

**Е.В. Костюкевич, С.А. Костюкевич**

## **СЕНСОР ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ БАРБИТУРАТОВ В ЖИДКОЙ ПРОБЕ**

Разработана методика управления селективностью поверхности сенсора поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием самоорганизованной матричной системы золото—меркаптаны разной длины и структуры. Показано, что механизм, обуславливающим селективность взаимодействия, является формирование отпечатков молекул-аналитов в поверхностном органическом слое. Этот слой позволяет, например, регистрировать барбитуровую кислоту на фоне ее химических аналогов (веронал). Высокая селективность этих искусственных химических рецепторов для барбитуровой кислоты была продемонстрирована в широком диапазоне концентраций с использованием спектроскопии ППР.

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс (ППР), самоорганизованные монослои (СОМ), меркаптаны, барбитураты.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Прошло почти 30 лет с тех пор, как открытое Вудом явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [1] впервые применили для детектирования газовых и биологических молекул в реальном масштабе времени без использования каких-либо меток [2].

Суть ППР эффекта состоит в резонансном связывании фотонов света, линейно поляризованного в плоскости падения, с колебаниями свободных электронов на поверхности металла (поверхностными плазмонными поляритонами (ППП)), что приводит к возбуждению сильной электромагнитной волны. Возбужденная волна плотности заряда распространяется вдоль границы раздела металл/диэлектрик и экспоненциально затухает в направлении оптически менее плотной среды на расстоянии порядка длины волны. Существование волны поверхностных плазмонов (ВПП) обуславливается диэлектрическими свойствами металла, обычно золота или серебра, и контактирующего с металлом диэлектрического слоя (аналита). Таким образом, биохимический ППР сенсор является очень чувствительным тонкопленочным рефрактометром, который измеряет изменения коэффициента преломления, вызываемые адсорбцией или взаимодействием молекул на металлической поверхности сенсора [3].

Для связывания света с ППП в сенсорных приборах используют метод ослабленного полного внутреннего отражения (призменное связывание по схеме Кретчмана) и метод дифракционной решетки [4]. Резонансное связывание проявляется как резкое падение (минимум) в спектре отражения света, которое обычно отслеживается при измерении длины волны, угла падения или интенсивности отраженного света.

Работа биохимических ППР сенсоров заключается в том, что на металлическую поверхность преобразователя наносится чувствительный материал (т.е. система биомолекул-рецепторов или их синтетических аналогов), который может специфически и с высокой селективностью взаимодействовать с интересующими молекулами. При наличии в исследуемой пробе молекул-аналитов происходит их связывание с чувствительным молекулярным слоем, что фиксируется сенсором в виде выходного сигнала прибора [5].

© Е.В. Костюкевич, С.А. Костюкевич, 2010

Настоящая работа посвящена разработке методики модификации золотой поверхности ППР-сенсора матрицей меркаптанов разной длины и структуры в целях детектирования уровня барбитуратов в жидкой пробе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Самоорганизованные монослои (СОМ) алкантиолов как модифицирующие покрытия для металлических поверхностей биосенсоров.* ППР-сенсор позволяет исследовать процессы молекулярного взаимодействия, происходящие в жидкой среде непосредственно на золотой поверхности преобразователя. В этом случае требование стабильности и воспроизводимости физических параметров чувствительного золотого покрытия является определяющим для получения достоверных и точных количественных результатов. Вместе с тем, непосредственная адсорбция биомолекул на поверхность золотой пленки зачастую приводит к их деструкции вследствие сильного взаимодействия с золотом атомов серы, играющих существенную роль в образовании биомолекул [6]. Этот процесс сопровождается существенным изменением физико-химических свойств молекулы и даже полной потерей ее биологической активности. Рассмотренные выше проблемы обуславливают необходимость применения переходных слоев. При этом максимальную чувствительность преобразователя обеспечивает переходный слой, толщина которого намного меньше глубины проникновения ВПП во внешнюю среду (100—200 нм для излучения в видимой области спектра).

