 ISSN 1561-6274. Нефрология. 2000. Том 4. № 3.

© Коллектив авторов, 2000
УДК 616.61-085.38-073.27-78

Н.Ю.Абрамова, Ю.А.Борисов, А.В.Братов, П.В.Гавриленков, К.Домингес, В.Н.Спиридонов, Е.Д.Суглобова

ИОНОСЕЛЕКТИВНЫЕ ПОЛЕВЫЕ ТРАНЗИСТОРЫ (ИСПТ, ISFET) С ФОТОПОЛИМЕРИЗУЕМЫМИ ПОЛИУРЕТАНОВЫМИ МЕМБРАНАМИ КАК НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДАТЧИКИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДИАЛИЗИРУЮЩИХ РАСТВОРОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭЛЕКТРОЛИТОВ У БОЛЬНЫХ НА ХРОНИЧЕСКОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ

N.Yu.Abramova, Yu.A.Borisov, A.V.Bratov, P.V.Gavrilenkov, K.Domingues, V.N.Spiridonov, E.D.Suglobova

ION-SELECTIVE FIELD EFFECT TRANSISTORS (ISFETS) WITH PHOTOCURABLE POLYURETHANE MEMBRANES AS NEW PERSPECTIVE SENSORS FOR THE MONITORING OF DIALYZING SOLUTIONS AND MEASURING THE CONCENTRATION OF ELECTROLYTES IN CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

Научно-исследовательский институт нефрологии, кафедры пропедевтики внутренних болезней, биохимии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Россия; Национальный центр микроэлектроники, Барселона, Испания

РЕФЕРАТ

Изучена возможность применения ионоселективных полевых транзисторов с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами для контроля электролитного состава диализирующих растворов, применяемых в аппаратах «искусственная почка», а также плазмы больных, получающих лечение хроническим гемодиализом. Описаны краткосрочные и долговременные характеристики работоспособности калийселективных полевых транзисторов при непрерывном контакте с растворами. Произведено сравнительное тестирование показаний таких транзисторов и иных сенсорных систем. Показано, что достаточная надежность при измерении в области физиологических концентраций в сочетании с невысокой стоимостью обеспечивают возможность применения калийселективных полевых транзисторов для мониторингового контроля содержания ионов калия как в диализирующих растворах, так и в плазме больных на регулярном гемодиализе.

Ключевые слова: нефрология, гемодиализ, кровь, калий, ионометрия, ионоселективные полевые транзисторы.

ABSTRACT

Under study was the applicability of ion-selective field effect transistors (ISFETs) with photocurable polyurethane membranes and of chronic hemodialysis patients' plasma for control of the electrolytic composition of the dialyzed solutions used in the «artificial kidney» apparatus. The short- and long-term characteristics of the effectiveness of the potassium-selective ISFETs during continuous contacts with the solutions are given. A comparative testing of these sensors and other sensory systems was made. The fairly high reliability of K+-selective ISFETs within the range of physiological concentrations in combination with their relatively low cost makes them promising means for monitoring the concentrations of potassium ions both in dialyzing solutions and in plasma of chronic hemodialysis patients.

Key words: nephrology, hemodialysis, blood, potassium, ionometry, ISFET.

ВВЕДЕНИЕ

Приготовление диализирующих растворов из наборов сухих солей в условиях отделения гемодиализа требует обязательного селективного контроля электролитного состава. Как показала практика, такой контроль наиболее удобно осуществлять в два этапа: на стадии получения концентратов и для проверки работы кондуктометрического блока аппарата «искусственная почка», непосредственно на

входе в диализатор. Референтным методом определения является пламенная фотометрия [3], но она достаточно трудоемка, требует тщательной подготовки проб и не охватывает всего спектра ионов, концентрацию которых необходимо определять. Кроме того, в соответствии с требованиями техники безопасности, пламенный фотометр должен быть дистанцирован от диализных залов.

Сейчас для определения ионного состава многокомпонентных систем в мировой практике наиболее широко используются анализаторы, комплектующиеся различными наборами ионоселективных блоков [2]. Как правило, в основе работы таких приборов лежит принцип отбора отдельных проб, хотя в аппаратах «искусственная почка» (АИП) многих фирм-производителей присутствует узел, предназначенный для возможного подключения проточной контрольной селективной ячейки. Датчики, входящие в состав такой ячейки, должны соответствовать некоторому перечню требований. Одним из наиболее важных параметров этих датчиков, помимо высокой селективности к определяемым компонентам диализирующего раствора, при отсутствии необратимого взаимодействия с последним, являются небольшие размеры. Это непременное условие продиктовано принципом минимального изменения гемодинамики и циркуляции диализного раствора в ходе диализной процедуры. Именно в целях максимальной минимизации контрольных сенсорных устройств с середины 80-х годов в большинстве развитых стран широко исследуются возможности датчиков различного типа, пригодных для применения в медицинской аппаратуре, в том числе и в АИПах. Перспективными направлениями являются разработка и усовершенствование ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ) [9].

