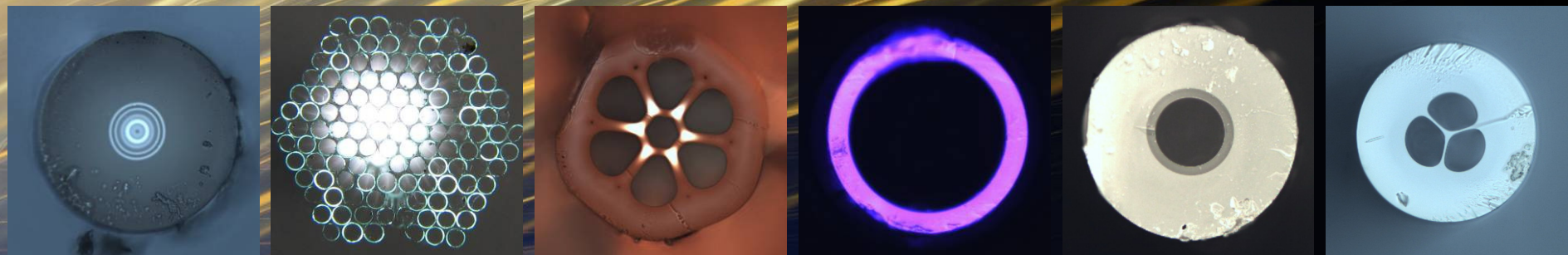




Vláknově-optická detekce biologických vzorků

Ústav fotoniky a elektroniky, AVČR, v.v.i.
I. Kašík, O. Podrazký

www.ufe.cz/dpt240, www.ufe.cz



Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, v.v.i.



*Prof. Jiří Homola
Česká hlava 2009*



ZÁKLADNÍ VÝZKUM:

fotonika

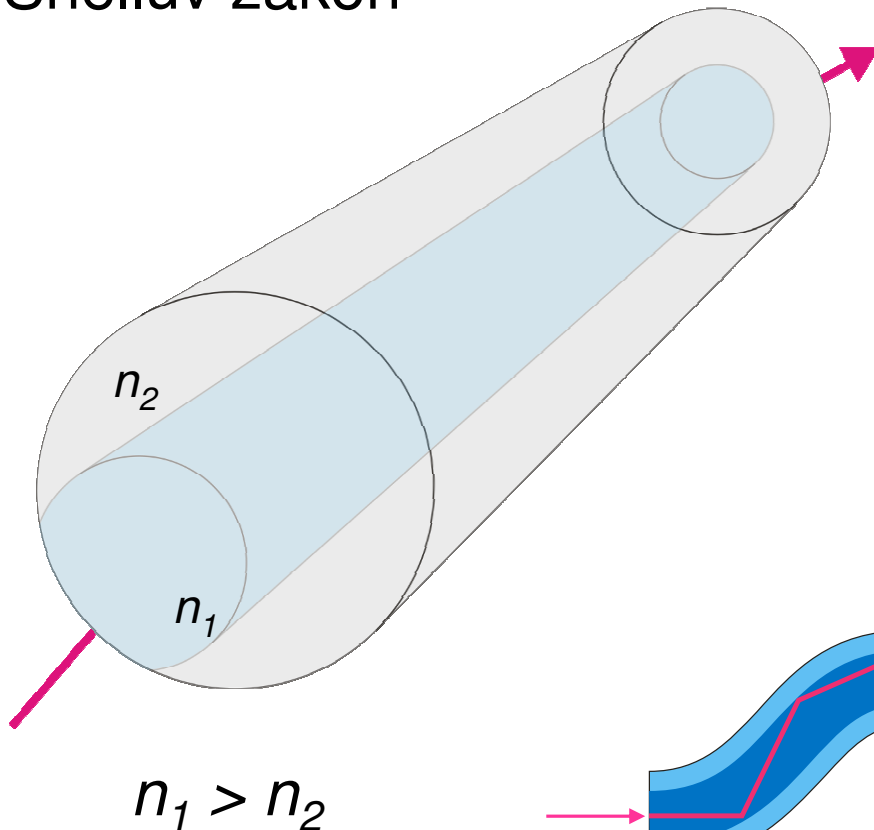
- **optická vlákna**
- vláknové lasery a zesilovače
- optické **biosenzory**

státní etalon času (10^{-15} s), detekce **pole živých buněk**

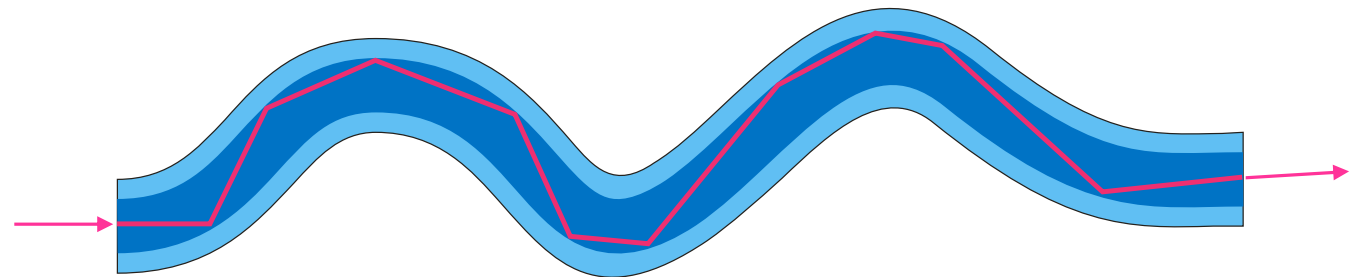
Optické vlákno

Dielektrická struktura, délka \gg poloměr, totální odraz : $n_{\text{jádro}} > n_{\text{obal}}$

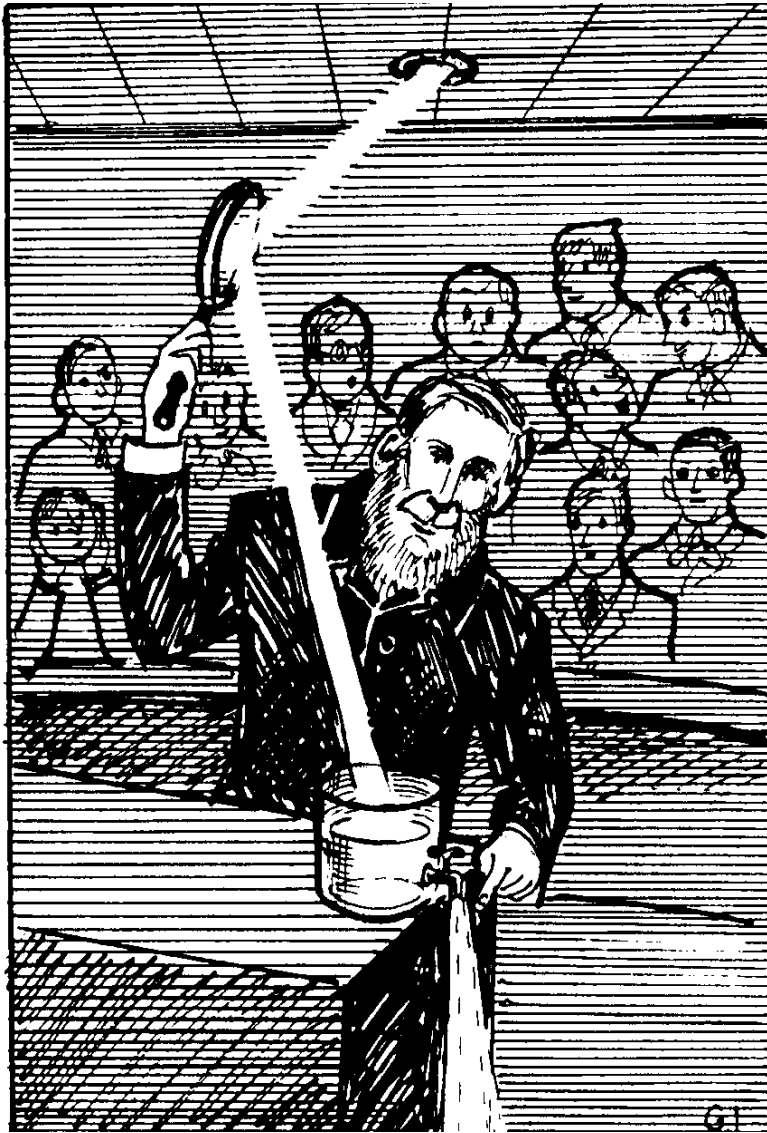
Snellův zákon



Index lomu ($n=c/v$)	
Vakuum	1
Vzduch	1,0003
Voda	1,330
Křemenné sklo	1,457



Optické vlákno - princip



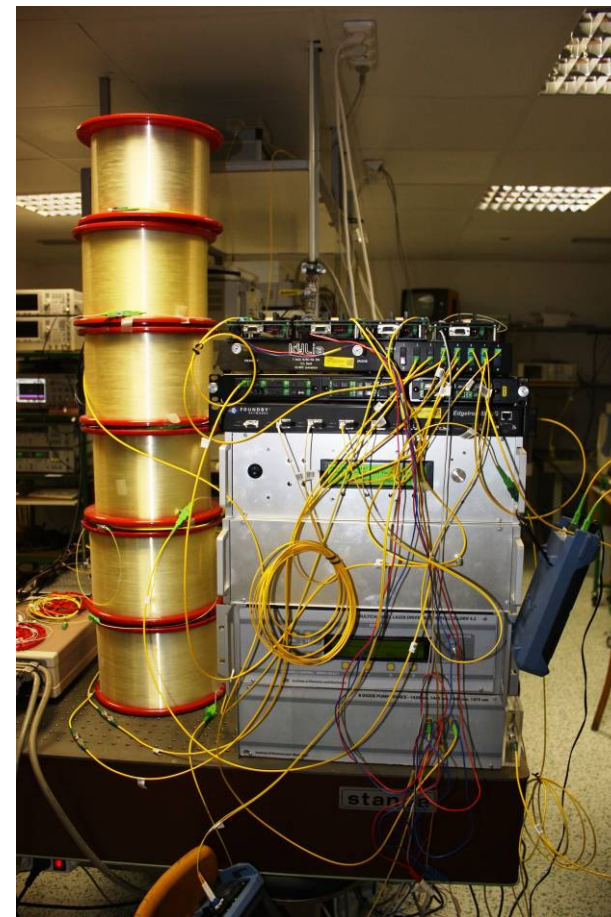
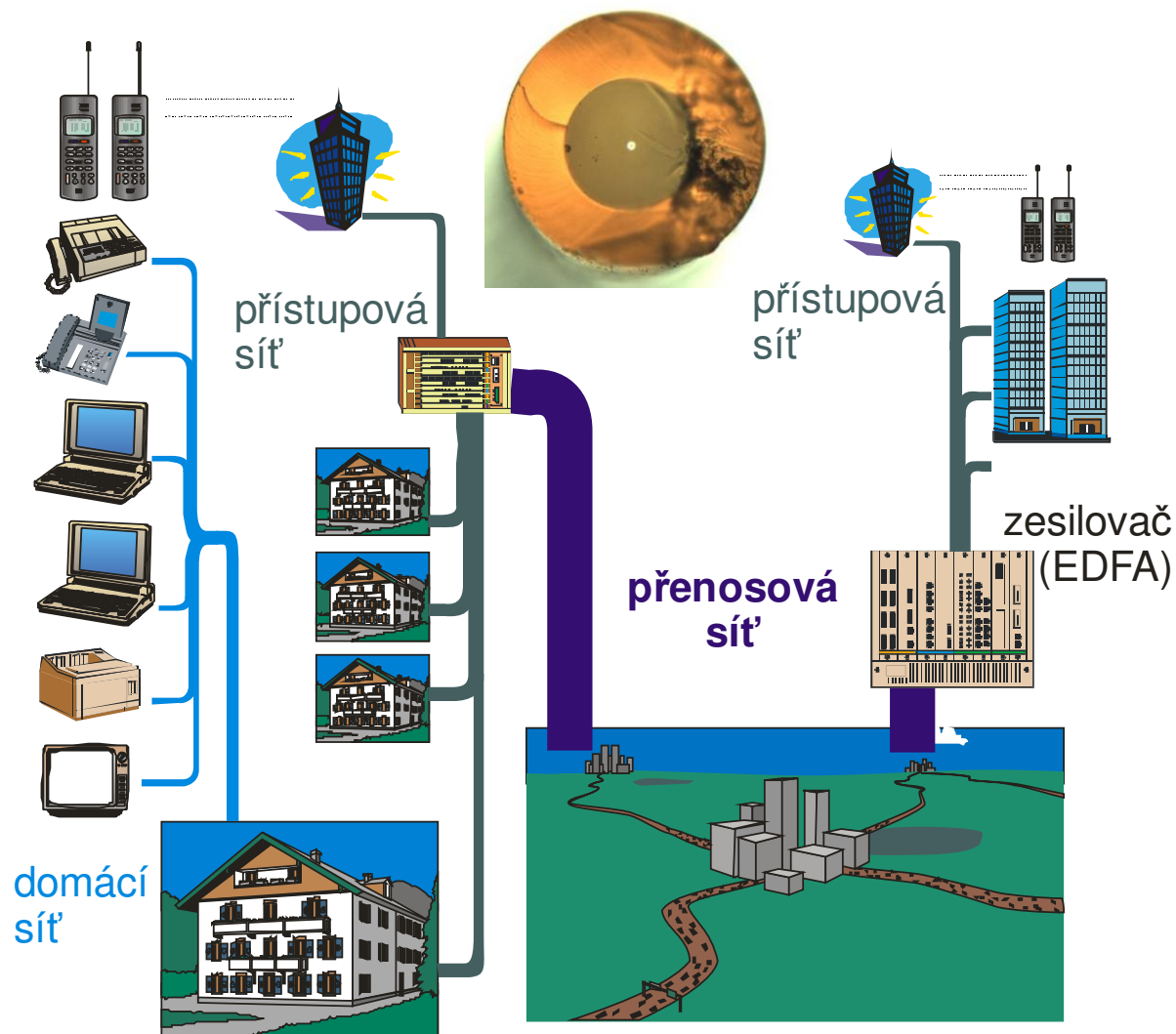
Tyndall John
1853

