

Miniaturisierter Fluoreszenzsensor auf Ru(dpp)_3^{2+} -Basis zur Echtzeitbestimmung der Atemsauerstoffkonzentration

Jonas Steinebrunner¹, Christian Weber^{1,2}, Maximilian Willaredt¹, Dr. Katrin Schmitt^{1,2}, Prof. Dr. Jürgen Wöllenstein^{1,2}

¹ Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Universität Freiburg 79110 Freiburg i. Br.

² Fraunhofer Institut für physikalische Messtechnik IPM, 79110 Freiburg i. Br.

Zusammenfassung

Im vorliegenden Beitrag wird ein fluoreszenzbasierter Sauerstoffsensor vorgestellt, der sich in einen standardisierten T-Verbinder (Innendurchmesser 15 mm) für Atemmasken und Beatmungssysteme integriert werden kann. Dies ermöglicht eine einfache Einbindung in bestehende Monitoringsysteme möglich. Das Messprinzip beruht auf dem Effekt der Fluoreszenzlöschung (Quenching) durch molekularen Sauerstoff. Als Farbstoff wird ein Rutheniumkomplex (Ru(dpp)_3^{2+}) verwendet, der in eine Sol-Gel-Matrix eingebettet ist. Zur Anregung des Farbstoffes wird eine blaue LED mit einer zentralen Emissionswellenlänge von 450 nm verwendet. Der Farbstoff Ru(dpp)_3^{2+} absorbiert das Anregungslicht und emittiert eine charakteristische Fluoreszenz mit einem Intensitätsmaximum bei ca. 610 nm. Diese Verschiebung des Emissionsspektrums gegenüber dem Anregungslicht (Stokes-Shift) bildet die Grundlage für das angewendete Quenching-Messprinzip. Ein Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 550 nm blockiert das reflektierte, energiereichere Anregungslicht, sodass nur das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht von einem Photodetektor erfasst wird. Für eine effiziente Lichtführung sind zwei plankonvexe Linsen mit einem Durchmesser von 6 mm in den Sensorkopf integriert. Eine befindet sich vor der LED und eine vor dem Detektor, um sowohl das Anregungs- als auch das Fluoreszenzlicht möglichst effektiv zu fokussieren. Die gesamte optische Anordnung einschließlich des Langpassfilters ist kompakt im Sensorkopf eingebaut, der mittels additiver Fertigung (3D-Druck) hergestellt wurde.

Keywords: Fluoreszenzlöschung, Sauerstoffsensor, Atemgasanalyse, Sol-Gel, Ru(dpp)_3^{2+}

Einleitung

Der menschliche Organismus kann nur wenige Minuten ohne Sauerstoff überleben. Entsprechend zentral ist die Beurteilung des O_2 -Status in nahezu allen Bereichen der Medizin von der Notaufnahme über den Rettungsdienst bis hin zur hausärztlichen Versorgung. Eine ausreichende O_2 -Versorgung gewährleistet die kontinuierliche zelluläre Energieproduktion, insbesondere in hochmetabolisch aktiven Organen wie Herz, Gehirn und Leber. Die Sauerstoffaufnahme (VO_2) ist ein direkter Indikator für den Energiebedarf und die metabolische Aktivität von Geweben [1]. Eine effiziente VO_2 setzt einen intakten Gasaustausch in der Lunge, eine ausreichende kardiovaskuläre Versorgung und eine funktionierende zelluläre Sauerstoffverwertung voraus. Störungen in einem dieser Systeme führen zu einer verminderten Energieproduktion und können frühzeitig auf pathophysiologische Veränderungen hinweisen, was die Notwendigkeit einer präzisen und kontinuierlichen Überwachung der O_2 -Versorgung unterstreicht [2].

Derzeit erfolgt die klinische Beurteilung der Sauerstoffversorgung überwiegend über die Pulsoxymetrie, welche die arterielle Sauerstoffsättigung (SpO_2) am Finger misst. Diese Methode ist einfach zu handhaben, liefert Echtzeitwerte, ist nicht-invasiv und kostengünstig [3]. Daher gehört der Pulsoxymetrie-Sensor von der Notfallmedizin bis zur Hausarztpraxis zum medizinischen Standard-equipment. Allerdings liefert der Sensor nur indirekte Informationen über den Gasaustausch in der Lunge und erlaubt keine Aussage über die tatsächliche VO_2 . Außerdem ist die Messung anfällig für verschiedenste Störfaktoren, wie beispielsweise eine eingeschränkte periphere Durchblutung, starke Hautpigmentierung, Bewegungsartefakte oder Nagellack [4]. Aufgrund dessen ist bei unklaren Messungen häufig eine Blutanalyse notwendig. Diese gelten als klinischer Goldstandard zur Bewertung des metabolischen Status. Nachteile ergeben sich jedoch aus der invasiven Entnahme, der zeitaufwendigen und kostenintensiven Laboranalyse sowie dem Verlust der Echtzeitmessung gegenüber einer

Momentaufnahme [5]. Bislang existieren keine portablen Echtzeit Monitoring-Systeme, die die Pulsoxymetrie durch eine gleichzeitige Messung des Sauerstoffgehalts in der Atemluft ergänzen.