Основными преимуществами ИСПТ перед традиционными ионоселективными электродами (ИСЭ) является полностью твердое исполнение (исключен жидкостный компонент), технологичность изготовления, а также минимальные размеры рабочей поверхности (ее площадь не превышает 1,5 мм^2), что позволяет компактно расположить в проточной ячейке сразу несколько сенсорных единиц. Однако использование традиционных ИСПТ связано с некоторыми ограничениями. В частности, в конструкции этих сенсоров применяется все та же классическая селективная мембрана, унаследованная от обычных ИСЭ — с поливинилхлоридной матрицей. Такая мембрана стандартна для всех, за редким исключением, ИСЭ, используемых для контроля ионного состава сред. Степень ее адгезии к твердой кремниевой подложке самого транзистора невелика, поэтому даже в случае непродолжительной работы при температуре 37 °С происходит ее отслоение, нарушается герметичность покрытия полупроводникового кристалла. Кроме сокращения времени жизни сенсора, на выходе уменьшается отношение «сигнал/шум», что приводит к ухудшению воспроизводимости показаний [8].

Еще один нерешенный, но важный вопрос — универсальность применения датчиков. Понятие универсальности в данном случае несколько сужено и подразумевает возможность использования датчиков как для контроля диализирующих растворов, так и для мониторинга электролитного состава крови больных во время проведения диализной процедуры. На сегодняшний день даже при включении контрольного сенсорного блока в экстракорпоральный круг кровообращения анализ цельной крови больных возможен только путем отбора отдельных проб. На результаты анализа в данном случае сильно влияют многие параметры АИПа. Например, одним из них является степень закрытости системы внутриаппаратной циркуляции крови (и в термодинамическом отношении, и в биологическом смысле). Включение же сенсорной системы непосредственно в круг кровообращения больного во время сеанса гемодиализа может радикально повлиять на алгоритм его проведения, поскольку открывает возможность (при замыкании блока обратной связи) перехода к автономной регуляции процедуры. Но, к сожалению, компоненты мембран, применяемые в сенсорных системах, не позволяют произвести удовлетворительную стерилизацию какого-либо типа электродов без необратимого изменения их селективных свойств, что является серьезным препятствием для осуществления такого перехода. Поэтому поиск новых долговечных и устойчивых к различного рода воздействиям материалов для изготовления мембран датчиков является одной из приоритетных задач в области физической химии полимеров.

В настоящей работе в качестве основы мембранной матрицы были выбраны материалы нового поколения — фотополимеризуемые уретандиакрилаты, а также найдены оптимальные составы мембранных композиций.

Наряду с основными преимуществами ИСПТ с полиуретановыми фотополимеризуемыми мембранами, перечисленными выше, их пригодность прежде всего определяется достоверностью определения величины концентраций ионов как в середине физиологического диапазона, так и в области его границ. Мы изучали возможность использования K+-селективных ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами как для контроля элект-

ролитного состава диализирующих растворов, применяемых в аппаратах «искусственная почка», так и цельной крови, а также плазмы крови больных, получающих лечение хроническим гемодиализом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе были использованы K+-ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами, изготовленные в Национальном центре микроэлектроники (Барселона, Испания) по методике, описанной ранее. Отдельный датчик представлял собой тонкую пластину (площадь — 1 $см^2$), покрытую слоем герметика (толщина покрытия — 100–200 мкм). Площадь рабочей поверхности датчика не превышала 1,5 $мм^2$.

Определение концентраций (активностей) ионов калия в пробах диализирующего раствора и в пробах указанных выше биологических жидкостей осуществляли по традиционной методике [10, 11]. Индивидуально для каждого сенсора определяли величину силы тока в канале транзистора (Id) в интервале от 60 до 200 мкА при постоянной величине напряжения «сток—исток» Vd=1В. Измерения проводили на специальном устройстве, сконструированном в Национальном центре микроэлектроники (Барселона, Испания). Составы калибровочных растворов приведены в табл. 1. Реперным служил «раствор Моргана» [7], по составу основных электролитов соответствующий плазме крови.