Snell Willebrord 1580-1626



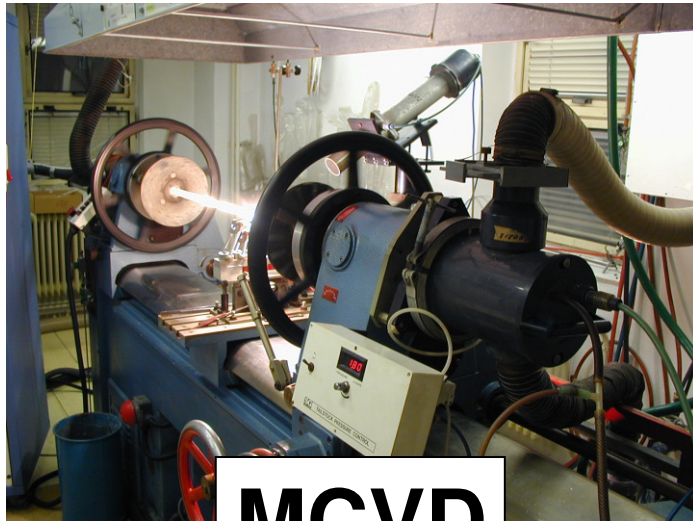
František Křižík, 1891

Optická vlákna a komunikace

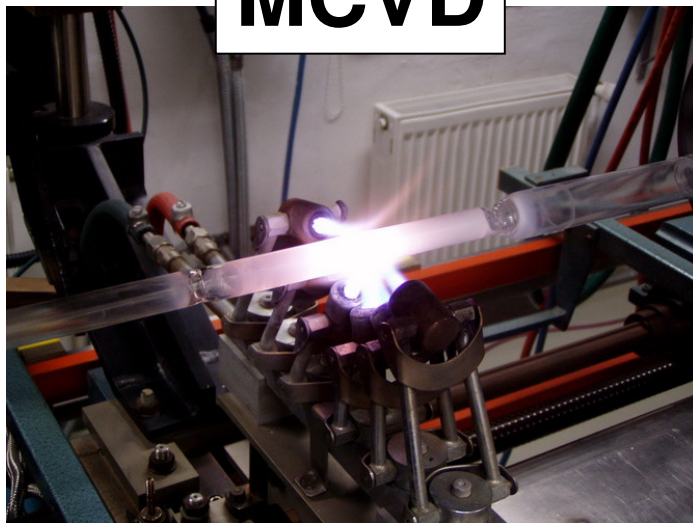


ÚFE & Cesnet
Praha - Brno

Příprava optických vláken

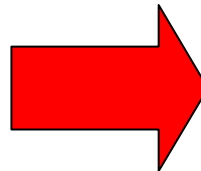


MCVD

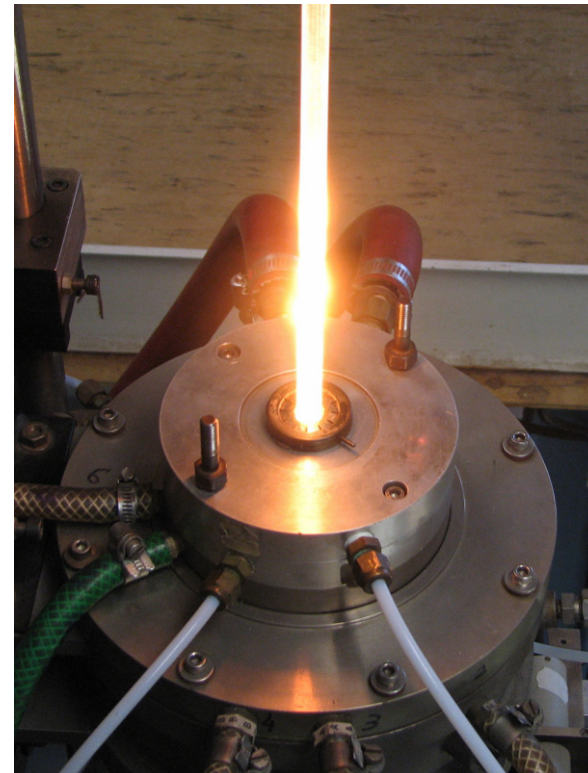


úfe

preforma

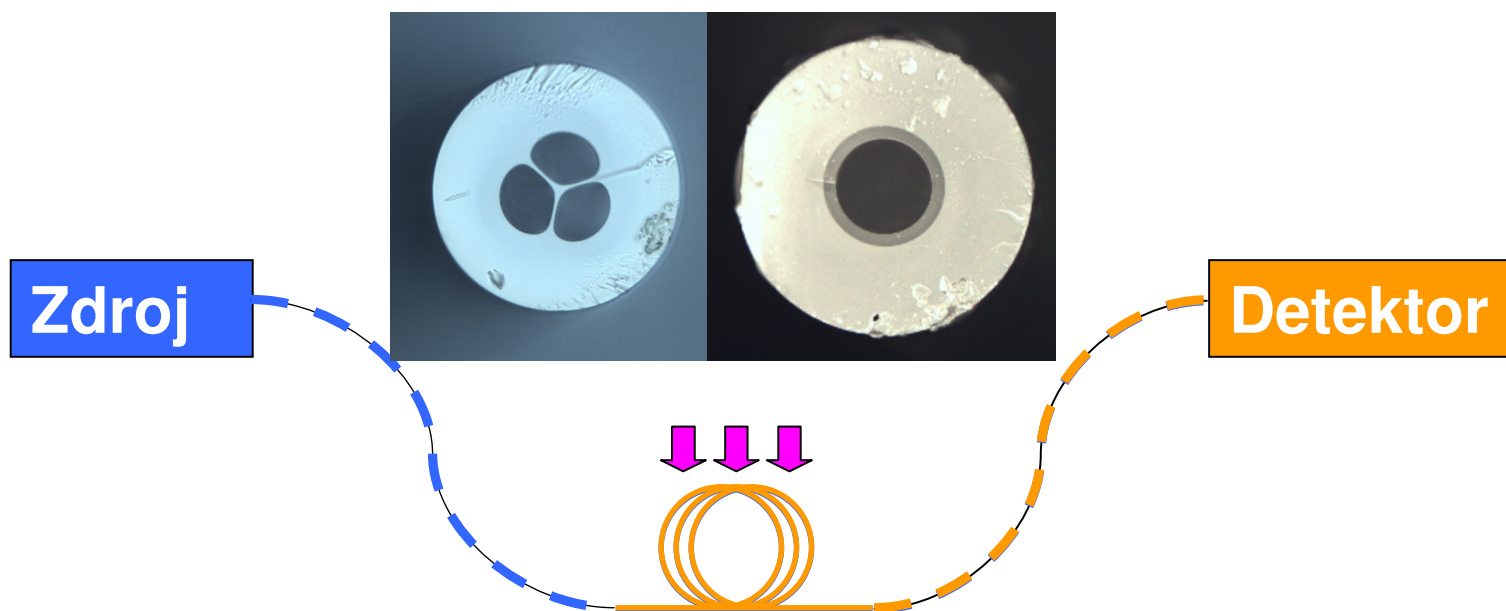


Tažení



Optická vlákna a detekce : optické (vláknové) senzory

Malá zařízení pro kontinuální monitorování (bio)chemických látek a jejich koncentrace

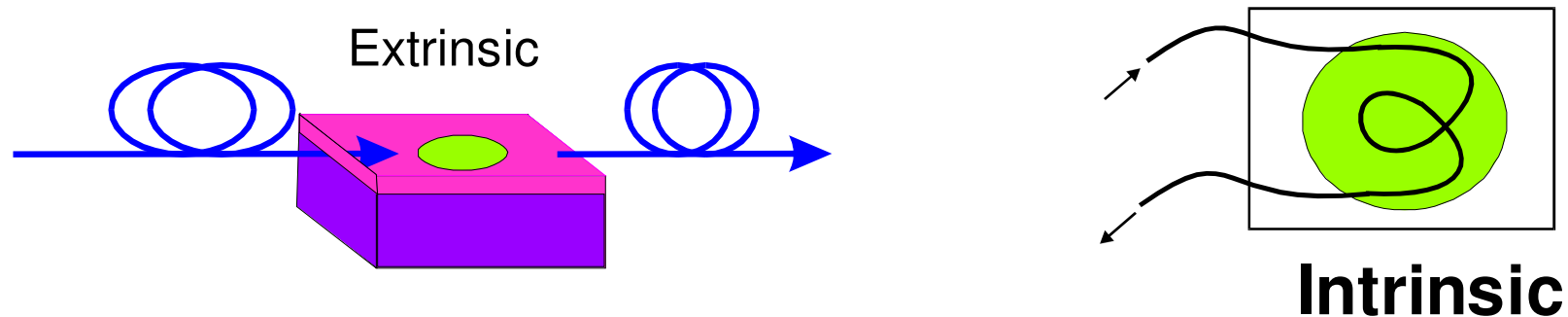


Změna vlastností světla díky vlastnostem prostředí =
převod informace o chemickém složení na optický signál

Optická detekce

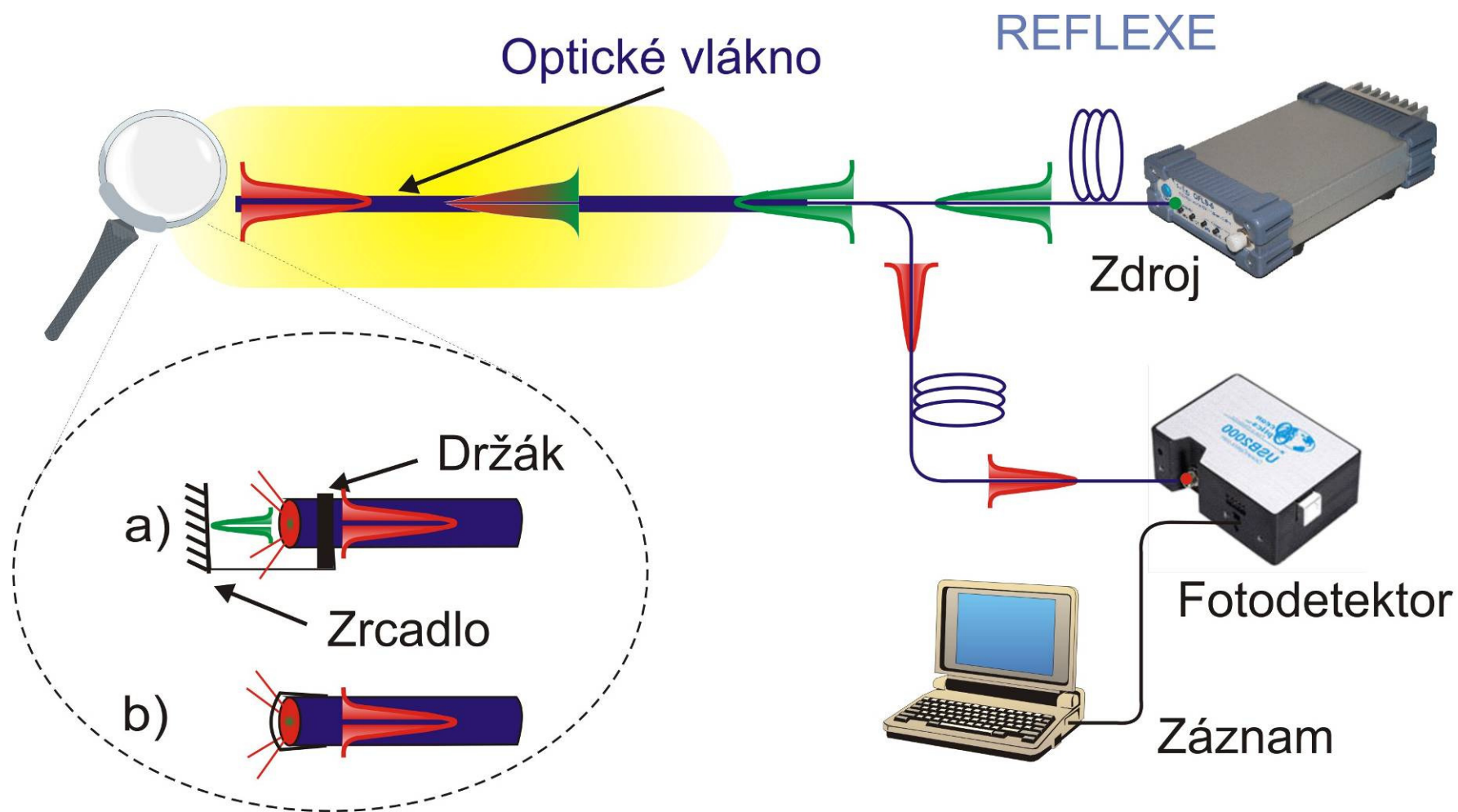
Vláknově-optické senzory

- * **extrinsické** (nevlastní) : vlákno slouží jen k dopravě světla
- * **intrinsické** (vlastní) : modifikované vlákno samo detekuje

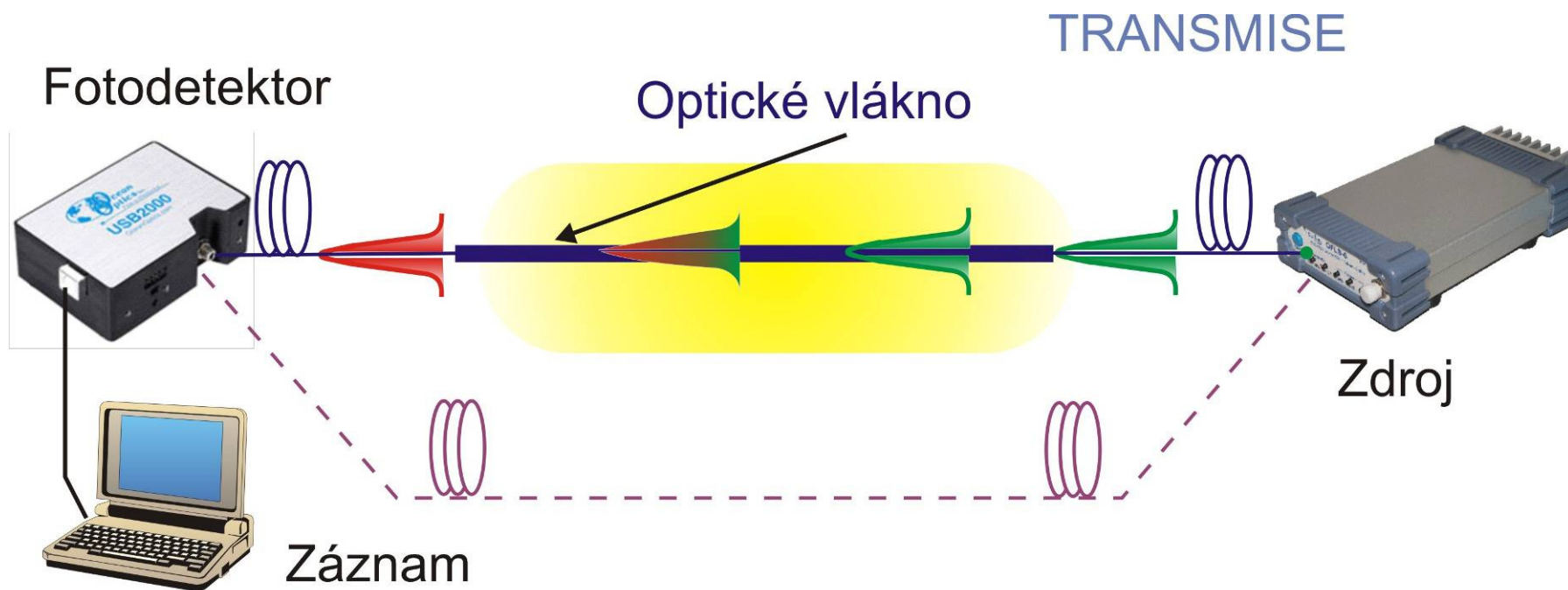


- + na vzdálených nebo **nepřístupných místech** („remote sensing“)
- + distribuovaná tj. rozprostřená, mnohabodová
- + vhodná pro explozivní, snadno hořlavé látky, v místech s VN

