

УДК 681.586.73

Ю.Т. ЖОЛУДОВ

*Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків***ЕЛЕКТРОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ДЕТЕКТУВАННЯ МАРКОВАНИХ ОБ'ЄКТІВ**

Наведені характеристики та сфера застосування розробленого сучасного аналітичного приладу ЕЛАН-3d для електрохемілюмінесцентного детектування молекулярних маркерів. Він заповнює прогалину недорогого електрохемілюмінесцентного обладнання. ЕЛАН-3d призначений для досліджень в галузі розробки нових електрохемілюмінесцентних (ЕХЛ) маркерів, сенсорів та методів детектування та містить низку оригінальних технічних рішень. Досліджено відповідний програмно-апаратний комплекс, що повністю забезпечує проведення ЕХЛ досліджень рідких об'єктів на наявність в них ЕХЛ маркерів.

Ключові слова: електрогенерована хемілюмінесценція, маркер, детектування.

Вступ

Питання визначення малих кількостей речовин є актуальним у галузях науки та техніки, де є потреба в визначенні наявності певних об'єктів різноманітного походження. Існує достатньо загальний підхід у вирішенні такої задачі – використання речовин-маркерів, які безпосередньо пов'язані з об'єктом пошуку та легко визначаються у малих кількостях у навколишньому середовищі. Серед найпоширеніших видів маркерів, і відповідних методів їх детектування, є радіоізотопні, люмінесцентні маркери та барвники. Наявність в навколишньому середовищі останніх двох типів маркерів визначається за допомогою оптичних методів – флуоресцентного та абсорбційного. Флуоресцентне визначення слідових кількостей відповідних речовин є одним з найбільш чутливих. Однак при цьому існує певна теоретична нижня межа визначення маркера, що пов'язана із наявністю в такому методі детектування оптичного сигналу збудження люмінесценції, який дає певний вклад в аналітичний відгук системи, тобто створює певний рівень шуму. Наявність цього шуму і визначає нижню межу детектування речовин-маркерів.

Суттєво підвищити чутливість детектування можливо за рахунок використання електрохемілюмінесцентного (ЕХЛ) методу визначення маркерних речовин. Цей метод являє собою поєднання хемілюмінесцентного та електрохімічного методів аналізу, при цьому об'єднує їх основні переваги, але позбавлений більшості їхніх недоліків. Так метод хемілюмінесцентного аналізу широко поширений серед інших люмінесцентних методів дослідження завдяки його високій чутливості. Оскільки аналітичним сигналом є світло, що виникає під час хімічної реакції з участю речовини, що досліджується (маркера, аналіта), то завдяки відсутності фонового сигналу можливе детектування відгуку системи на рівні одиниць фотонів за секунду [1]. До недоліків метода можна віднести не-

можливість керування аналітичною реакцією, а саме, після додавання реагентів, відразу виникаюча хімічна реакція йде некеровано, тому частіше за все реагенти додаються безпосередньо в детекторну зону, що ускладнює конструкцію відповідних апаратів. З іншого боку електрохімічні (ЕХ) методи, насамперед, вольтамперометричні, дозволяють проводити аналіз за програмою, що повністю визначається експериментатором. Це забезпечує можливість повторювати експеримент та отримувати відтворювані результати [2]. Досягнення у мініатюризації електродних систем та керуючої електроніки дозволяють розробляти на базі цього методу вельми малорозмірні аналітичні пристрої. Недоліком електрохімічного методу аналізу є низька у порівнянні з хемілюмінесцентним методом межа детектування.

Сутність ЕХЛ методу аналізу, що поєднує переваги обох зазначених методів та значною мірою позбавлений їхніх недоліків, полягає в генерації світла під час хімічної реакції між частками, що утворюються в електродних редокс реакціях при проведенні електролізу розчину. Таким чином, відгук системи має місце тільки коли подається збуджуючий електричний сигнал. Відсутність спонтанної ЕХЛ, різна природа збуджуючого (електричного) та аналітичного (оптичного) сигналів усуває наявність фонових шумів у аналітичному сигналі та дозволяє отримати низьку межу детектування маркерних речовин на рівні до 10^{-10} М і менше [3 – 6].