Калибровку ИСПТ, контрольных ионоселективных электродов, а также определение концентрации K^+ в пробах диализирующих растворов, цельной крови, а также в плазме крови пациентов производили с использованием иономера И-130 и анализатора Fresenius EF при температуре 37 °С.

Предварительно кровь больных, получающих лечение хроническим гемодиализом, гепаринизировалась (0,05 мл 5000 МЕ/мл раствора натриевой соли гепарина добавляли к 1 мл цельной крови). Плазму крови отделяли от форменных элементов центрифугированием в течение 10 мин (центрифуга РС-6, 15 °С).

Таблица 1

Составы калибровочных растворов

Компонент	Раствор № 1	Раствор № 2	Раствор № 3	Раствор № 4	Раствор № 5	Раствор № 6
KCl, ммоль/л	1	2	2,5	5	25	125
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, ммоль/л	Постоянный фон: 10					
NaCl, ммоль/л	Постоянный фон: 100					
$NaHCO_3$, ммоль/л	Постоянный фон: 20					
$CaCl_2$, ммоль/л	Постоянный фон: 1,5					
$MgCl_2$, ммоль/л	Постоянный фон: 1,5					
Глюкоза, ммоль/л	Постоянный фон: 10					
Сахароза, ммоль/л	Постоянный фон: 27					

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку ИСПТ являются электрохимическими датчиками, при работе в идеальной системе (чистый раствор основного электролита) величина отклика, т. е. ЭДС, определяется уравнением Нернста [1]:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{ZF} \ln C_i ,$$

где E° — стандартное значение ЭДС-системы; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; Z — степень окисления определяемого элемента; F — число Фарадея; C_i — концентрация определяемого иона i.

Таким образом, зависимость между величиной отклика от концентрации определяемого иона должна быть прямолинейной, а тангенс угла наклона указанной прямой должен составлять, примерно, 61 мВ в расчете на единицу изменения pC_i. В смешанных калибровочных растворах, составы которых сведены в табл. 1, потенциал-формирующими оказываются все ионы, и уравнение Нернста трансформируется в уравнение Никольского [4]:

$$E = E_0 + \frac{RT}{ZF} \ln \left[C_i + \sum_m K_{i-m} C_m \right] ,$$

где Cm — концентрация мешающего иона; K_{i-m} — «потенциометрическая» константа, определяющая селективность к i-му — основному иону, по сравнению с m-мешающим ионом.

Следовательно, даже при высокой селективности по отношению к основному иону тангенс угла наклона зависимости E от lnC не превышает 56–57 мВ на единицу pC_i.

Полученные данные для нескольких индивидуальных датчиков представлены в табл. 2.

Было также зафиксировано изменение абсолютного значения потенциала (табл. 3, 4) при длительном контакте датчиков с калибровочными растворами. Такое изменение, однако, не сказывалось на точности результата в случае одномоментного определения концентрации ионов (см. табл. 2).

Для сравнительного тестирования датчиков с полиуретандиакрилатными мембранами были выбраны стандартные мембран-

Таблица 2

Угол наклона S (градусы) и коэффициенты корреляции для индивидуальных датчиков — K^+-ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами при длительном контакте со смешанными модельными растворами

№ K^+-ИСПТ	Время контакта с растворами (сут)					
	3		28		50	
	S	R	S	R	S	R
1	52,9	0,995	57,9	0,995	57,9	0,995
2	46,2	0,991	52,4	0,995	52,8	0,990
3	50,1	0,996	53,7	0,997	57,4	0,995
4	53,1	0,998	62,2	0,999	60,1	0,995
5	52,4	0,995	50,8	0,997	51,8	0,996

ные ионоселективные электроды с матрицами из поливинилхлорида. Тестирование проводили в диализирующих растворах, поступающих в диализаторы нескольких АИПов, и на отработанных диализатах из тех же АИПов (табл. 5).

После определения концентрации K^+ в водных растворах электролитов были проведены анализы биологических проб (табл. 6). Контрольным методом служило ионометрическое определение K^+ на анализаторе Fresenius EF.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначальные невысокие значения углового коэффициента (от 46,2 до 53,1 мВ) после 3-дневного контакта ИСПТ с раствором электролитов, вероятно, были обусловлены низкой скоростью проработки полимерной полиуретановой мембраны. При постоянном контакте ИСПТ с раствором KCl (0,01 моль/л) с течением времени угол наклона (S) возрастал. Однако лишь у трех индивидуальных датчиков из пяти испытуемых его величина достигла оптимальных 51мВ в расчете на единицу pC_{K+}. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тщательной выбраковки подобных сенсоров при их использовании в аналитических целях. Главным критерием пригодности, как было отмечено выше, является соответствие демонстрируемых потенциалов уравнению Никольского. Именно с полнотой функции датчиков связана точность определения концентрации иона в пробе. Как следует из результатов, представленных в табл. 5, при работе в диализирующем