Transmisní a reflexní uspořádání



Transmisní a reflexní uspořádání



- * Zdroj
- * Optické vlákno
- * Detektor



- Pracovní rozsah
- Citlivost (dY/dX)
- Mez detekce (LOD)
- Časová odezva
- Specifičnost

Optická detekce

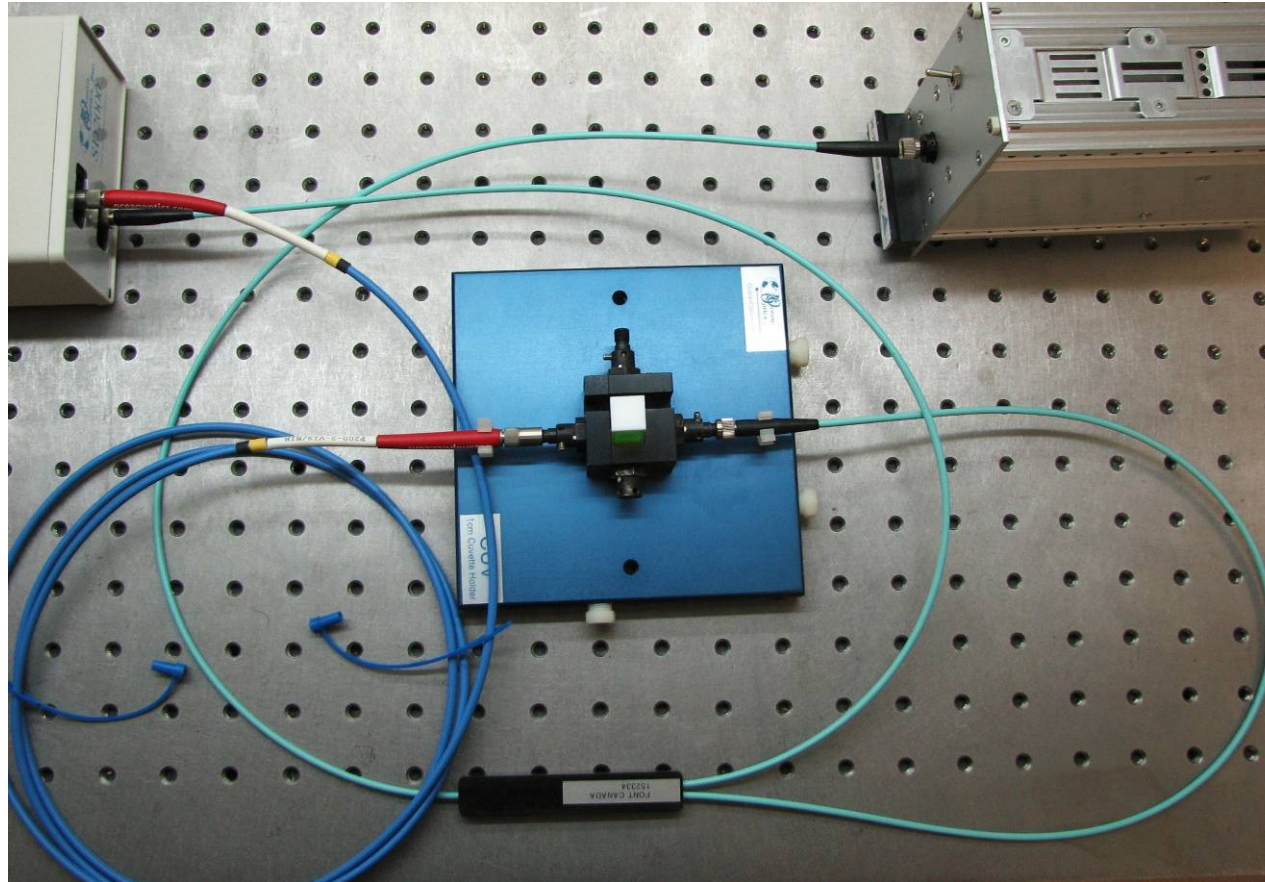
Princip : měření optické odezvy (změny)

- Amplitudy světla (intenzity)
 - absorpce
 - fluorescence (luminescence)
 - indexu lomu

[\[http://cas.msite.cesnet.cz/CESNET/Viewer/?peid=607a10d063f94feb857d8147e80c30951d\]](http://cas.msite.cesnet.cz/CESNET/Viewer/?peid=607a10d063f94feb857d8147e80c30951d)

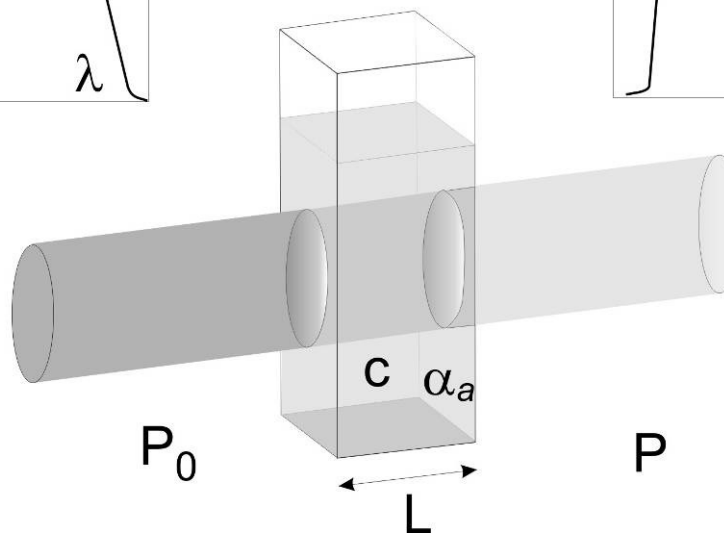
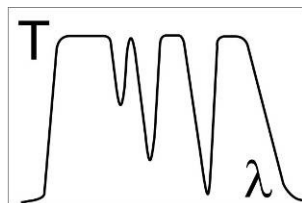
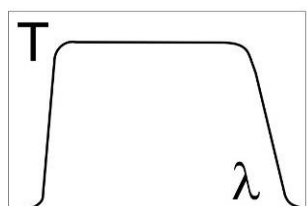
- Časově rozlišené fluorescence
- Polarizačního stavu
- Fáze světla
 - interferometrie

Absorpční sensor pH (extrinsický)

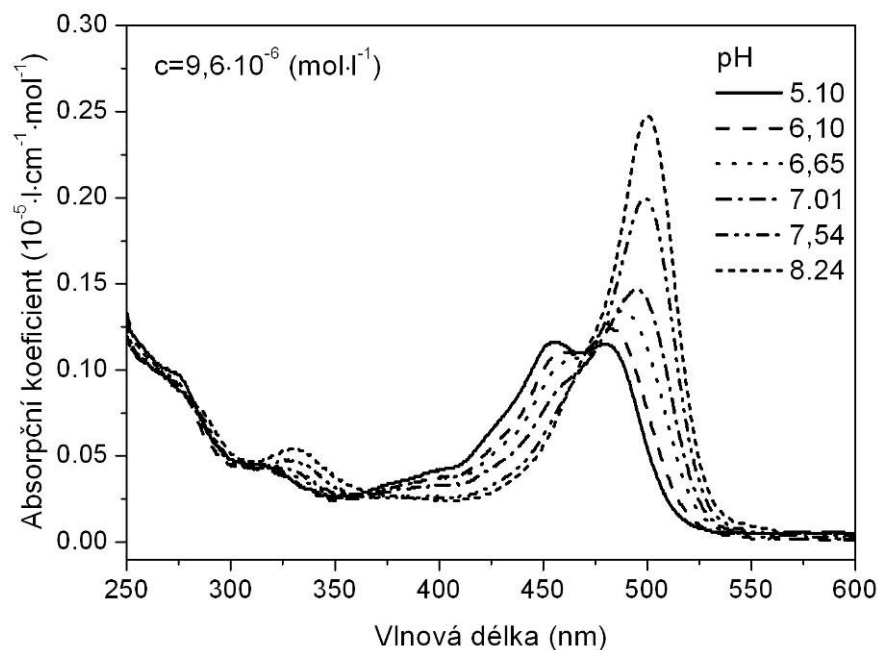


Opto-chemický převodník (indikátor) - absorpční

Absorpční sensor pH

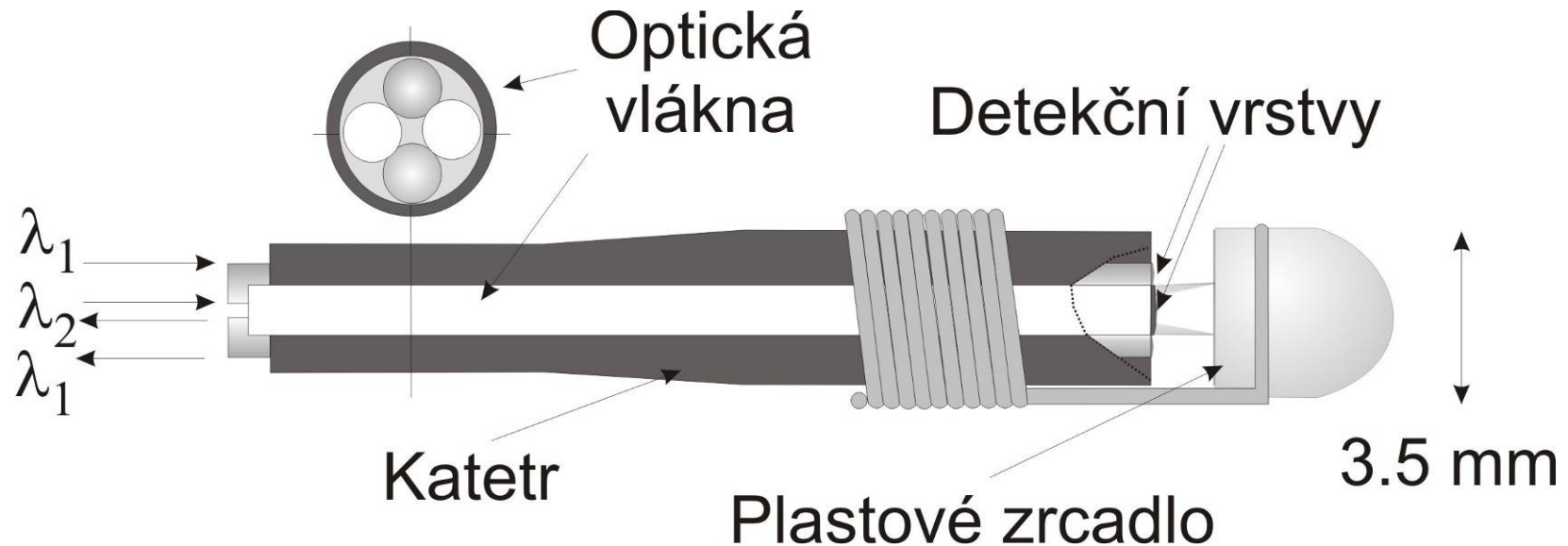


$$C = \frac{A}{L\alpha_a(\lambda)} = \frac{-\log\left(\frac{P}{P_0}\right)}{L\alpha_a(\lambda)}$$



[I. Kašík, V. Matějec, M. Chomát: „Optical chemical sensors“, Praha: PACI . Pražské analytické centrum inovací, 2007, 169-185]

Absorpční sensor pH (intrinsický)



Detekce pH žaludečních šťáv

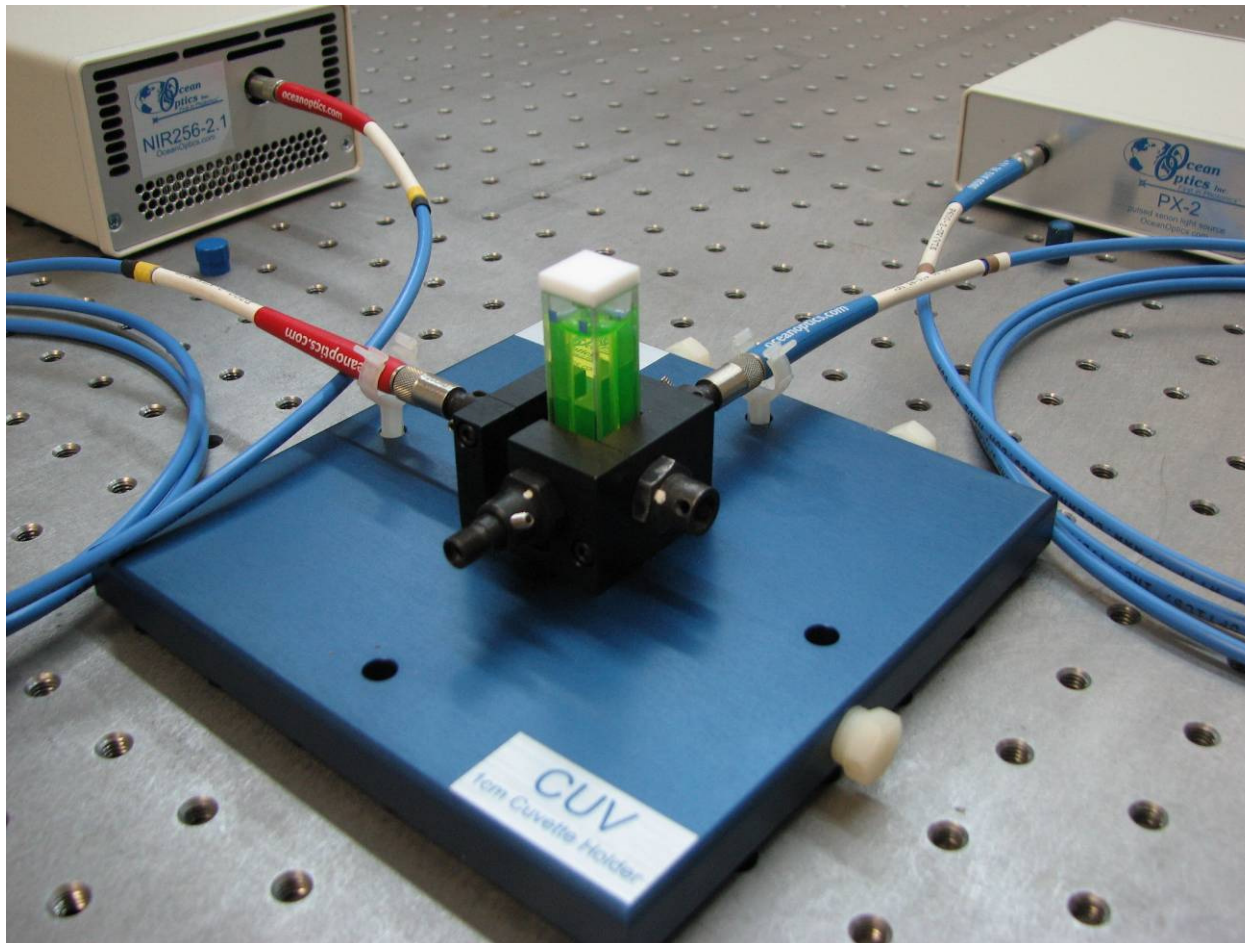
Převodník : bromofenolová modř, thymolová modř