Im vorliegenden Beitrag wird ein miniaturisierter Fluoreszenzsensor auf Basis des Ruthenium-komplexes Ru(dpp)_3^{2+} vorgestellt, der in einen standardisierten T-Verbinder (Innendurchmesser 15 mm) für Beatmungsmasken und Beatmungssysteme integrierbar ist. Der Schwerpunkt des vorliegenden Beitrags liegt auf dem physikalischen Messprinzip, dem Herstellungsprozess der Sensormembran sowie dem optischen und mechanischen Aufbau des Systems. Außerdem werden erste experimentelle Labormessungen einer Machbarkeitsstudie vorgestellt.

Messprinzip und theoretische Grundlagen

Fluorophore besitzen die Charakteristik Photonen nach Absorption der Strahlungsenergie, zum Teil strahlend zu emittieren. Das emittierte Licht wird Lumineszenz genannt und ist durch die Stokes-Verschiebung (längere Wellenlänge) vom energiereicheren Anregungslicht unterscheidbar. Ein Spektralfilter sorgt in der Praxis dafür, dass ausschließlich Fluoreszenzlicht von einem Detektor gemessen wird. Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration erfolgt über das Prinzip des Fluoreszenzquenchings, bei dem molekularer Sauerstoff als dynamischer Quencher die Emission eines geeigneten Indikatorfarbstoffs abschwächt [6]. Beim Ru(dpp)_3^{2+} kommt es durch den Heavy-Atom-Effekt des Rutheniums zu ultraschnellem Intersystem Crossing (ISC) vom initial angeregten Singulettzustand zum langlebigen Triplettzustand, der Phosphoreszenz (~ 610 nm, $\tau \approx 5$ μs) (vgl. Abb. 1). Molekularer Sauerstoff interagiert durch seinen Triplett-Grundzustand ($^3\Sigma$) strahlungslos mit diesem Triplettzustand des Fluorophors, wodurch Phosphoreszenzintensität -und lebensdauer konzentrationsabhängig reduziert werden [7].

Das maximale Messsignal bei der Fluoreszenzquenching-Messtechnik tritt somit bei 0 Vol.-% O_2 auf. Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Sauerstoffkonzentration wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[\text{O}_2], \quad (1)$$

wobei I_0 die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Sauerstoff, I die gemessene Intensität bei einer gegebenen O_2 -Konzentration und K_{SV} die Stern-Volmer-

Konstante bezeichnet. Diese ergibt sich aus dem Produkt der bimolekularen Löschratenkonstante k_q und der natürlichen Lebensdauer T_0 :

$$K_{SV} = k_q + T_0. \quad (2)$$

Eine hohe natürliche Lebensdauer T_0 führt gemäß Gl. (2) zu einer hohen Stern-Volmer-Konstante und damit zu hoher Sauerstoffempfindlichkeit.

Die Sauerstoffabhängigkeit lässt sich sowohl über die Fluoreszenzintensität als auch über die Fluoreszenzlebensdauer beschreiben. Im vorliegenden Sensorsystem erfolgt die Auswertung über die Änderung der Fluoreszenzintensität.

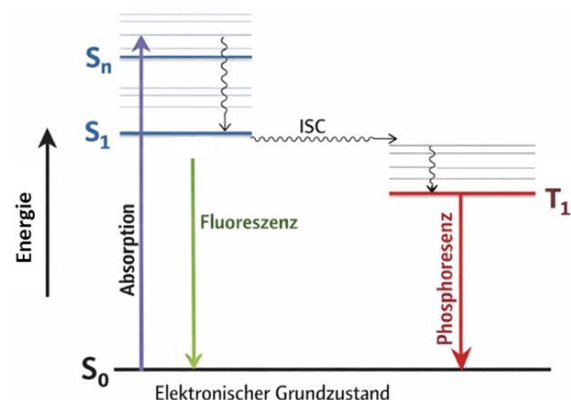


Abb. 1: Darstellung der physikalischen Prozesse nach optischer Anregung in einem Jablonski-Diagramm. Gezeigt sind Absorption aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in angeregte Singulettzustände S_n , strahlungslose Relaxation zum Zustand S_1 , Fluoreszenz, Intersystem Crossing (ISC) in den Triplettzustand T_1 sowie Phosphoreszenz.