Таблица 3

Значения потенциалов (мВ), демонстрируемых индивидуальным K^+-ИСПТ № 1 при калибровке по стандартным растворам (интервал между измерениями — от 3 до 4 мин, Vd=1В; Id=170мА)

Дни	Концентрации K^+ в модельных растворах (ммоль/л)					
	1	2	2,5	5	25	125
3	1148,3	–	–	1110,0	1086,0	1047,1
	1148,2			1110,7	1085,6	1048,2
	1146,8			1111,1	1089,7	1048,5
	1144,2			–	1089,7	1047,8
14	972,9	–	951,0	941,6	903,5	860,9
	970,6		950,1	939,5	903,5	862,3
	970,5		949,8	937,9	904,5	862,0
	969,4		950,3	939,0	–	–
25	952,6	–	941,0	925,0	889,0	843,7
	951,6		939,6	924,0	888,7	846,0
	951,0		937,8	925,4	888,8	844,0
	951,8		934,9	924,4	889,0	–
27	962,3	942,3	–	931,3	889,9	849,0
	959,8	941,8		929,2	888,4	849,5
	959,7	941,3		928,0	889,5	849,9
	959,5	941,7		927,0	889,1	849,7
50	955,8	941,0	–	930,6	888,8	848,1
	954,7	940,2		928,8	887,8	847,6
	955,0	942,4		928,6	887,6	848,4
	955,2	940,5		930,0	887,3	848,6

Таблица 4

Значения потенциалов (мВ), демонстрируемых индивидуальным K^+-ИСПТ № 2 при калибровке по стандартным растворам (интервал между измерениями — от 3 до 4 мин; Vd=1В, Id=170мА)

Дни	Концентрации K^+ в модельных растворах (ммоль/л)					
	1	2	2,5	5	25	125
3	972,7	–	–	939,2	912,7	882,1
	972,4			942,5	914,1	883,6
	971,2			945,8	915,7	884
	972			947,6	917,4	884
14	–	–	–	970	931,4	892,9
				966,7	935,4	896,8
				964,8	933,6	896,9
				964,2	–	–
25	–	–	–	968,6	938,1	900,7
				970,4	939,2	900,5
				970,8	939,4	900,8
				969,7	–	–
27	–	–	986,5	968,4	937,8	902,1
			984,3	970,2	938,9	902,9
			983,9	969,1	938,1	903,1
			981,4	969,1	939,6	902,7
50	–	982,7	–	967,8	935,5	901,3
		982,1		967,4	935,9	900,9
		982,9		966,3	935,2	900,8
		981,7		966,8	937,8	900,6

Таблица 5

Сравнительное определение концентрации K^+ (ммоль/л) в пробах растворов, взятых из аппаратов «искусственная почка

№ АИПа	Реальное время (мин)	Место забора пробы	Тип датчика ($\bar{X}$±m)	
			К-ИСПТ с полиуретановой мембраной	ИСЭ с ПВХ мембраной
18	13,21	До входа	2,01±0,02	2,03±0,02
	13,29	в диализатор	2,04±0,02	2,05±0,02
	13,37	После выхода	2,92±0,07	2,68±0,05
	13,53	из диализатора	2,84±0,10	2,64±0,06
19	14,18	До входа	1,97±0,05	2,00±0,02
	14,27	в диализатор	1,93±0,05	2,01±0,03
	14,40	После выхода	2,57±0,07	2,58±0,02
	14,50	из диализатора	2,62±0,04	2,58±0,03
20	15,17	До входа	2,11±0,02	2,13±0,02
	15,23	в диализатор	2,09±0,07	2,11±0,06
	15,38	После выхода	2,80±0,10	2,78±0,07
	15,52	из диализатора	2,76±0,09	2,70±0,08

Таблица 6

Определение концентрации K^+ (ммоль/л) в биологических пробах с помощью K^+-ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами и на анализаторе Fresenius EF ($\bar{X}$±m)

Проба		K^+-ИСПТ	Анализатор Fresenius EF
Стандартный раствор Моргана C_{K^+} = 5 ммоль/л		5,40±0,20	5,10±0,10
Плазма крови			
Больная С.	До диализа	7,20±0,22	6,90±0,30
	После диализа	4,42±0,20	4,36±0,16
Больной Х.	До диализа	4,52±0,13	4,60±0,06
	После диализа	3,42±0,09	3,48±0,10
Больная Е.	До диализа	5,20±0,18	5,25±0,15
	После диализа	3,70±0,12	3,90±0,04
Цельная кровь (частичный гемолиз)		19,50±0,10	20,08±0,10

растворе K^+-ИСПТ ошибка не превышала 4%, что отвечает общеклиническим требованиям, предъявляемым к определению концентрации электролитов в биологических пробах.