Pracovní rozsah : pH <1; 8>

Rozlišení : 0,05 - 0,1 pH

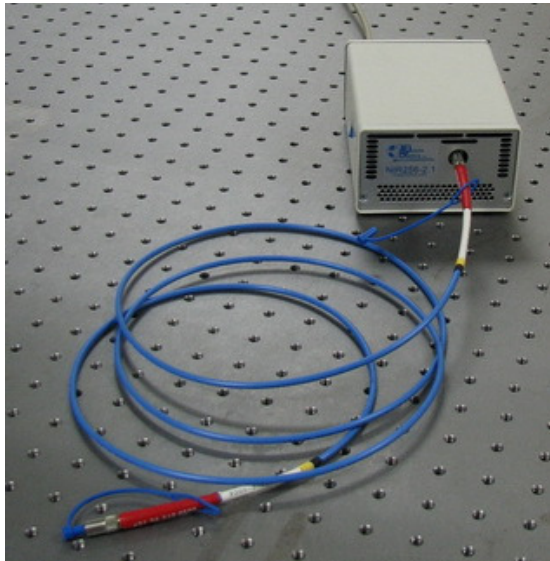
Časová odezva : do 1 min

Fluorescenční sensor (extrinsický)

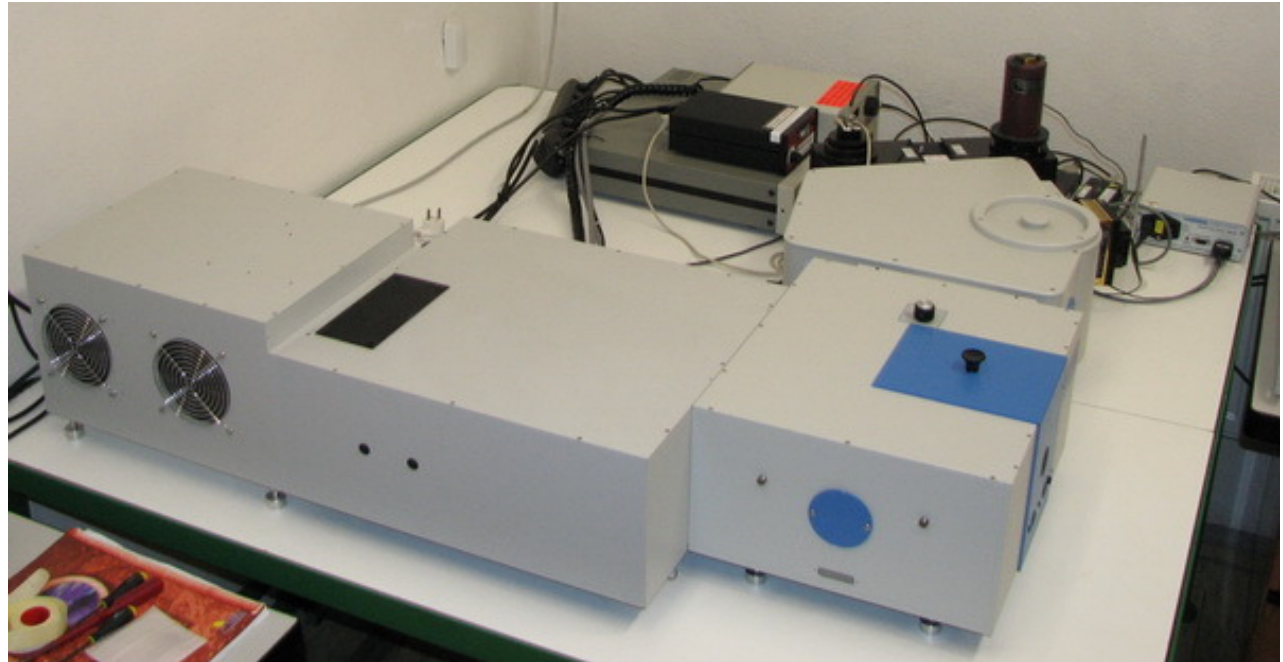


Opto-chemický převodník (indikátor) - fluorescenční

Fluorescenční spektrometr



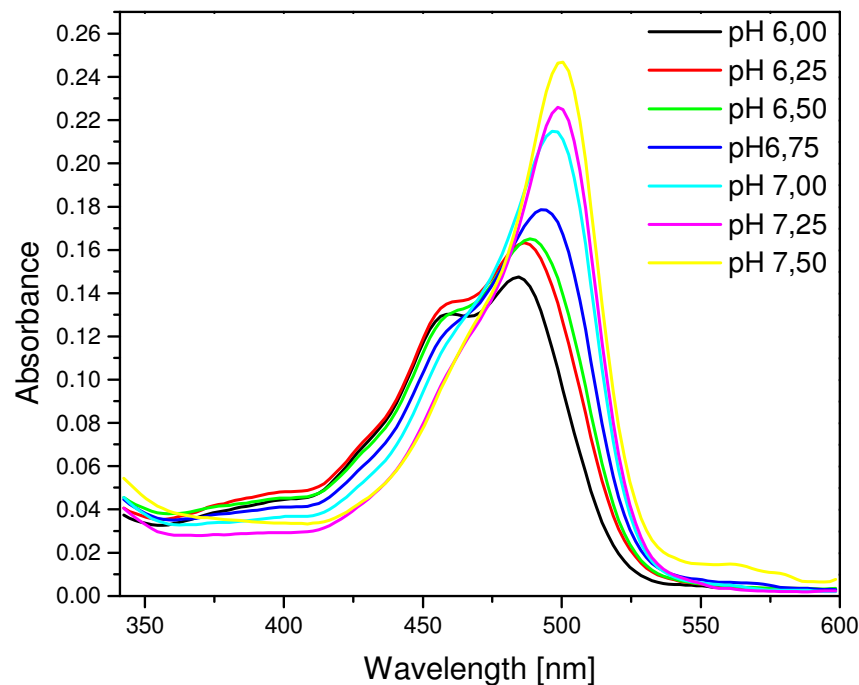
Fiber spectrometer
Ocean Optics



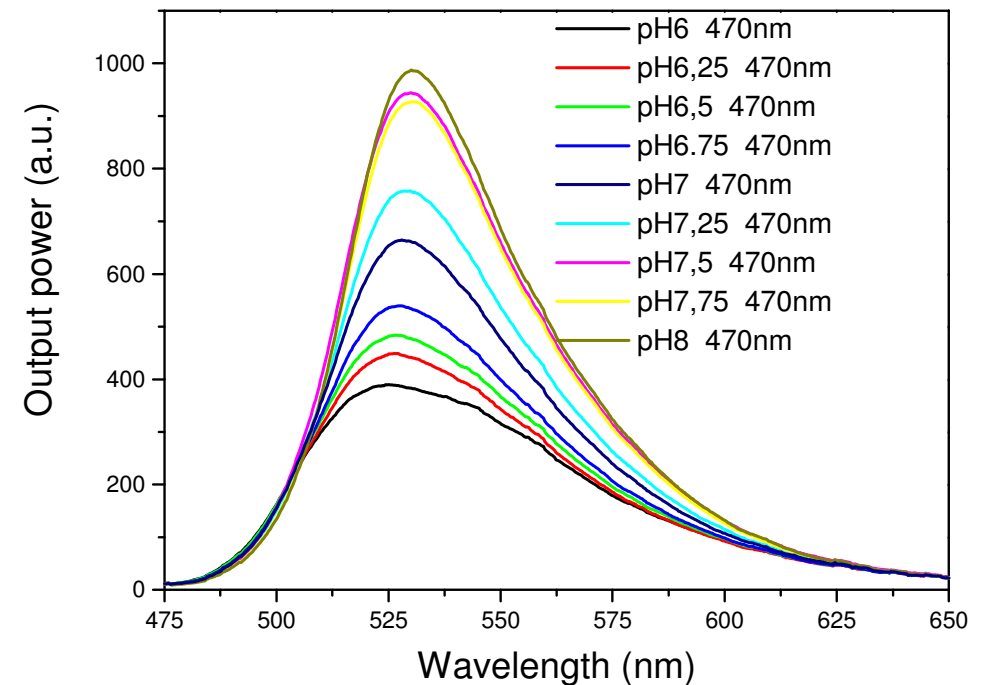
Fluorescence spectrometer
(Horiba Fluorolog 3)

Fluorescenční sensor (extrinsický)

Excitation of 2',7'-Bis(2-carbonylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein



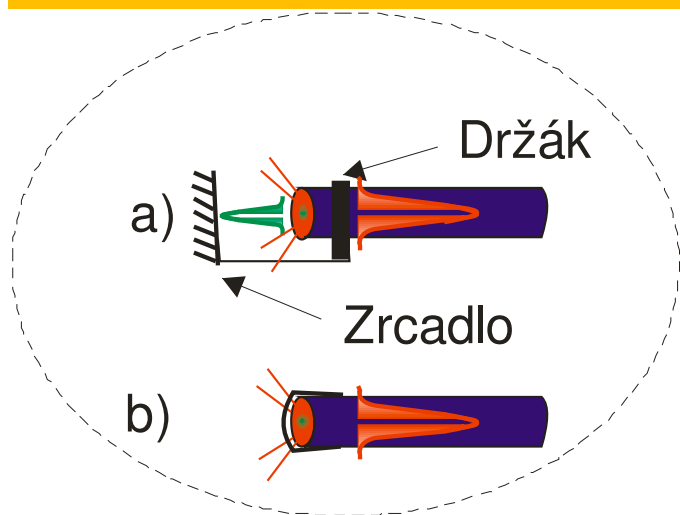
Fluorescence of 2',7'-Bis(2-carbonylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein



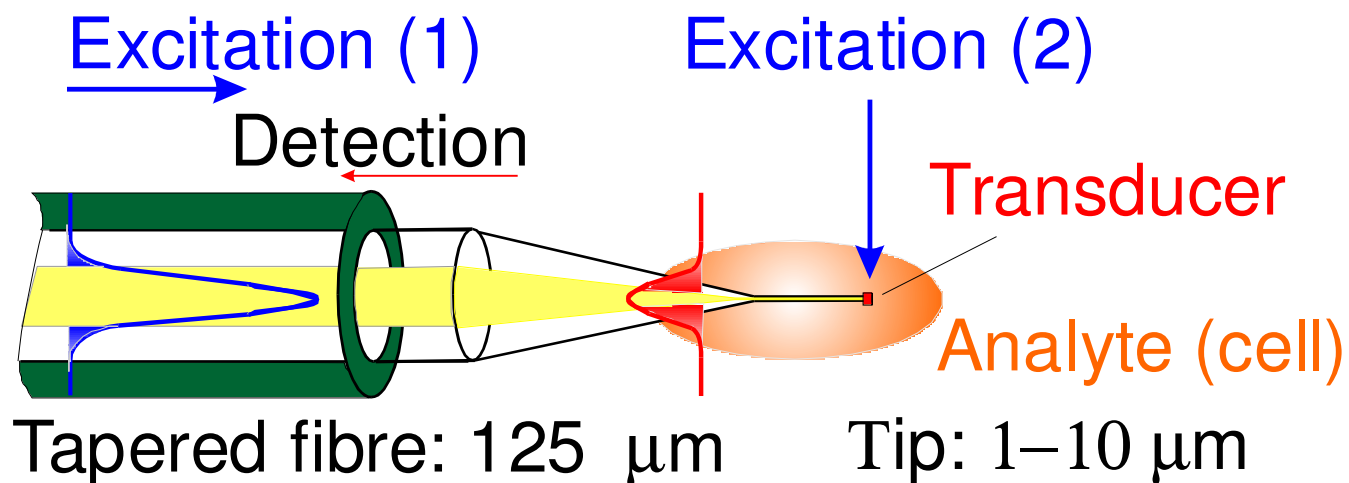
Opto-chemický převodník (indikátor) - fluorescenční

$$P = P_0 \alpha_a(\lambda) Q C K L$$

Fluorescenční sensor pH (intrinsický)

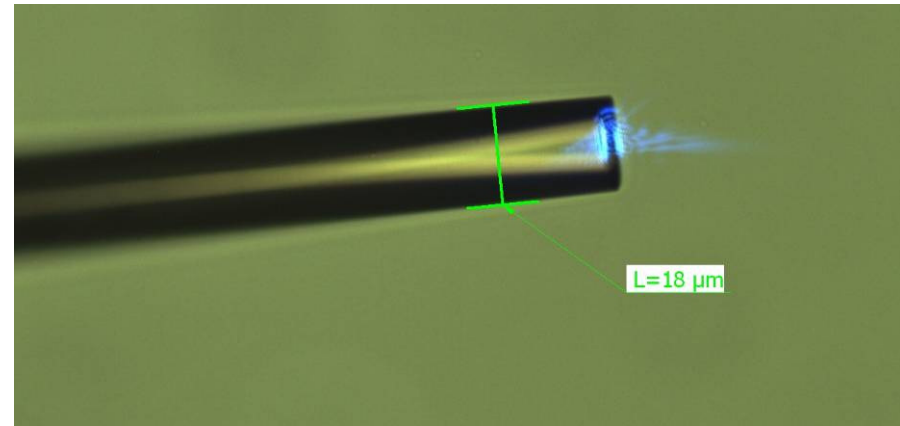


- + Zmenšení → mikrosensor (nanosensor)
- + *in vivo* měření
- + field application

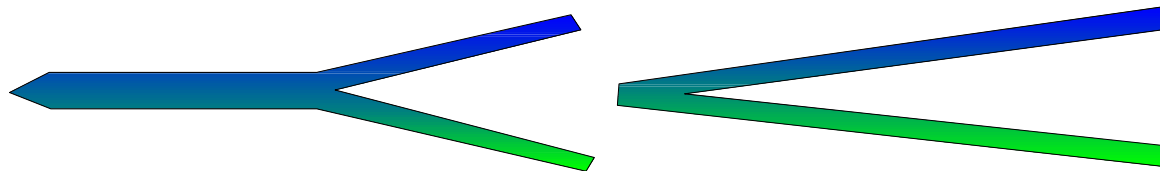


Fluorescenční sensor pH

- **SONDA :**
- **Taper, Y, V => 1-18 μm**



[I. Kašík, T. Martan, O. Podrazký, J. Mrázek, M. Pospíšilová, V. Matějec, *Proc. Optical Sensors 2009 (SPIE) 7356*, Prague, 2009, 73561U-1 – 73561U-6]



- **Převodník + imobilizace**
DHPDS => BCECF => HPTS (v TEOSu)
Souhra excitace, emise, imobilizace

Fluorescenční sensor pH

Fluorescenční metody

Intenzitní

+ snadné

- nepřesné (vliv uspořádání)