Как известно, для создания чувствительных элементов биохимических сенсорных систем с высокой селективностью можно использовать самособирающиеся молекулярно-организованные органические пленки с контролируемым составом, структурой и толщиной [7]. Наибольшее распространение получили переходные слои на основе функционализированных меркаптанов [8], в частности алифатических тиолов ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ ) благодаря простой технологии получения, стабильности и функциональному разнообразию. Основная идея применения этих линейных молекул состоит в использовании высокого сродства золота к атомам серы. Организация модифицирующего переходного слоя на поверхности благородного металла происходит методом самопроизвольной хемосорбции из раствора, преимущественно в этаноле, с концентрацией тиола  $(0,1-1,0) \cdot 10^{-3} \text{M}$  [9] и состоит из двух этапов. Первоначально происходит взаимодействие HS-группы тиола и поверхностных атомов золота с образованием тиолата золота ( $\text{RS}^-\text{Au}_3^+$ ), а также сопровождающиеся выделением водорода [10]. Затем следует микроструктурная организация связанного монослоя (внутренняя молекулярная конформация слоя), которая управляется значительным гидрофобным взаимодействием алифатических цепей.

Таким образом, в результате процесса молекулярной самоорганизации формируется гексагонально упакованная двумерная структура с трансформированными углеводородными цепями, отклоненными от нормали  $\sim 30^\circ$  [11]. При условии, что длина углеводородной цепи  $n > 9$ , на поверхностях совершенных монокристаллов золота образуются высокоупорядоченные мономолекулярные органические покрытия, которые создают значительный барьер для переноса электронов и ионов, а также имеют высокую кинетическую и термодинамическую стабильность [12].

Формирование монослоя тиолата золота происходит вследствие многоступенчатого процесса, протекающего в течении нескольких дней [13], и сопровождается реконструкцией поверхности благородного металла [14]. При этом функциональные терминальные группы образуют поверхность, которая определяет физико-химические свойства модифицированной металлической поверхности [15], а углеводородные цепи обеспечивают ее пространственное экранирование на

десятки ангстрем (длина связи С—Н  $\sim 1,1 \text{ \AA}$ ), что существенно не влияет на чувствительность сенсора.

Функциональные возможности самоорганизованных монослоев для сенсорных применений можно расширить, изменяя микроструктуру молекулярной границы раздела (формирование двумерного рисунка). Для получения микромасштабного рельефа на поверхности тиолов можно использовать различные приемы реализации поверхностной топологии: микрозапись, химическое фрезерование, штамповку и ультрафиолетовую микролитографию [16—18]. Но наиболее простым и доступным способом можно считать использование монослоев смеси тиолов, которые содержат компоненты с различной длиной цепи и отличными функциональными группами [19, 20]. Такие монослои получают самопроизвольной соадсорбцией нескольких тиолов из раствора. При этом они имеют плотноупакованные внутренние области, примыкающие к золотой поверхности, и наружную область с заданным рельефом. Составы раствора и полученного монослоя не совпадают. Относительная пропорция компонентов в пленке будет зависеть от таких параметров, как соотношение компонентов в растворе, длина цепей, растворимость тиолов в растворителях и свойств терминальных групп цепей.

Поверхностную структуру монослоя тиола можно контролировать изменением относительной концентрации тиолов в растворе. Отметим, что свойством преимущественной адсорбции обладают тиолы с большей длиной цепи, а окончательный состав монослоя существенно зависит от относительной растворимости компонентов в растворителе.

**Формирование матричных СОМ алкантиолов для прямого обнаружения низкомолекулярных соединений.** Для конструирования селективных биохимических сенсоров необходимо функционализировать рабочую поверхность прибора так, чтобы она избирательно взаимодействовала с определенной разновидностью молекулы. Одним из способов введения элементов молекулярного распознавания является формирование на поверхности сенсора монослоя из смеси меркаптанов (матрицы).

На основе известных представлений о формировании самоорганизованных матричных систем на поверхностях благородных металлов из двухкомпонентного раствора серосодержащих молекул с различной длиной углеводородной цепи и отличными функциональными группами разработана селективная ППП сенсорная система для прямого качественного и количественного обнаружения барбитуровой кислоты в жидкой пробе.

Барбитураты выбраны в качестве объектов распознавания, поскольку задача контроля их уровня в биологических жидкостях является крайне актуальной. Эти низкомолекулярные соединения: депрессанты центральной нервной системы, используются в медицине как болеутоляющие, снотворные и противосудорожные средства. При хроническом использовании барбитуратов развивается привыкание к ним, и смерть может наступить как от передозировки, так и от резкого прекращения приема.