Не зважаючи на суттєві переваги ЕХЛ методу детектування над багатьма іншими, на цей час перелік комерційного обладнання для ЕХЛ досліджень в світі суттєво обмежений, а в Україні взагалі не випускається. Більшість такого обладнання призначена для проведення клінічних та лабораторних досліджень методами імунного ЕХЛ аналізу за стандартними методиками та не дозволяють їх використання для інших цілей. Перший комерційний пристрій для

проточного ЕХЛ аналізу ORIGEN був розроблений фірмою Igen International, Inc. (нині частина корпорації Roche Diagnostics) у 1994 році [6, 7]. Цей пристрій був призначений для вимірювання інтенсивності ЕХЛ маркерів (біпіридилний комплекс рутенію $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ або його похідні), нанесених на поверхню магнітних мікрокульок в присутності співреагенту – трипропіламіну (ТПА). Іншим типом ЕХЛ аналізаторів, що використовують одноразові багатолуночні планшети з друкованими вуглецевими електродами, є Sector Imager та Sector PR Reader фірми Meso Scale Discovery [4, 8]. Лунки містять декілька зон зв'язування, що селективно реагують з відповідними аналітами. ЕХЛ сигнал генерується з використанням аналогу $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ - мітки $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -(-4-метил сульфонат) та ТПА або подібного співреагенту, а світло реєструється CCD камерою або лінійкою фотодіодів. Ще одна ЕХЛ система з капілярним електрофоретичним розділенням проб розроблена в Інституті прикладної хімії Чанчуня (Китай) та виробляється фірмою Xi'an Remax Electronic Co. Ltd [9, 10].

Метою даної роботи є розробка відповідного програмно-апаратного комплексу, що повністю забезпечить проведення ЕХЛ досліджень рідких об'єктів на наявність в них ЕХЛ-маркерів. Відмінність даної розробки від існуючих – повний контроль та автоматизація процедури аналізу з можливістю зміни як електрохімічної програми збудження ЕХЛ, так і компонентів ЕХЛ композиції (перш за все самих ЕХЛ-маркерів та срівреагентів).

Розроблений комплекс було застосовано для детектування дослідження можливості ЕХЛ-детектування біпіридилного комплексу рутенію $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ у новій ЕХЛ системі з співреагентом тетрафенілборат натрію у водному середовищі. Такий вибір об'єкту дослідження пов'язаний з високим аналітичним потенціалом ЕХЛ детектування з використанням цього люмінофору [4 – 6].

Аналізатор для дослідження ЕХЛ

Всі електрохемілюмінесцентні дослідження в даній роботі проводилися за допомогою розробленого комплексу ЕЛАН-3d, структурна схема якого наведена на рис. 1, а зовнішній вигляд – на рис. 2. До складу комплексу входять три основних модуля: модуль керування електрохімічними та оптичними вимірюваннями, персональний комп'ютер та плата вводу-виводу інформації Advantech PCI-1711.

Керування комплексу ЕЛАН-3d здійснюється за допомогою персонального комп'ютера з відповідним програмним забезпеченням та розміщеної на PCI шині плати вводу-виводу інформації PCI-1711 серії PC-LabCard фірми Advantech Co., Ltd. Такі плати збору даних широко використовуються для автоматизації промислового та лабораторного обла-

днання, вводу та виводу цифрової та аналогової інформації, управління різноманітними процесами та пристроями. За допомогою інтерфейсного кабелю плату поєднано з модулем керування.



