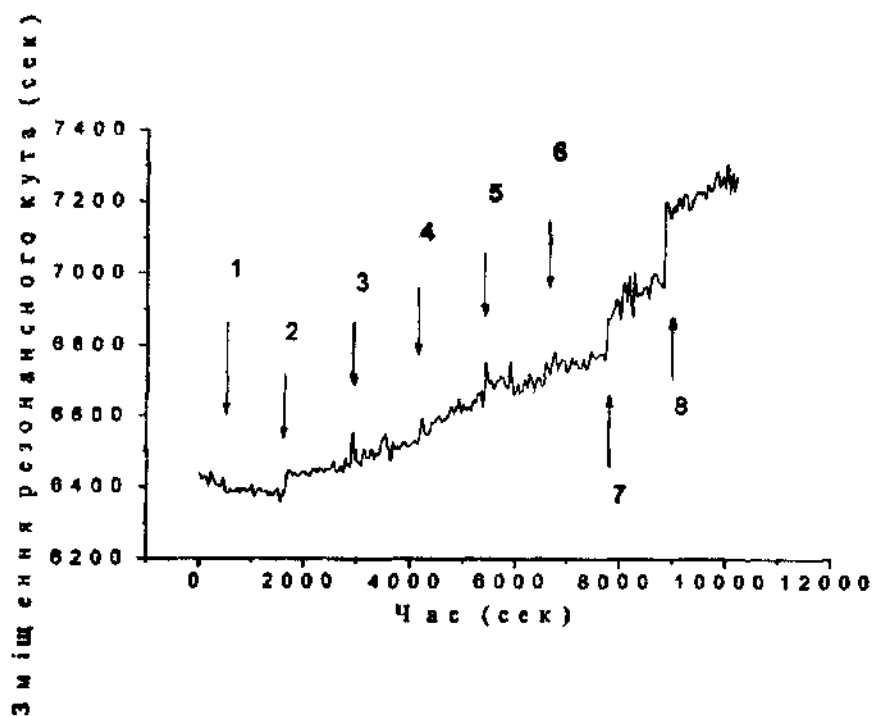
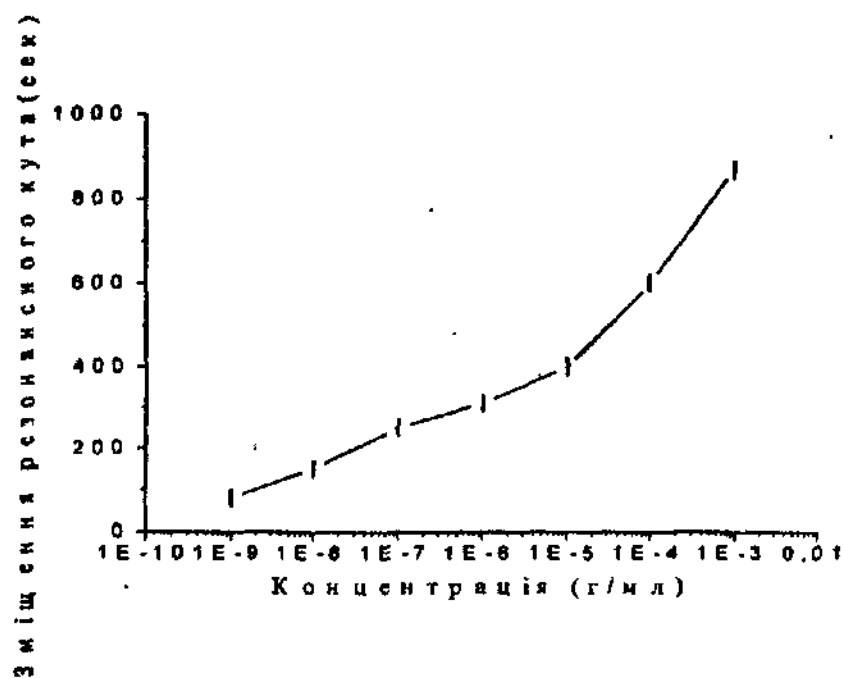


Fig. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000 м Ужгород, вул Гагаріна, 101

(03122) 3-72-89 (03122) 2-57-03