* 1 zdroj, detektor

Poměrové

+ zpřesnění měření

- náročnější uspořádání

Self-reference

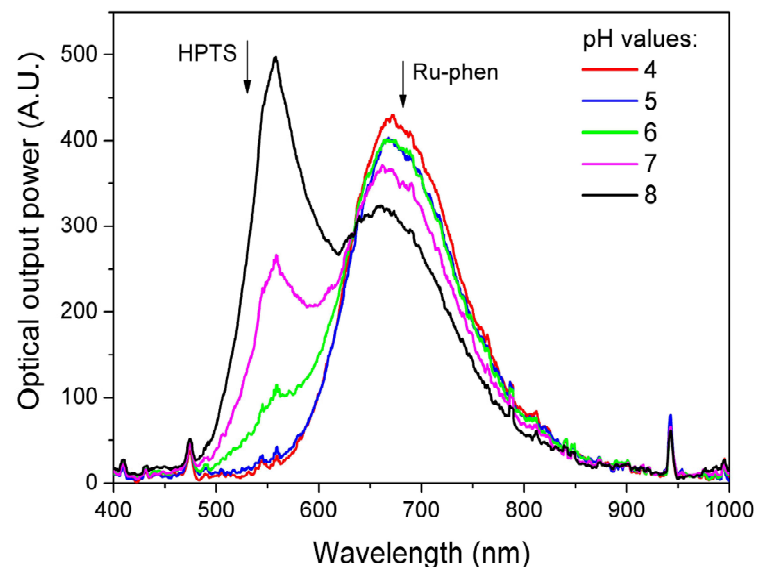
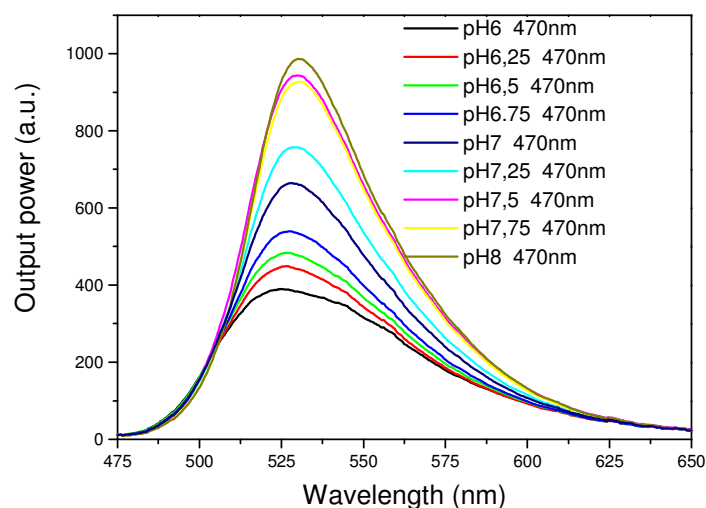
1 převodník

2 zdroje, detektor

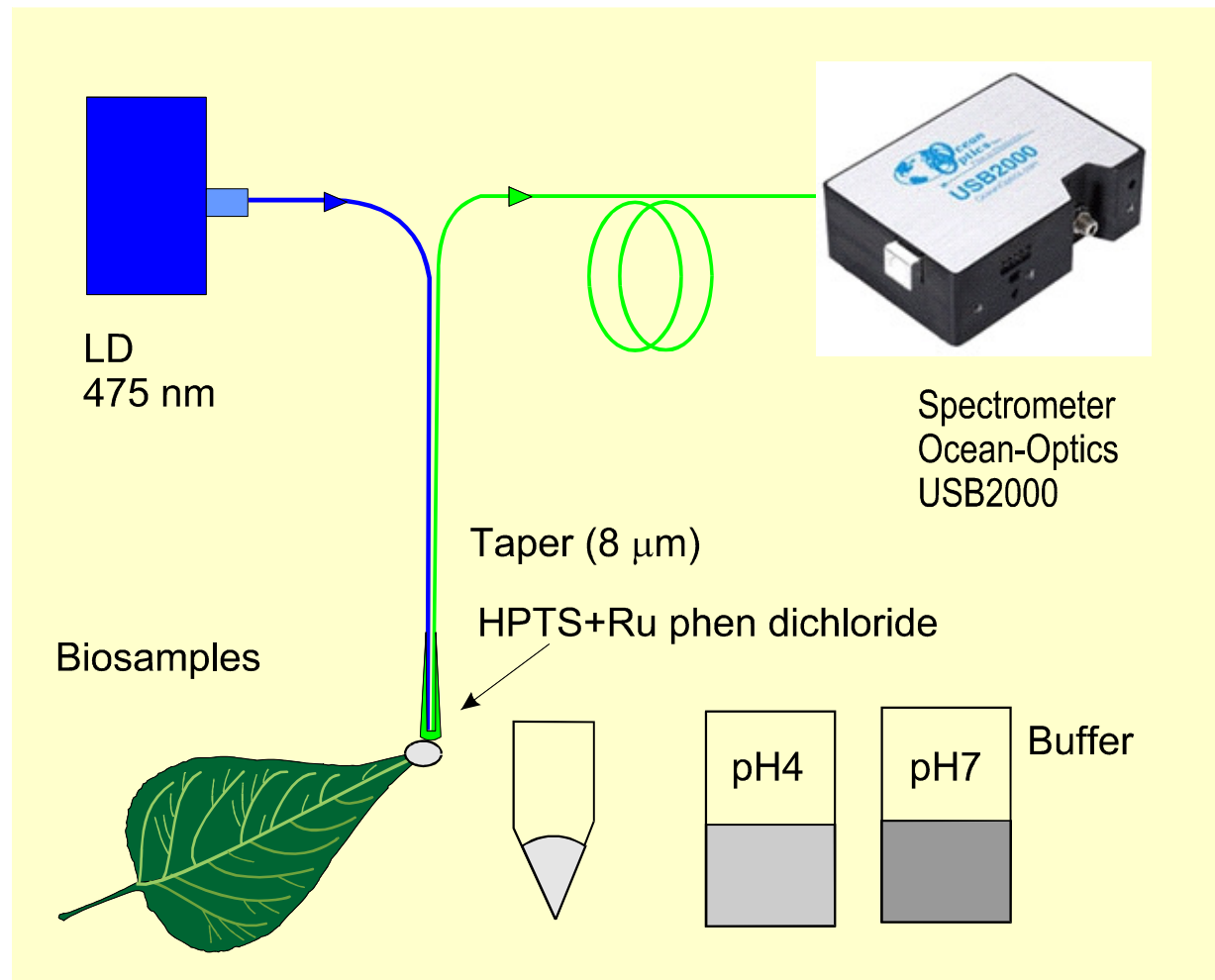
Vnitřní standard

2 převodníky

1 zdroj+spektrometr



Fluorescenční sensor pH

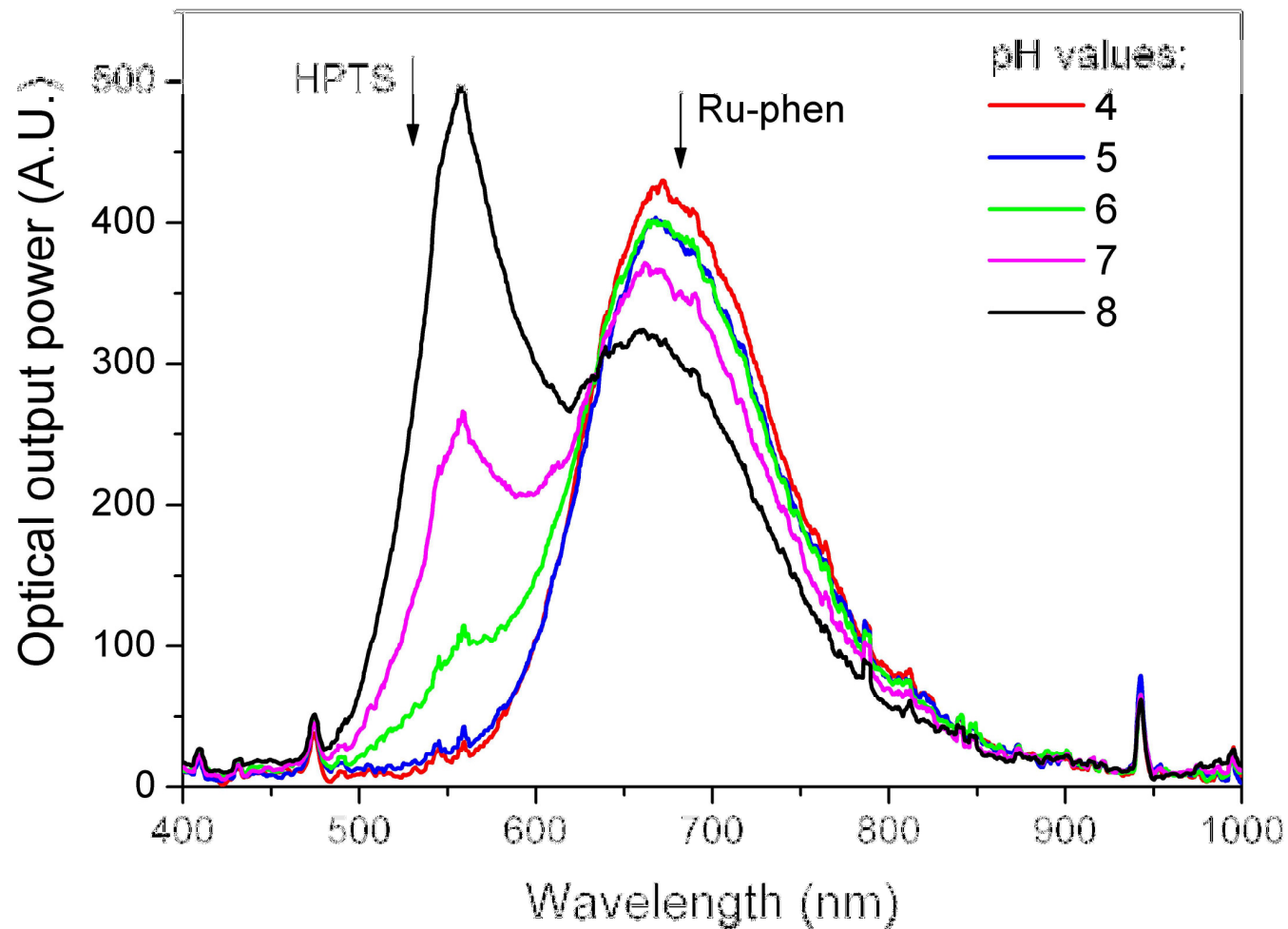


- Fluorescence, raciomericky, s vnitřním standardem
- HPTS + Ru-phen
- Laser diode
- V-taper 8 μm

[I. Kašík, J. Mrázek, T. Martan, M. Pospíšilová, O. Podrazký, V. Matějec, K. Hoyerova, M. Kamínek, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1883-1889]