Рис. 1. Структурна схема ЕХЛ-аналізатору ЕЛАН-3d

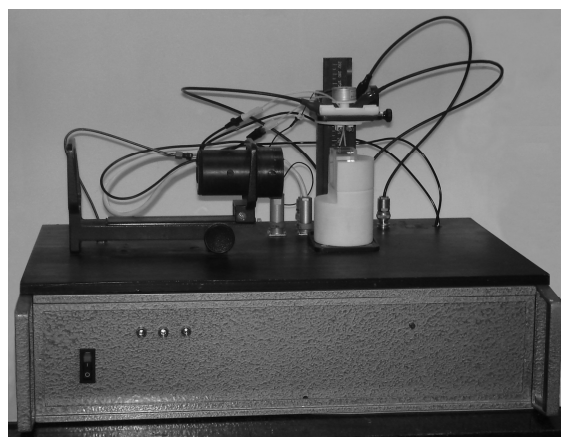


Рис. 2. Зовнішній вигляд ЕХЛ-аналізатору ЕЛАН-3d

Структурна організація комплексу зумовлена необхідністю забезпечення наступних функцій, необхідних для проведення ЕХЛ досліджень: потенціостатування трьохелектродної ячейки, одночасний вимір емісії фотонів та струму, що протікає через робочий електрод, з їх прив'язкою до сигналу збудження (потенціал робочого електроду відносно потенціалу розчину). Окрім цього додатково для забезпечення більшої функціональності приладу реалізується можливість відключення допоміжного електроду та електроду порівняння. Відключення допоміжного електроду дозволяє вимірювати рівноважний потенціал робочого електроду. Можливість відключення електроду порівняння дозволяє знизити ризик виходу з ладу електроніки потенціостата під дією статичної електрики, оскільки електрод порівняння підключено до підсилювача з високим імпедансом. Ця ситуація може виникнути під час проведення мані-

пуляцій з електрохімічною ячейкою як то заміни електродів або розчину, додавання реагентів тощо.

Реєстрація оптичного сигналу в системі здійснюється за допомогою модуля фотоелектронного помножувача (ФЕП) фірми Hamamatsu H5784-20 (робочий діапазон довжин хвиль 300 - 920 нм). Особливостями останнього є висока чутливість, мініатюрність, низька споживча потужність, наявність вбудованих джерела високовольтного живлення та перетворювача фотострум-напруга, легкість інсталяції та керування. Також передбачені функції захисту помножувача від нештатного режиму експлуатації при знятій кришці світлонепроникного боксу. Це реалізовано за допомогою схеми контролю положення кришки боксу на базі оптичних датчиків, яка відключає модуль ФЕП у разі відкриття боксу. Сам модуль ФЕП обладнано захисним пелюстковим затвором, що дозволяє закривати фотокатод помножувача для захисту від можливої деструктивної дії зовнішнього світла, коли фотоприймач не експлуатується, а також дозволяє проводити контроль темного струму ФЕП без необхідності вилучення зразка зі світлонепроникного боксу, що є важливою функцією контролю характеристик роботи модуля ФЕП.

До основних технічних характеристик комплексу слід віднести можливість роботи з трьохелектродною ЕХЛ-ячейкою, здійснювати поляризацію допоміжного електроду в діапазоні ± 10 В струмом до 10 мА, при цьому забезпечується дискретизація зміни потенціалу в 1 мВ. Використання чутливих операційних підсилювачів з МОН-транзисторами на вході забезпечує вимірювання аналітичного струмового сигналу, що проходить через ячейку, від 1 пА. Це дозволяє здійснювати високоточне потенціостаткування ячейки, що є важливим у дотриманні відповідності аналітичної техніки до обраних ЕХЛ-методик детектування. Використання модуля ФЕП з струмовою схемою реєстрації оптичного сигналу з інтегрованим пікоамперним операційним підсилювачем для перетворювання фотострум-напруга та наявність схеми керування вбудованим джерелом високовольтного живлення дозволяє проводити дослідження оптичного сигналу з динамічним діапазоном до 7 порядків величини (70 дБ), при цьому максимальна чутливість фотокатоду сягає значення 78 мА/Вт при 680 нм. Завдяки цьому мається можливість досліджувати широкий спектр аналітичних реакцій, що супроводжуються як високим, так і слабким рівнем випромінювання оптичного аналітичного сигналу.

Важливою особливістю комплексу є наявність світлозахисного боксу, де розміщується кварцова ячейка у спеціальній системі кріплення, роз'єми для підключення електродів ячейки, модуль ФЕП на рухомій підставці, система газогонів для підведення захисної аргонової атмосфери до ячейки. Система кріплення

електродів виконана у вигляді ексцентричних зажимів для швидкого встановлення електродів різної товщини та конфігурації, що зручно при проведенні наукових досліджень різних електродних матеріалів.

Програмне забезпечення аналізатора

Керування комплексом ЕЛАН-3d здійснюється повністю за допомогою спеціально написаного для цього програмного забезпечення (ПЗ). Зв'язок між ПЗ комплексу та модулем керування здійснюється через плату Advantech PCI-1711 за допомогою її драйвера. До складу основних функцій, які покладені на ПЗ комплексу ЕЛАН-3d входять: встановлення параметрів експерименту та синтез відповідної програми розгортки потенціалу робочого електроду електрохімічної комірки; видача синтезованої потенціальної програми під час експерименту та збір даних (електрохімічний струм, оптичний сигнал ЕХЛ та деякі допоміжні); обробка та відображення зібраних даних, навігація серед зібраних даних та їх збереження в файл з необхідною додатковою інформацією; контроль деяких інших елементів комплексу (підключення/відключення електродів, керування роботою модуля ФЕП, детектування перевантаження потенціостата, переповнення АЦП, розриву в ланцюзі електрода порівняння, визначення рівноважного потенціалу редокс системи і т.п.).