В частности, органическую монослойную матрицу (рис. 1) для селективной адсорбции барбитуровой кислоты (малонилмочевины)  $C_4H_4O_3N_2$  на золотой поверхности оптического ППП преобразователя получали самопроизвольной соадсорбцией смеси молекул додекантиола  $HS(CH_2)_{11}CH_3$  и тиобарбитуровой кислоты  $C_4H_4O_2N_2S$ . Применение тиобарбитуровой

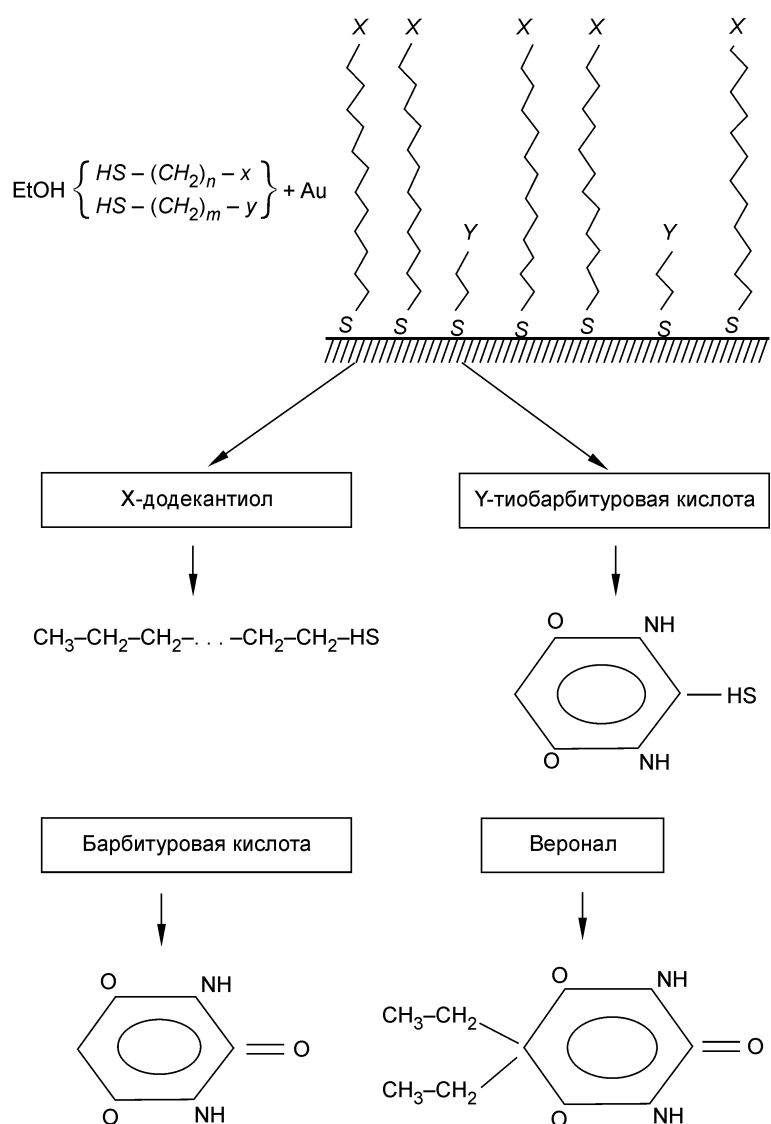


Рис. 1. Схема организации органической матрицы меркаптанов на золотой поверхности ППР преобразователя и структурные формулы компонентов, участвующих в процессе формирования матрицы, а также в эксперименте по идентификации барбитуровой кислоты

кислоты обусловлено тем, что она является структурным серосодержащим аналогом идентифицируемого вещества. Чтобы достичь полного растворения веществ, в качестве раствора использовали смесь воды (растворитель для барбитурата) и этилового спирта (растворитель для тиола).

Формирование матрицы на погруженных в раствор свежеприготовленных пленках золота происходило за 72 ч при постоянной температуре 297 К. Затем образцы промывали в потоке чистого растворителя в течение 1 ч для удаления остатков физически адсорбированных веществ и сушили в потоке сухого и чистого воздуха. Поскольку компоненты сильно отличаются по длине цепи и растворимости, состав раствора подбирали экспериментальным путем и получали следующим образом: готовили  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствор додекантиола  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$  в этиловом спирте — раствор а; готовили  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствор тиобарбитуровой кислоты  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$  в 50 % смеси воды и этилового спирта — раствор б; смешивали растворы а и б в соотношении 1:20.