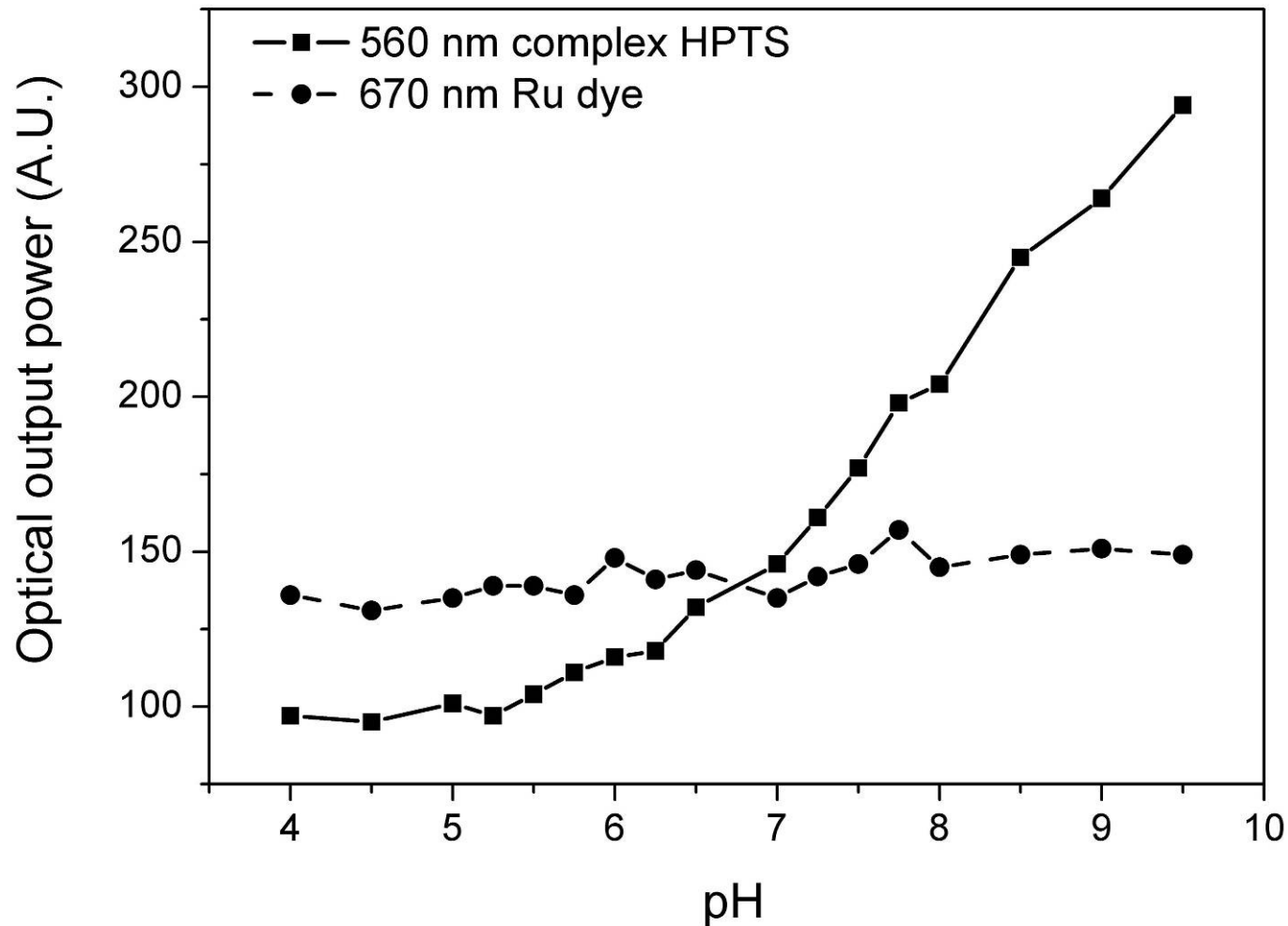
Fluorescenční sensor pH

Excitace : 475 nm



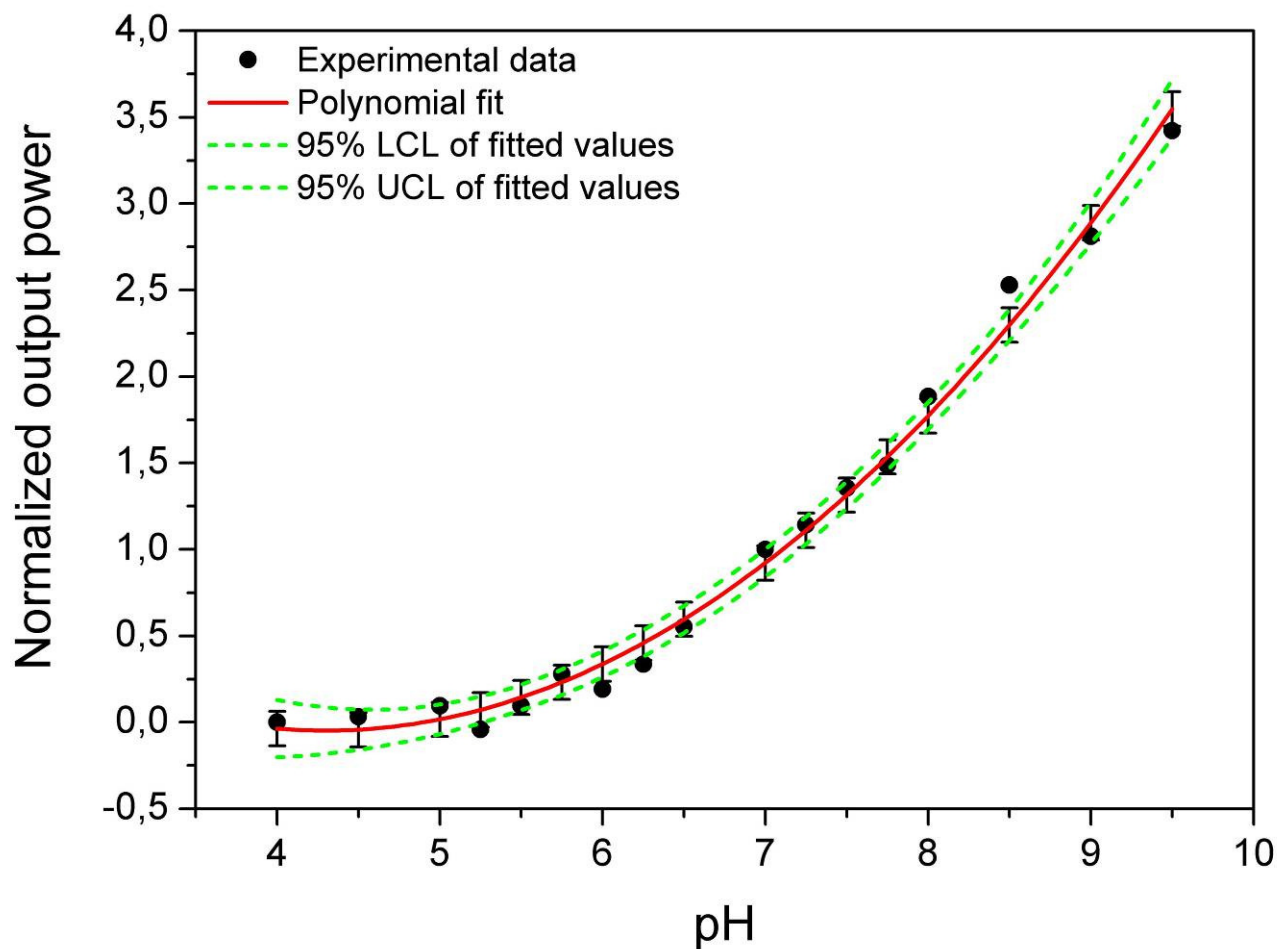
Fluorescenční odezva na kalibrační pufrů (V-taper, 8 μm , HPTS+Ru-phen)

Fluorescenční sensor pH



Kalibrační křivka – optická odezva V-sondy na změny pH

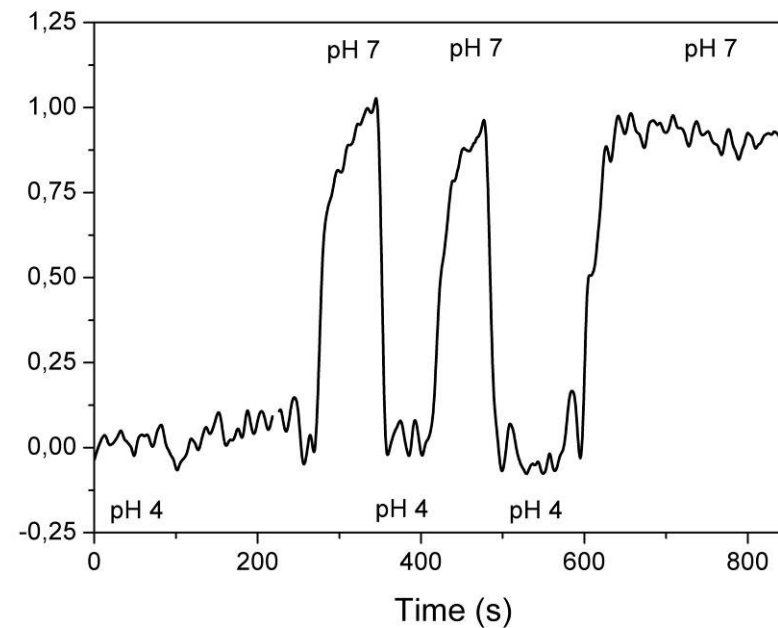
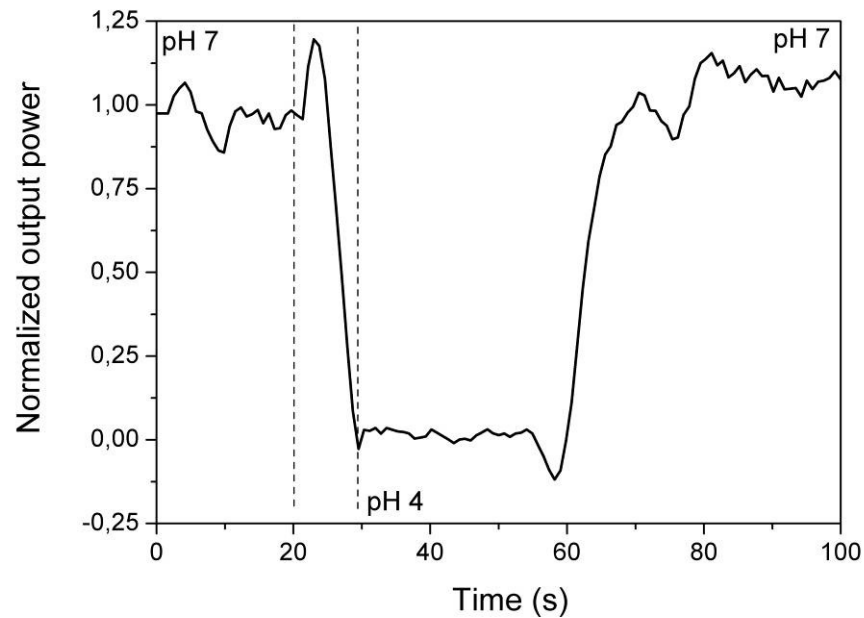
Fluorescenční sensor pH



Kalibrační křivka : $\text{output} = 2,407 - 1,142 \text{ pH} + 0,133 \text{ pH}^2$ (pufry)

Chyba stanovení pro $\text{pH} <6; 9>$ je **0.2** a pro $\text{pH} <5; 6>$ je **0.5** (pH metr $\pm 0,08$)

Fluorescenční sensor pH



Časová odezva (**10 s**) a stabilita v rámci 1 dne

Validace: detekce pH kapek exudátu

Porovnáním pH objemových vzorků posbíraného exudátu stanoveného vláknově-optickou sondou a klasickým pH-metrem

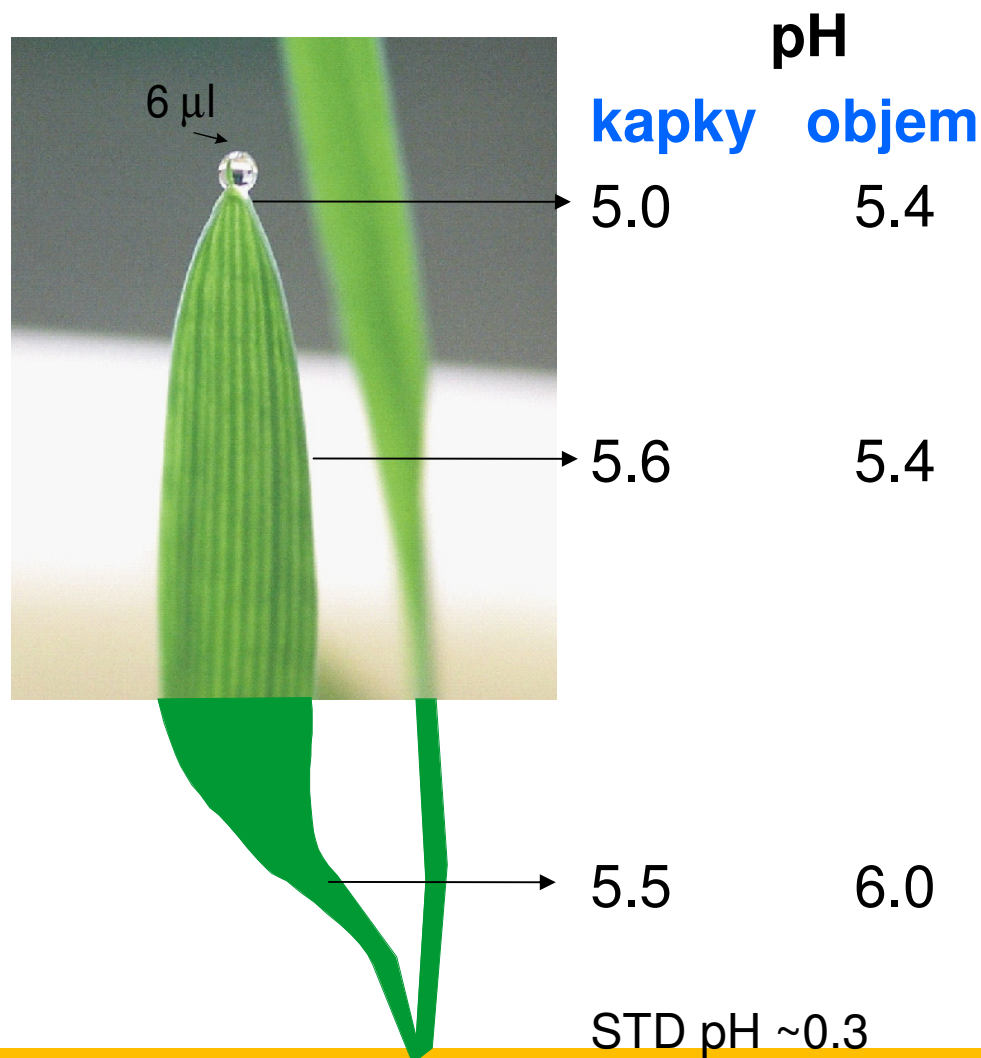
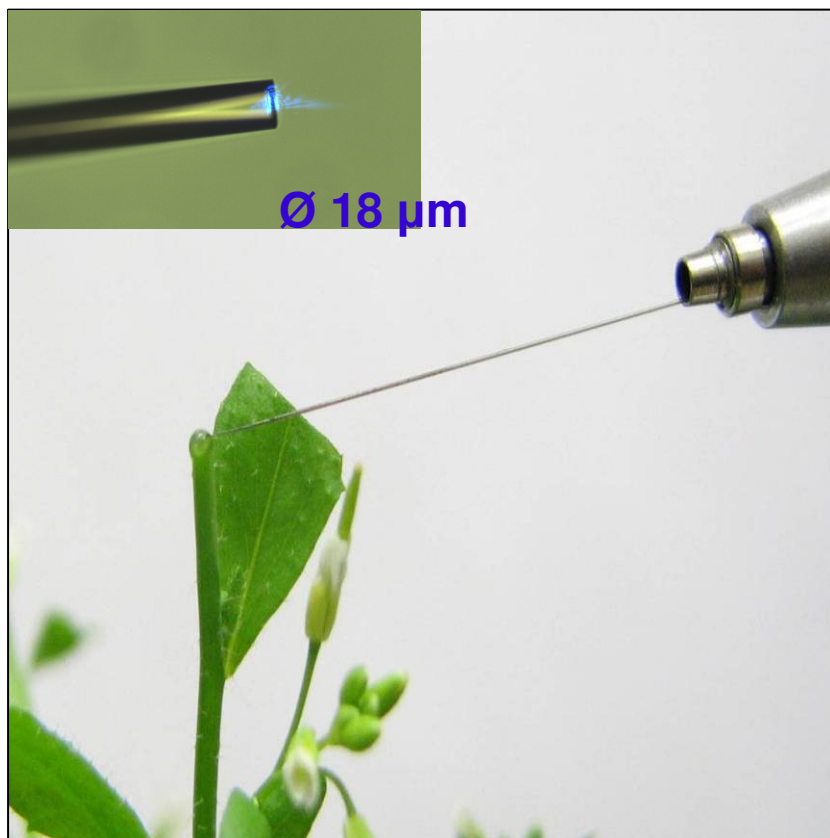
	objem	→
opticky	klasicky	
5.6	5.3	
5.5	5.0	
v mezích exp. chyby		

Opticky :

Splnění podmínky, že vzorek po dobu sbírání [minuty] nemění pH (v rámci experimentální chyby 0,5 pH)

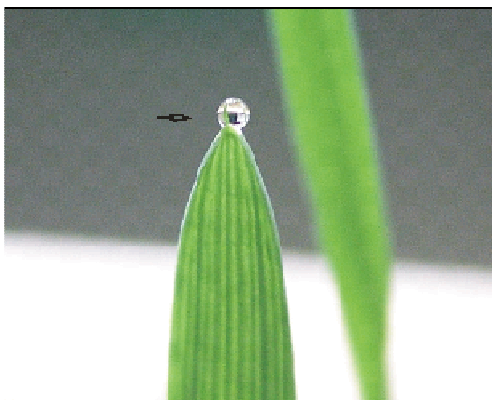
kapky	objem
5.0	5.4
5.6	5.4
5.5	6.0
STD pH ~0.3	

Detekce pH kapek exudátu ovsa



Detekce pH kapek exudátu ovsa

Existuje gradient pH v xylémovém toku rostlin ovsa?