ПЗ комплексу ЕЛАН-3d реалізує ЕХ та ЕХЛ дослідження та аналіз методом циклічної вольтамперометрії, тобто потенціал робочого електроду лінійно змінюється з початкового значення до потенціалу реверса (анодного чи катодного), а потім повертається назад з певною швидкістю розгортки. Швидкість розгортки потенціалу може сягати значення 10 В/с, при цьому шаг зміни потенціалу складає 1,24 мВ. В залежності від потреби розгортка потенціалу може здійснюватись в один бік (анодний чи катодний) від початкового значення (половина циклу), або в обидва боки (повний цикл). Кількість циклів при цьому обмежена значенням 1000, що практично більш ніж достатньо для реальних задач. Для зручності користування програма розгортки графічно відображається у вікні налаштування параметрів експерименту (рис. 3). В залежності від обраного режиму роботи на панелі результатів відображаються один (електрохімічні) або два (електрохімічні та ЕХЛ) набори даних. Для зручності проведення експериментів на графічній панелі окрім результатів останнього дослідження можливе відображення всіх, лише обраних або n останніх результатів. Крім того можливо додавати до переліку відображених результатів дані, завантажені з зовнішнього файлу на жорсткому диску комп'ютера. Також для зменшення шумів та спрощення аналізу даних є можливість їх фільтрації при відображенні кількома простими методами.

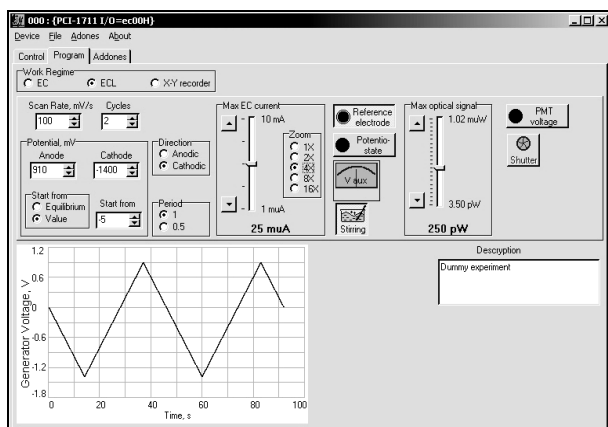


Рис. 3. Налаштування параметрів експерименту

Реактиви

Реактиви для досліджень використовувалися кваліфікації «хімічно чисті». Всі розчини готувались з використанням бідистильованої води з електропровідністю у діапазоні $0,1 \div 0,3$ См.

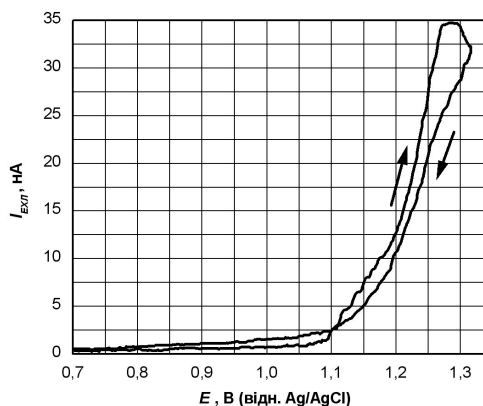
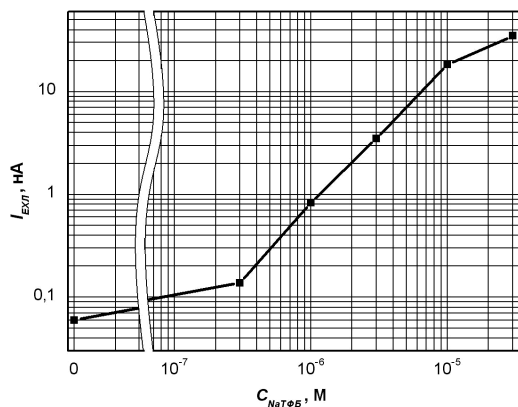
ЕХЛ дослідження проводились у триелектродній електрохімічній ячейці. В якості робочого електроду використовувався диск діаметром 2 мм, в якості допоміжного – пластина розміром $15 \times 25 \times 1,5$ мм зі скловуглеця марки СУ2000, електрод порівняння – насичений Ag/AgCl. Всі дослідження проводилися у водному розчині з концентрацією фонового електроліту NaClO₄ (Sigma-Aldrich) 0,1 М. В якості люмінофору для ЕХЛ реакції використовувався біпіридилний комплекс рутенію Ru(bpy)₃²⁺ (Sigma-Aldrich) та сореагент тетрафенілборат натрію NaТФБ (Sigma-Aldrich). Перед проведенням експериментів здійснювалося барботування розчину аргонем (кваліфікації х.ч.) на протязі 5 хв для видалення розчиненого атмосферного кисню, який, як відомо, призводить до ефективного гасіння люмінесценції.