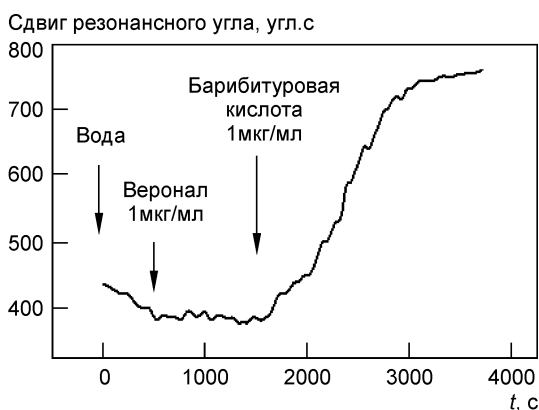


Рис. 2. Сенсограмма взаимодействия веронала (1 мкг/мл) и барбитуровой кислоты (1 мкг/мл) с поверхностью ППР преобразователя, модифицированной органической матрицей меркаптанов

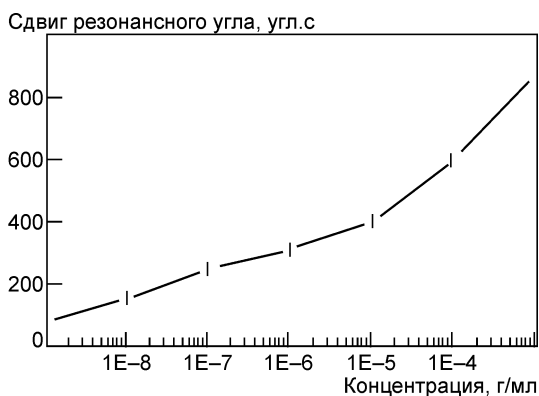
Для проверки свойств модифицирующего покрытия были проведены ППР исследования с использованием автоматизированного одноканального прибора Плазмон-5, разработанного в Институте физики полупроводников

НАНУ совместно с Mivitec GmbH-Analytical  $\mu$ -Systems ([www.micro-systems.de](http://www.micro-systems.de)). Прибор обеспечивает измерение полной ППР кривой в угловой конфигурации по схеме Кречмана с механической разверткой угла падения в пределах  $18^\circ$  на воздухе ( $12^\circ$  в стекле) и точностью  $5''$  угловых, а также возможностью абсолютной калибровки по углу.

Схема организации органической матрицы на золотой поверхности ППР-преобразователя, а также структурные формулы компонентов, участвующих в процессе формирования матрицы и в эксперименте по идентификации барбитуровой кислоты, приведены на рис. 1. Приготовленная таким образом органическая монослойная матрица с высокой степенью селективности связывала молекулы барбитуровой кислоты из водного раствора, тогда как адсорбции близкого структурного аналога этого вещества — барбитала (веронала)  $C_8H_{12}O_3N_2$ , не происходило, что демонстрирует сенсограмма, представленная на рис. 2. В результате исследования кинетических концентрационных ППР зависимостей построена калибровочная кривая (рис. 3). С ее помощью можно определять концентрацию барбитуровой кислоты в водной пробе в диапазоне концентраций 1 нг/мл—1 мг/мл.

Необходимо особо подчеркнуть, что при наномолекулярной архитектуре самоорганизованного покрытия, особая роль отводится совершенству структуры подложки, поскольку любые искажения формы матрицы меркаптанов обуславливают нарушение или полное отсутствие селективного взаимодействия с исследуемым веществом. Поэтому в качестве подложек рекомендуется использовать пленки золота, напыленные без подогрева подложки с последующим температурным отжигом при  $120^\circ C$ , так как в них будет отсутствовать мелкомасштабная шероховатость поверхности [21].

Рис. 3. Экспериментальная калибровочная кривая для количественного определения барбитуровой кислоты в жидкой пробе в диапазоне концентраций 1 нг/мл—1 мг/мл



## ВЫВОДЫ

Предложен и реализован способ формирования матрицы серосодержащих веществ на золотой поверхности ППР преобразователя для молекулярного распознавания низкомолекулярных соединений (барбитуровая кислота —  $C_4H_4O_3N_2$ ). Способ заключается в самопроизвольной сорбции серосодержащих молекул с различной длиной углеводородной цепи и различными функциональными группами, одна из которых является структурным аналогом идентифицируемого вещества (тиобарбитуровая кислота  $C_4H_4O_2N_2S$ ), из двухкомпонентного раствора. Сформированная таким образом монослойная матрица с высокой степенью селективности адсорбировала из водного раствора молекулы барбитуровой кислоты, тогда как адсорбции близкого структурного аналога этого вещества — веронала ( $C_8H_{12}O_3N_2$ ), не происходило. Исследованы кинетические концентрационные ППР зависимости взаимодействия СОМ матрицы с барбитуровой кислотой в широком диапазоне концентраций (1 нг/мл—1 мг/мл) с использованием прибора Плазмон-5.