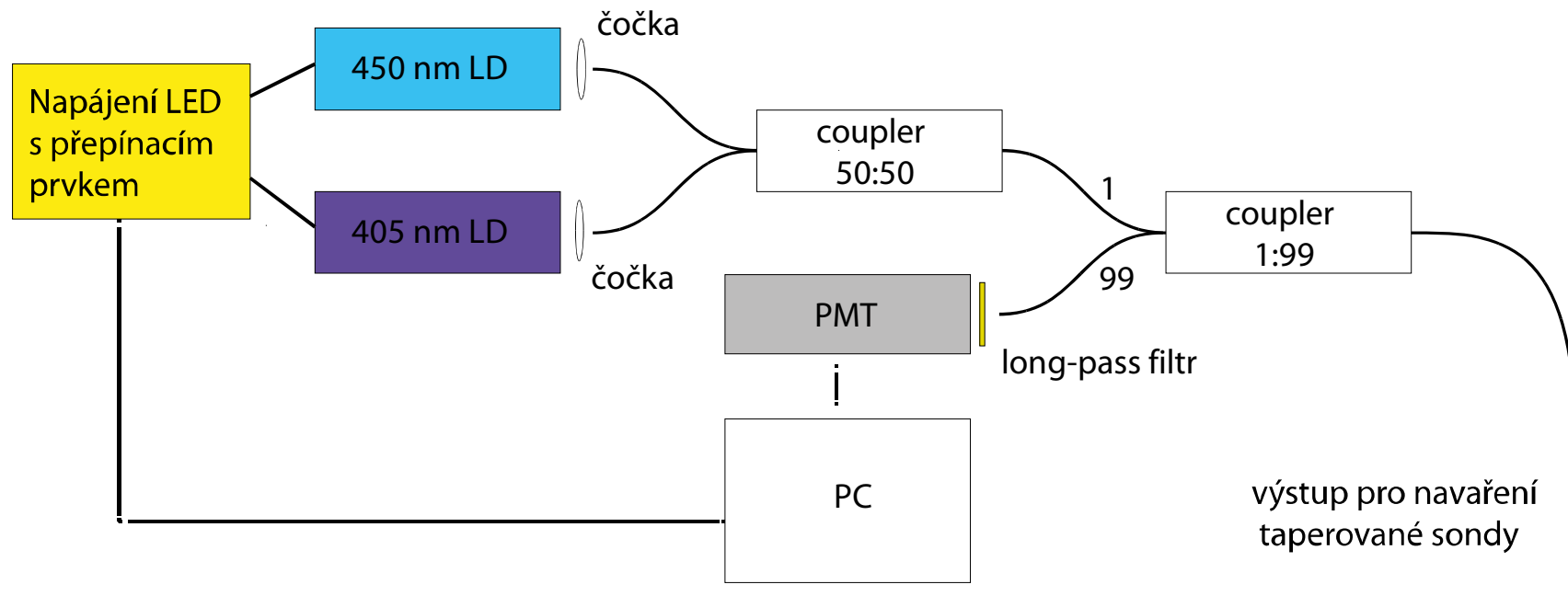


Kapky / celkový objem roztoku	Gutační roztok (špička listu) (pH*)	Xylémový exudát odebraný po odříznutí špičky listu (pH*)	Xylémový exudát odebraný po odříznutí stonku (pH*)
Kapky	5.0 ± 0.3 (9 kapek)	5.6 ± 0.3 (5 kapek)	5.5 ± 0.1 (6 kapek)
Celkový objem	5.4	5.4	6.0

Na rozdíl od výsledků zjištěných u některých rostlinných druhů **nebyl zjištěn v xylémovém toku rostlin ovsa výrazný gradient pH.**

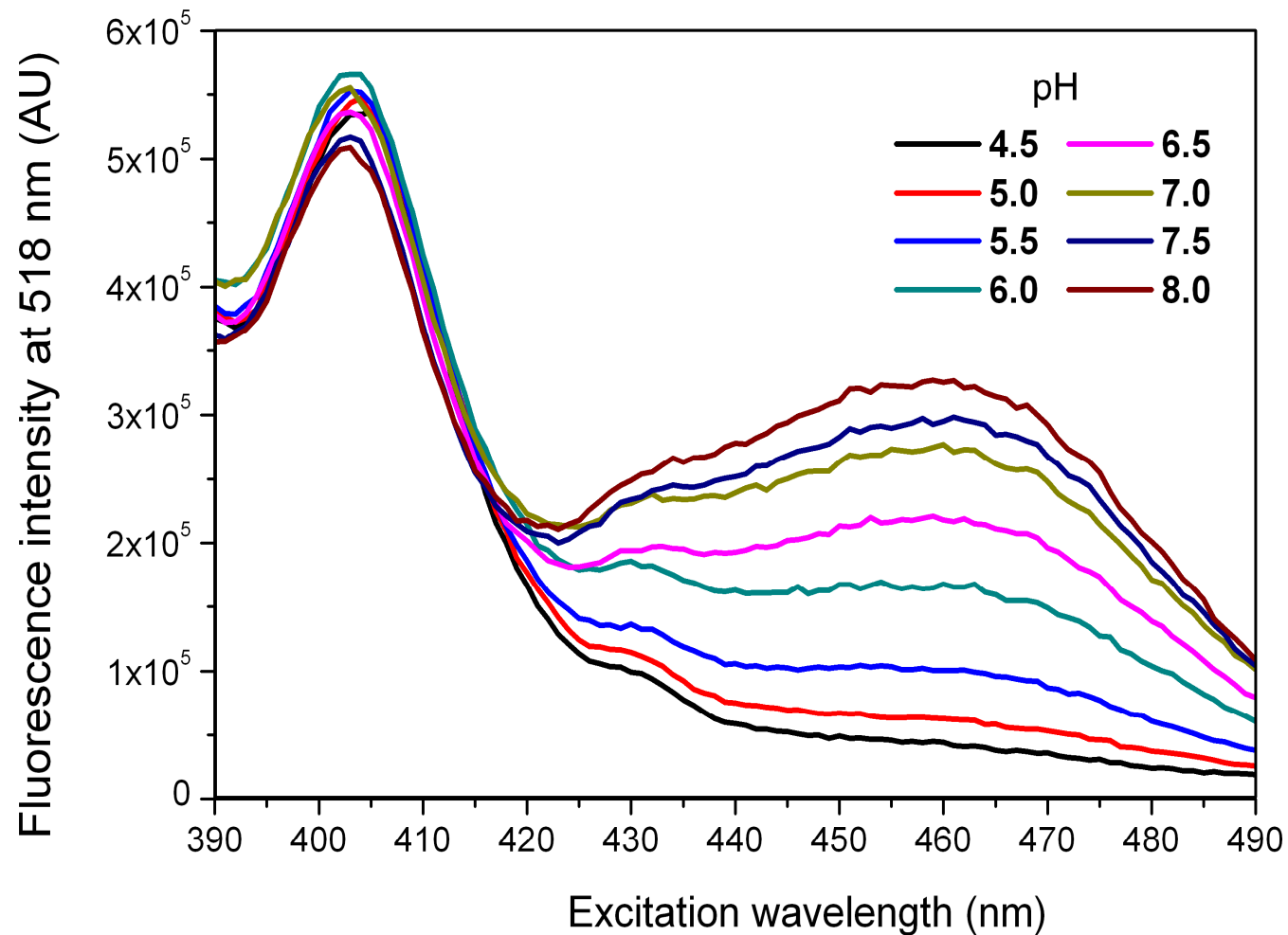
Detekce pH ve tkáni rostlin

Schéma měřicího zařízení

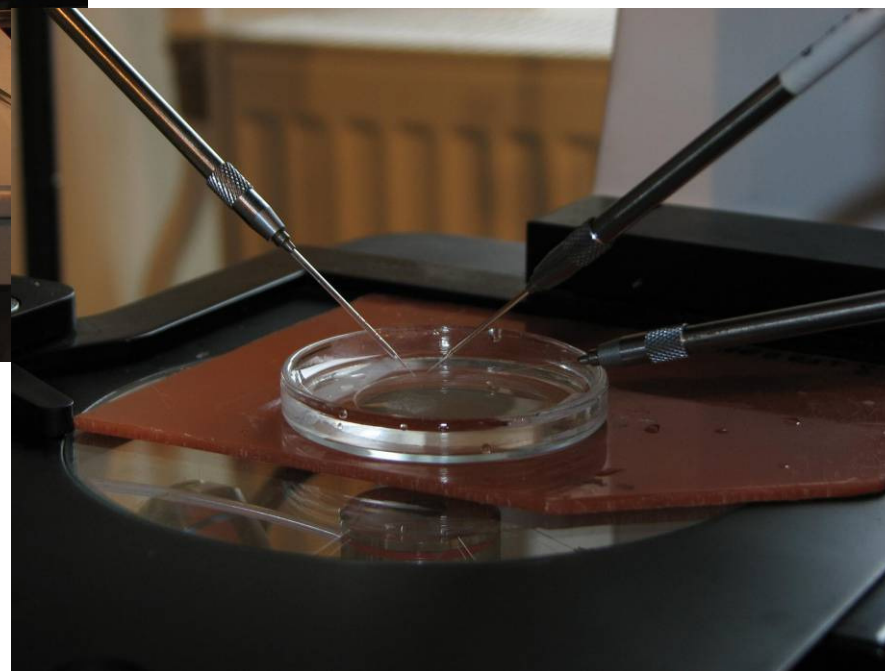


Detekce pH ve tkáni rostlin

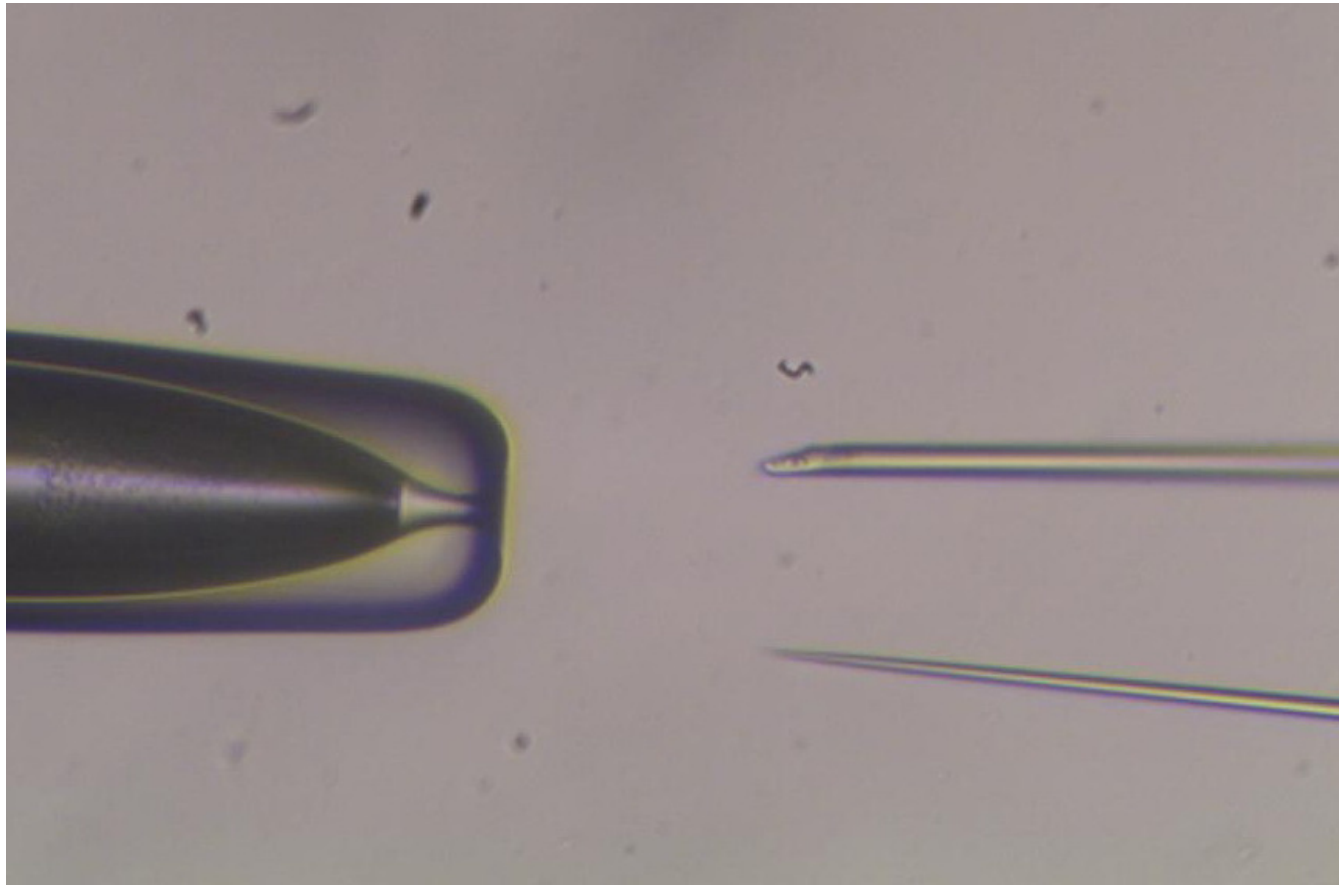
Excitační spektrum c-HPTS



Detekce pH ve tkáni rostlin

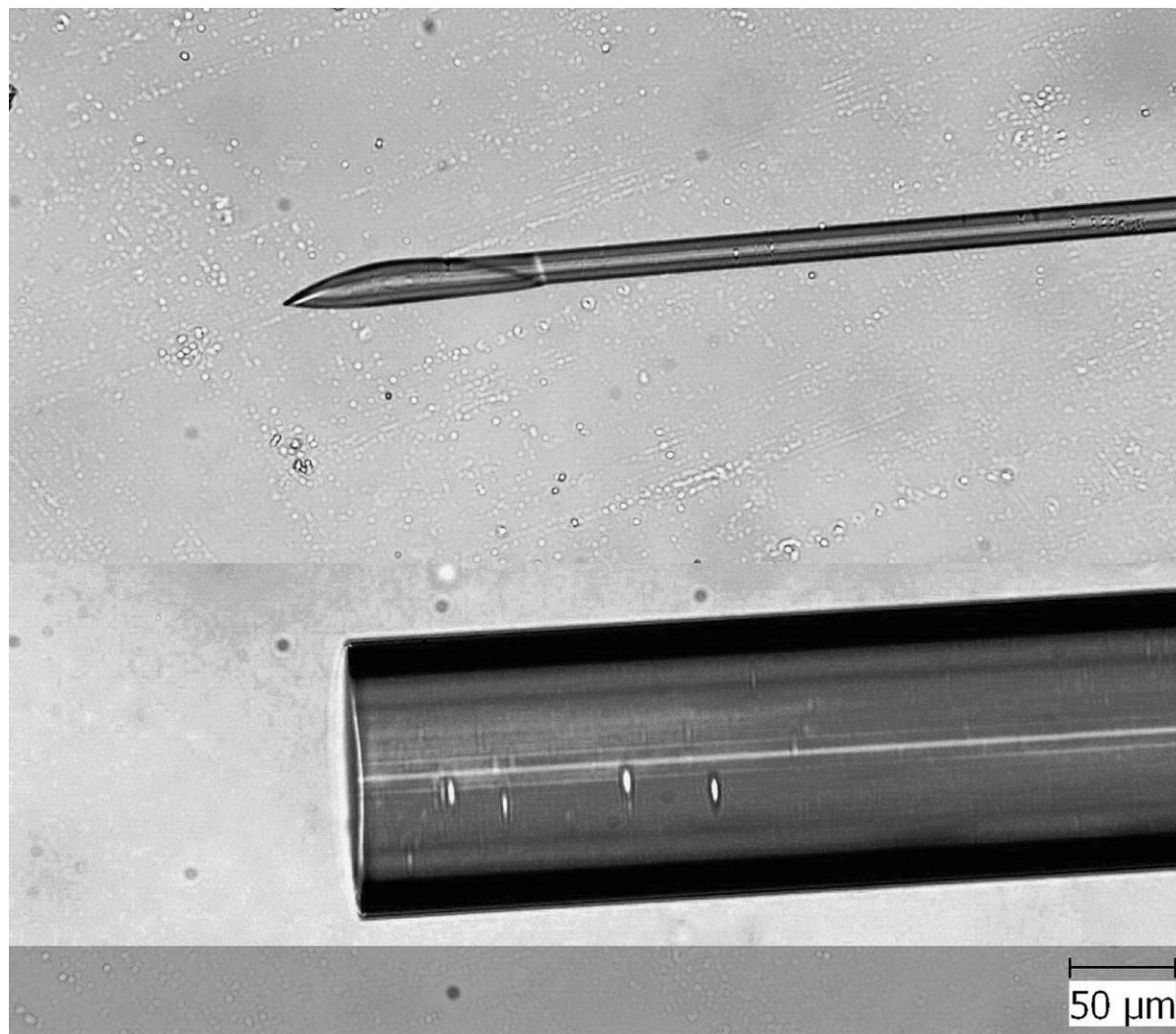


Detekce pH ve tkáni rostlin



Videa – penetrace BY2, penetrace *Arabidopsis thaliana*

Detekce pH ve tkáni rostlin



Opticky detekované analyty

- Chemical sensors

- O₂
- CO₂
- NH₃
- H₂
- SO₂
- NO₂
- chlorinated HC
- pH
- cations – K⁺, heavy metal ions
- anions – chlorides, nitrates