Результати та обговорення

У дослідженні ЕХЛ детектування маркеру Ru(bpy)₃²⁺ зі співреагентом NaТФБ, реакція ЕХЛ з яким йде за схемою окислювального відновлення [11], використовувався метод циклічної вольтамперометрії зі швидкістю лінійної розгортки потенціалу 100 мВ/с. На рис. 4 наведена типова циклічна вольтлюменограма ЕХЛ розчину $0,75 \times 10^{-4}$ М Ru(bpy)₃²⁺, 10^{-4} М NaТФБ у воді. З рисунку видно, що емісія ЕХЛ починається при потенціалі електрода 1,1 В, що відповідає потенціалу окислення люмінофора Ru(bpy)₃²⁺ у воді [11].

Для перевірки можливості аналітичного застосування розробленого комплексу ЕЛАН-3d було проведено дослідження залежності ЕХЛ системи від концентрації співреагенту NaТФБ. На рис. 5 наведено залежність інтенсивності ЕХЛ розчину $0,75 \times 10^{-4}$ М Ru(bpy)₃²⁺ від концентрації NaТФБ у воді. Отримані результати демонструють лінійний

відгук ЕХЛ в діапазоні концентрацій співреагенту $3 \times 10^{-7} \div 10^{-5}$ М з межею визначення 4×10^{-5} М (співвідношення сигнал/шум = 3). При цьому нелінійність характеристики для концентрації NaТФБ більше 10^{-5} М пов'язана з формуванням на електроді плівки продуктів реакції, що блокує редокс процеси. Таким чином запропонована маркерна ЕХЛ система Ru(bpy)₃²⁺ та NaТФБ та розроблений програмно-апаратний комплекс ЕЛАН-3d дозволяють проводити детектування на рівні концентрацій 3×10^{-7} М у водному середовищі, що є досить чутливим.

Рис. 4. Циклічна вольтлюменограма ЕХЛ розчину $0,75 \times 10^{-4}$ М Ru(bpy)₃²⁺ + 10^{-4} М NaТФБ у воді (фоновий електроліт 0,1 М NaClO₄, швидкість сканування 100 мВ/с)Рис. 5. Залежність інтенсивності ЕХЛ розчину $0,75 \times 10^{-4}$ М Ru(bpy)₃²⁺ від концентрації NaТФБ у воді (фоновий електроліт 0,1 М NaClO₄, швидкість сканування 100 мВ/с)

Висновки

Розроблений комплекс ЕЛАН-3D має технічні характеристики, що відповідають сучасному світовому рівню. Комплекс спрямовано переважно на дослідження нових маркерних електрохемілюмінесцентних композицій, електродних матеріалів та методик ЕХЛ детектування. Він також надає можливість проводити розробку нових інноваційних методик аналізу та відповідного обладнання з залученням досягнень у областях новітніх матеріалів та нанотехнологій. Цей

факт зумовлює перспективу використання комплексу як бази для розробки та випробувань різноманітних сенсорних пристроїв – пріоритетної задачі у області розробки сучасних аналітичних систем.

В якості прикладу можливостей розробленого устаткування було проведено дослідження можливості чутливого ЕХЛ детектування маркерної системи люмінофору $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ зі співреагентом NaTFB . Показано, що запропонована маркерна система може бути зареєстрована ЕХЛ методом у водному середовищі при концентрації до 3×10^{-7} М, тобто у слідових кількостях. Варто також зазначити, що запропонована маркерна ЕХЛ система містить два компоненти, один з яких не має люмінесцентних властивостей. Це дозволяє, в залежності від потреби, використовувати в якості маркера цільових об'єктів як люмінесцентну, так і нелюмінесцентну сполуку.