**E.V. Kostyukevych, S.A. Kostyukevych**

### **SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR FOR DETERMINATION OF THE BARBITURATE LEVEL IN A LIQUID SAMPLE**

The method to control surface selectivity of the sensor based on the surface plasmon resonance (SPR) using a self-assembled matrix system gold/mercaptane of various length and structure has been developed. It has been shown that the mechanism that determines selectivity of interaction is formation of molecules-analyte prints inside the surface organic layer. This layer allows, for instance, to register barbituric acid against a background of its chemical analogs (veronal). High selectivity of these artificial chemical receptors for the barbituric acid was demonstrated within a wide range of concentrations with the use of SPR spectroscopy.

**Keywords:** surface plasmon resonance (SPR), self-assembled monolayers (SAMs), mercaptanes, barbiturates.

1. Wood R.W. // *Phil. Mag.* — 1902. — **23**. — P. 310—315.
2. Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing // *Sensors and Actuators*. — 1983. — **4**. — P. 299—304.
3. *Surface plasmon resonance-based sensors* / Ed. by J. Homola. — Berlin / Heidelberg: Springer, 2006. — 251 p.
4. Homola J., Koudela I., Yee S.S. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction grating and prism couplers: sensitivity comparison // *Sensors and Actuators. B.* — 1999. — **54**. — P. 16—24.
5. Ramsden J.J. Optical biosensors // *J. Molecular Recognition*. — 1997. — **10**. — P. 109—120.
6. *Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: a comparison between sulfides, disulfides, and thiols* / Ch. Jung, O. Dannenberger, Y. Xu et al. // *Langmuir*. — 1998. — **14**. — P. 1103—1107.
7. Ulman A. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. — San Diego, CA: Academic Press, 1991. — 352 p.
8. *Self-assembled monolayers of supramolecular compounds for chemical sensors* / T. Weib, K.D. Schierbaum, U.T. Velzen et al. // *Sensors and Actuators. B.* — 1995. — **26/27**. — P. 203—207.
9. *Golden interfaces: the surface of self-assembled monolayers* / E. Delamarche, B. Michel, H.A. Biebuyck, C. Gerber // *Advanced Materials*. — 1996. — **8**. — P. 719—729.
10. Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers // *Chem. Rev.* — 1996. — **96**. — P. 1533—1554.
11. Fenter P., Eberhardt A., Eisenberger P. Self-assembly of *n*-alkyl thiols as disulfides on Au(111) // *Science*. — 1994. — **266**. — P. 1216—1218.
12. Keller H., Schrepp W., Fuchs H. Self-assembled organic films on gold and silver // *Thin Solid Films*. — 1992. — **210/211**. — P. 799—802.
13. Peterlinz K.A., Georgiadis R. In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy // *Langmuir*. — 1996. — **12**. — P. 4731—4740.
14. McCarly R.L., Kim Y.-T., Bard A.J. Scanning tunneling microscopy and quartz crystal microbalance studies of Au exposed to sulfide, thiocyanate, and *n*-octadecanethiol // *J. Phys. Chem.* — 1993. — **97**. — P. 211—215.

15. *Bain C.D., Evall J., Whitesides G.M.* Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group and solvent // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1989. — **111**. — P. 7155—7164.
16. *Patterned self-assembled monolayers and meso-scale phenomena* / A. Kumar, N.L. Abbot, E. Kim et al. // *Acc. Chem. Res.* — 1995. — **28**. — P. 219—226.
17. *Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy* / G.P. Lopez, H.A. Biebuyck, R. Harter et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1993. — **115**. — P. 10774—10781.
18. *Deep UV photochemistry of chemisorbed monolayers: patterned coplanar molecular assemblies* / C.S. Dulcey, J.H. Georger, Jr.V. Krauthamer et al. // *Science*. — 1991. — **252**. — P. 551—554.
19. *Dynamics of the formation of mixed alkanethiol monolayers: application in structuring biointerfacial arrangements* / C. Cotton, A. Glidle, G. Beamson, J.M. Cooper // *Langmuir*. — 1998. — **14**. — P. 5139—5146.
20. *Bain C.D., Whitesides G.M.* Formation of monolayers by the co-adsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1989. — **111**. — P. 7164—7175.
21. *Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters* / B.A. Snopok, E.V. Kostyukevich, S.I. Lysenko et al. // *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. — 2001. — **4**, N 1. — P. 56—69.

Институт физики полупроводников  
им. В.Е. Лашкарева  
НАН Украины  
Проспект Науки, 41  
03028 Киев

Получено 03.03.2010