Дрейф абсолютных значений потенциалов наблюдался как для датчика с относительно низким угловым коэффициентом (№ 2), так и для K^+-ИСПТ с достаточной полнотой функции (№ 1). Это явление, по всей видимости, связано с диффузионными процессами, протекающими на границе фаз «подложка транзистора/ионоселективная мембрана». Следовательно, повторные калибровки в ходе анализа все-таки необходимы. Но обязательность таких операций вовсе не является специфическим признаком, свойственным для работы именно с ИСПТ. На современном этапе развития аналитического приборостроения без внутренних калибровок нельзя обойтись и при работе с другими датчиками. Поэтому нестабильность абсолютных значений потенциалов не препятствует оснащению анализатора биологических проб ИСПТ.

В ходе контрольных экспериментов со стандартным (по концентрации K^+) раствором Моргана, плазмой крови и цельной кровью человека установлено, что в подавляющем большинстве случаев достоверные различия между значениями потенциала, полученными для сенсоров с мембраной на основе фотополимеризуемого полиуретана и для обычных ионоселективных электродов с поливинилхлоридными мембранами (анализатор Fresenius EF), отсутствовали. Таким образом, и при анализе биологических проб датчики нового поколения по своим основным характеристикам не уступают традиционным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резкое сокращение государственного финансирования в минувшее десятилетие поставило под сомнение перспективы развития отечественной химии полимеров и прикладной физической химии и, следовательно, разработки новых типов датчиков для нужд клинической лабораторной диагностики. Поэтому велика вероятность того, что сохранившиеся научные и клинические базы в ближайшие годы могут потенциально служить лишь полигоном для апробации фармакологических, технических и технологических новшеств западноевропейского и североамериканского происхождения. С сожалением приходится констатировать, что сейчас на долю российских исследователей приходится лишь контролирующая функция. Однако это не умаляет ответственности при определении годности к применению поступающих из-за рубежа тех или иных лекарственных препаратов, приборов и датчиков.

Успешное развитие технологии производства новейших сенсоров с селективными мембранами на основе полиуретана, возможно, скоро приведет к новому буму в аналитическом приборостроении, особенно с решением проблемы стерилизации ИСПТ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Камман К. Работа с ионоселективными электродами.—М.: Мир, 1980.—284 с.

2. Клиническая оценка лабораторных тестов / Н.У.Тиц.—М.: Медицина, 1986.—480 с.

3. Корыта И., Штулик К. Ионоселективные электроды.—М.: Медицина, 1989.—267 с.

4. Хаваш Е. Ионо- и молекулярноселективные электроды в биологических системах.—М.: Мир, 1988.—221 с.

5. Bratov A., Abramova N., Munoz J. et al. Ion sensor with photocurable polyurethane polymer matrices for potassium ion-sensitive electrode membrane // J. Electrochemical Soc.—1994.—Vol. 141.—P. L111–L112.

6. Bratov A., Abramova N., Munoz J. et al. Photocurable polyurethane polymer matrices for potassium ion-sensitive electrode membrane // Anal. Chem.—1995.—Vol. 67.—P. 3589–3595.

7. Cumberbatch M., Zareian K., Morgan D.B., Svamihaihan R. The relationship between sodium transport and Na^+, K^+-ATP-ase in human erythrocytes // Biochem. Med.—1981.—Vol. 26.—P. 60–66.

8. Janata J., Josowich M., Vanysek P., DeVaney D.M. Chemical sensors // Anal. Chem.—1998.—Vol. 70, № 12.—P. 179–208.

9. Janata J., Josowicz M., De Vaney D.M.. Chemical sensors // Anal.Chem.—1994.—Vol. 66.—P. 207–228.

10. Munoz J., Bratov A., Mas R. et al. Planar compatible polymer technology for packaging of chemical microsensors // J. Electrochem. Soc.—1996.—Vol.143.—P. 2020–2025.

11. Vlasov Yu.G. Ion-selective field effect transistors: different types and problems // Ion-selective electrodes — 4 / Ed. E. Pungor.—Budapest: Akad. Kiado, 1985.—P. 245–282.

Поступила в редакцию 17.02.2000 г.