- Bio-chemical sensors

- alcohols
- glucose
- lactate
- creatinine
- esters
- urea
- glutamate
- oxalate
- phenols
- sulfite
- ascorbate
- bilirubin
- xantin
- cholesterol

Opticky detekované analyty

- Chemical sensors

- O₂
- CO₂
- NH₃
- H₂
- SO₂
- NO₂
- chlorinated HC
- pH
- cations – K⁺, heavy metal ions
- anions – chlorides, nitrates

- Bio-chemical sensors

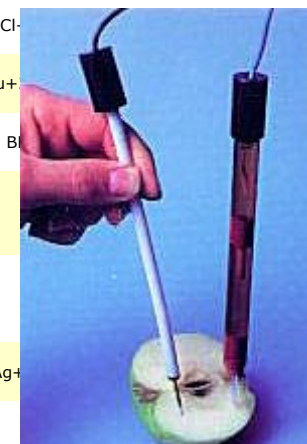
- alcohols
- glucose
- lactate
- creatinine
- esters
- urea
- glutamate
- oxalate
- phenols
- sulfite
- ascorbate
- bilirubin
- xantin
- cholesterol

Komerční vláknově-optické sensory

- GeoCenters - pH
 - FiberChem decisionlinkinc.com HC
 - [Presens](http://presens.de) presens.de O2, pH
 - Yellow Springs ysi.com CO2
 - Soundek otech.fi oil
 - [OceanOptics](http://oceanoptics.com) oceanoptics.com pH, O2
 - SMSI s4ms.com O2
 - Photosense photosense.com O2
- “*Fibers*” = 2-mm fibers; “*Tips*” = 140 μm

Komerční elektrochemické sensory

Electrode type	Cat. No.	Cost for electrode	Cost for full system	Measurement Range (M)	Concentration Range (PPM)	pH Range	Temp. Range (oC)	Interferences
Ammonia	LGS-136NHM	\$995.00	\$1597.00	5exp-7 to 1.0	0.01 to 17,000	above 11	0 to 50	volatile aminues
Bromide	LIS-146BRCM	\$785.00	\$1539.00	5exp-6 to 1.0	0.4 to 79,000	2 to 14	0 to 80	S-, I-, CN-, high levels of CL- and NH3
Cadmium *	LIS-146CDCM	\$785.00	\$1539.00	1exp-7 to 1exp-1	0.01 to 11,200	2 to 12	0 to 80	Ag+, Hg+2, Cu+2
Calcium *	LIS-146CACM	\$795.00	\$1539.00	5exp-6 to 1.0	0.2 to 40,000	3 to 10	0 to 50	Pb+2, Hg+2, Cu+2, Ni+2
Carbon Dioxide	LGS-136COM	\$970.00	\$1539.00	exp-2 to exp-4	4.4 to 440	4.8 to 5.2	0 to 50	Volatile weak acids
Chloride	LIS-146CLCM	\$785.00	\$1539.00	5exp-6 to 1.0	1.8 to 35,500	2 to 12	0 to 80	S-2, I-, CM-, Br-
Copper	LIS-146CUCM	\$785.00	\$1539.00	1exp-8 to 1exp-1	0.0006 to 6,350	2 to 12	0 to 80	Ag+, Hg+2
Cyanide	LIS-146CNCM	\$785.00	\$1539.00	5exp-6 to 1exp-2	0.13 to 260	11 to 13	0 to 80	S-2, I-, Br-, Cl-
Iodide	LIS-146ICM	\$785.00	\$1539.00	5exp-8 to 1.0	0.006 to 127,000	0 to 14	0 to 80	S-2, CN-, Br-, Cl-
Lead *	LIS-146LICM	\$750.00	\$1350.00	1exp-6 to 1exp-1	0.2 to 20,700	3 to 8	0 to 80	Ag+, Hg+2, Cu+
Nitrate *	LIS-146NOCM	\$750.00	\$1375.00	7exp-6 to 1.0	0.6 to 62,000	2.5 to 11	0 to 50	ClO4-, I-, CN-, Br-
Potassium *	LIS-146KCM	\$795.00	\$1539.00	1exp-6 to 1.0	0.04 to 39,000	2 to 12	0 to 50	Cs+, NH4+
Silver/sulfide	LIS-146AGSCM	\$995.00	\$1866.00	1exp-7 to 1.0	AG = 0.01 to 107,900 S = 0.003 to 32,100	2 to 12	0 to 80	Hg+2, Hg+
Sodium *	LIS-146NACM	\$795.00	\$1539.00	1exp-6 to saturated	0.2 to 23,000	5 to 12	0 to 80	H+, K+, Li+, Ag+



[www.sheflscientific.com]

Bodové mikro-sensory - závěry

- + od detekce ustáleného stavu k pozorování dynamiky změn
 - + alternativa (field) ke konfokálnímu mikroskopu (finanční aspekt) a k Near-field Scanning Optical Microscopy [NSOM] (field application)
 - + on-line = *in vivo* (optická odezva 10 s \ll elektrochemická)
 - + tuhost/**robustnost** ve srovnání s kovovými mikro-elektrodami
 - + prostorové **rozlišení** $\sim 20 \mu\text{m}$, očekávané $\sim 7\text{-}10 \mu\text{m}$, **mikro i makro**
 - ? **invazivnost** (interakce markeru vers. zranění buňky)
 - problém : penetrace houževnaté stěny rostlinných buněk
- * komerční senzory : pH + O₂, glukóza, NO₂, glutamát. Tip 100 μm
- * další analyty : Ca²⁺, K⁺, Na⁺ [GAČR]
- ? bio-analyty - SPR [J.Homola UFE vers. G.Brambilla ORC]

Bodové mikro-sensory - závěry

Optická vlákna a vláknové sensory



Literatura

Vláknové sensory

- O.S. Wolfbeis, T. Vo-Dinh, R. Kopelman, W. Tan, Z. Rosenzweig, G. Brambilla : Univ. Regensburg (D), Oak-Ridge (US), ORC (UK)
- **J.Dakin, B.Culshaw** : „Optical Fiber Sensors“, Artech House, 1997
- **G.Boisdé, A.Harmer** : „Chemical and Biochemical Sensing With Optical Fibers and Waveguides“, Artech House, London, 1996
- **K.T.V.Grattan, B.T.Meggitt** : Optical Fiber Sensor Technology, Vol.4, Kluwer, 1999
- **F.Baldini, A.N.Chester, J.Homola, S.Martelluci**, *Optical chemical sensors*, Springer 2006

Optická vlákna

- **J. M. Senior** : Optical fiber communications - Principle and practise, Pearson Education Limited, Harlow, England, 2009.
- **A. Mendez, F.T. Morse** : Specialty optical fibers handbook, Elsevier Science & Technol, USA, 2006

Poděkování

Děkujeme za pozornost



a za finanční podporu

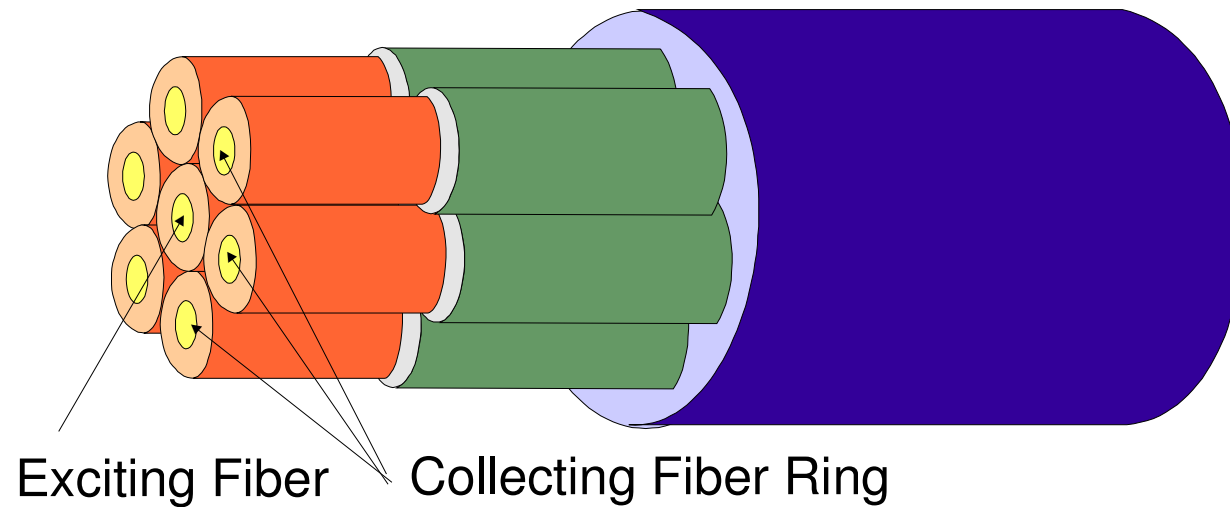
- Akademie věd ČR
- Grantová agentura ČR
- Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR
- **Centrum LC Remorost**
- European Commission

Poděkování

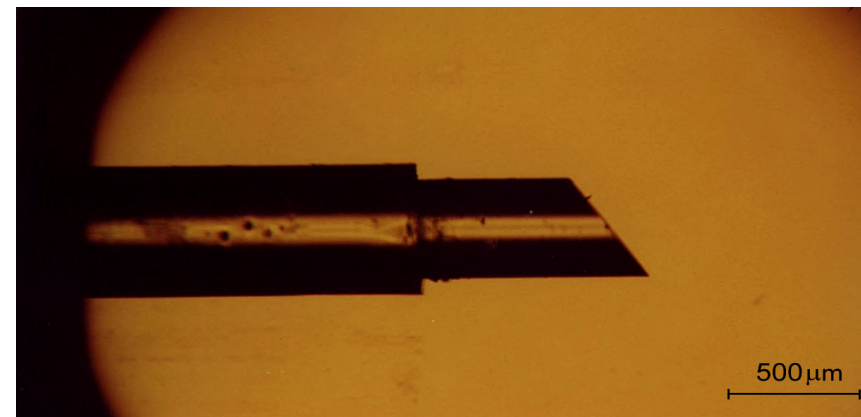




Optical fibre probes

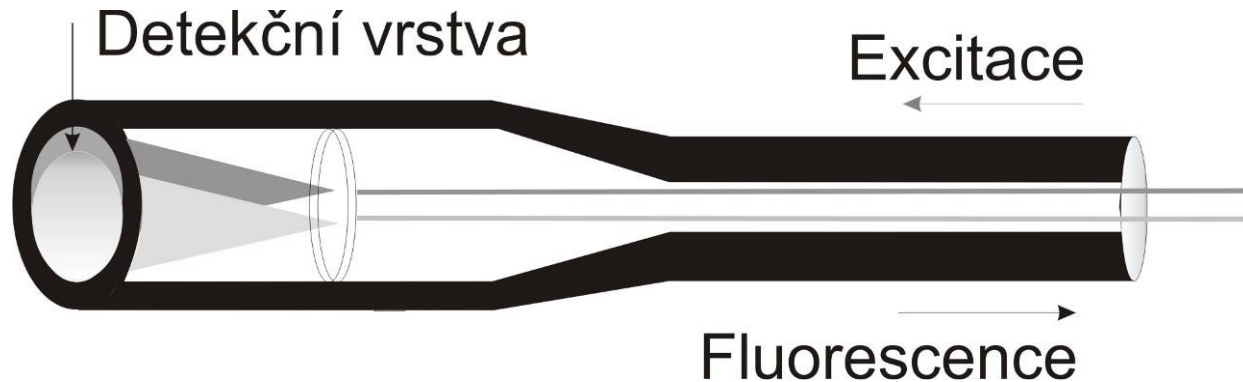


www.oceanoptics.com

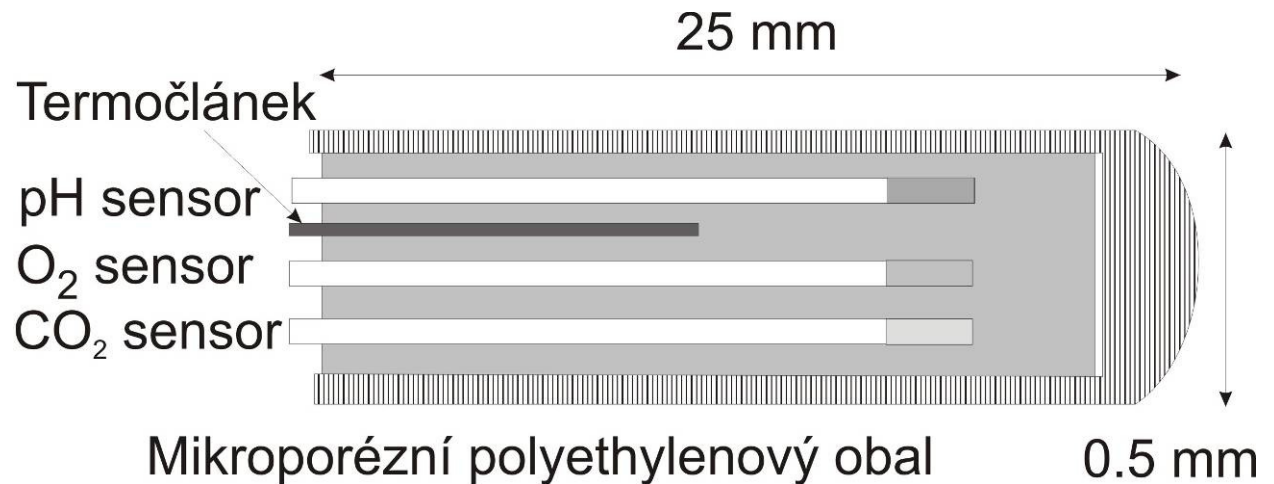


www.ufe.cz

Optical fibre probes



Detekce CO₂



[F.Baldini, A.N.Chester, J.Homola, S.Martelluci, *Optical chemical sensors*, Springer 2006]