Робота виконана в рамках міжнародних проектів Українського науково-технологічного центру 4180 та 4495 (керівник д-р фіз.-мат. наук, проф. М.М. Рожницький).

Література

1. Бабко А.К. Хемилюминесцентный анализ / А.К. Бабко, Л.И. Дубовенко, Н.М. Луковская. – К.: Техника, 1966. – 252 с.
2. Allen J. *Electrochemical methods: fundamentals and applications* / J. Allen Bard, R. Larry Faulkner. – New York: John Wiley & Sons, 2001. – 833 p.
3. Рожницький Н.Н. *Электрохимическая люминесценция: монография* / Н.Н. Рожницький, А.И. Бых,

М.А. Красноголовец. – Х.: ХТУРЭ, 2000. – 320 с.

4. *Electrogenerated chemiluminescence* / Ed. by A.J. Bard. – NY: Marcel Dekker, 2004. – 532 p.

5. Fährnich K.A. *Recent applications of electro-generated chemiluminescence in chemical analysis* / K.A. Fährnich, M. Pravda, G.G. Guilbault // *Talanta*. – Amsterdam: Elsevier, 2001. – № 54 (4). – P. 531-559.

6. Miao W. *Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications* / W. Miao // *Chem. Rev.* – Washington: ACS Publications, 2008. – № 108. – P. 2506-2553.

7. Yang H. *Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool* / H. Yang, J.K. Leland, D. Yost, R.J. Massey // *Nature Biotechnology*. – London: Macmillan Publishers Ltd, 1994. – № 12. – P. 193-194.

8. *Handbook of electrochemistry* / Ed. by C.G. Zoski. – Amsterdam: Elsevier, 2007. – 935 p.

9. Yin X.-B. *Analytical applications of the electrochemiluminescence of tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium and its derivatives* / X.-B. Yin, S. Dong, E. Wang // *Trends Anal. Chem.* – Amsterdam: Elsevier, 2004. – № 23. – P. 432-441.

10. Chiang M.T. *A simple and low-cost electrochemiluminescence detector for capillary electrophoresis* / M.T. Chiang, M.C. Lu, C.W. Whang // *Electrophoresis*. – Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2003. – V. 24. – P. 3033-3039.

11. Leland K. *Electrogenerated chemiluminescence: an oxidative-reduction type ECL reaction sequence using tripropyl amine* / K. Leland, M.J. Powell // *J. Electrochem. Soc.* – New Jersey: ECS, 1990. – № 137. – P. 3127-3129.

Надійшла до редакції 25.10.2010

Рецензент: д-р техн. наук, проф., завідувач кафедри Ю.П. Мачехін, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків.

ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ МАРКИРОВАННЫХ ОБЪЕКТОВ

Ю.Т. Жолудов

Приведены характеристики и область применения разработанного современного аналитического прибора ЭЛАН-3d для электрохемилюминесцентного детектирования молекулярных маркеров. Он заполняет нишу недорогого электрохемилюминесцентного оборудования. ЭЛАН-3d предназначен для исследований в области разработки новых электрохемилюминесцентных (ЭХЛ) маркеров, сенсоров и методов детектирования и содержит ряд оригинальных технических решений. Исследован соответствующий программно-аппаратный комплекс, который полностью обеспечивает проведение ЭХЛ исследований жидких объектов на наличие в них ЭХЛ-маркеров.

Ключевые слова: электрогенерирующая хемилюминесценция, маркер, детектирование.

ELECTROCHEMILUMINESCENT DETECTION OF LABELED

Yu.T. Zholudov

Descriptions and application there is developed a modern analytical device ELAN-3d for electrochemiluminescent detection of molecular markers. It fills the gap of inexpensive electrochemiluminescent (ECHL) equipment. ELAN-3d is intended for researches in the field of development of new ECHL markers, sensors and detection methods and contains a number of original technical solutions. The proper hardware-software complex which fully provides the leadthrough of ECHL researches of liquid objects on a presence in them ECHL-markers is investigational.

Keywords: electro-generating хемилюминесценция, marker, detection.

Жолудов Юрій Тимофійович – канд. фіз.-мат. наук, старший науковий співробітник НДЛ, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків, e-mail: yurets_z@rambler.ru.