Farbstoff Ru(dpp)_3^{2+} und Sol-Gel Einbettung

Ru(dpp)_3^{2+} ist ein bereits vielfach eingesetzter Fluoreszenzfarbstoff für die optische Sauerstoffmessung. Für den Sensoreinsatz muss der Farbstoff auf einem Festkörpersubstrat immobilisiert werden, wobei die Zugänglichkeit für Sauerstoffmoleküle erhalten bleiben muss. Die Sol-Gel-Technologie auf Basis von n-Propyltriethoxysilan (PTEOS) stellt hierfür eine bewährte Methode dar. Im Sol-Gel-Prozess entsteht durch Hydrolyse und anschließende Kondensation von PTEOS ein nanoporöses SiO_2 -Netzwerk. Das Ru(dpp)_3^{2+} wird bereits vor der Gelierung der Ausgangslösung zugesetzt und während der Netzbildung in die entstehende Sol-Gel-Matrix eingebettet. Anschließend wird das Gel bei erhöhter Temperatur ausgehärtet. Die

entstehenden Nanoporen ermöglichen eine schnelle Diffusion von Sauerstoff zu den immobilisierten Farbstoffmolekülen. Schichtdicke, PTEOS-Konzentration, Katalysator-pH und Farbstoff-zu-Precursor-Verhältnis beeinflussen dabei die optische Dichte sowie Empfindlichkeit und Ansprechzeit der Sensor-membran.

Sensordesign

Das Sensordesign wurde mittels additiver Fertigung (FDM) aus Polylactide (PLA) realisiert (Vgl. Abb. 2). Es wurde ein modularer Aufbau entwickelt, der aus mehreren Baugruppen besteht. Dazu gehören der Sensorkopf mit integrierter LED und Photodetektor sowie zugehörige Steuerelektronik (PCB). Ein Probenhalter aus Acrylnitril-Butadien-Styrol ABS fixiert unterschiedlichste Substratträger durch eine passgenaue Vertiefung.

Bereits im ersten Demonstrator wurde das Konzept so umgesetzt, dass der Sensor in einen standardisierten medizinischen T-Verbinder mit einem Innendurchmesser von 15 mm für Atemmasken und Monitoringsysteme integriert werden kann (vgl. Abb. 3 (a)). Zur Anregung der Probe wird eine blaue LED mit einer Emissionswellenlänge von 450 nm verwendet. Der Farbstoff Ru(dpp)_3^{2+} absorbiert das Anregungslicht und emittiert eine charakteristische Fluoreszenz mit einem Intensitätsmaximum bei ca. 610 nm. Ein Langpassfilter (15-198 Edmund Optics, USA) mit einer Grenzwellenlänge von 550 nm unterdrückt das reflektierte, energiereichere Anregungslicht, sodass nur das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht von einem Photodetektor (SFH 2700 A01 AMS Osram, Austria) erfasst wird. Für eine effiziente Lichtführung sind zwei plankonvexe Linsen (LA4280 Thorlabs, USA) mit einem Durchmesser von 6 mm in den Sensorkopf integriert, eine vor der LED und eine vor dem Detektor, um sowohl das Anregungs- als auch das Fluoreszenzlicht möglichst effektiv zu bündeln.

Experimentelle Durchführung

Das Sol-Gel wurde gemäß [8] unter Verwendung von n-Propyltriethoxysilan (PTEOS), Ethanol, Wasser und Salzsäure im molaren Verhältnis von 1: 6,25: 4: 0,007 hergestellt. Der Farbstoff Ru(dpp)_3^{2+} wurde in einer Konzentration von 2,5 g/l in Bezug auf das Gesamtvolumen des Sols beigemischt.

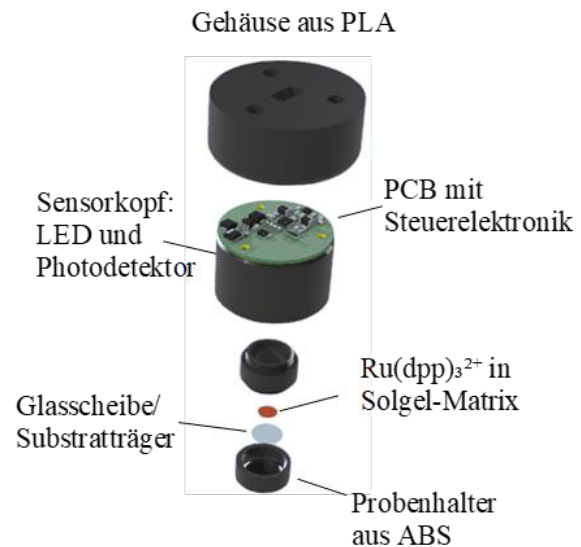


Abb. 2: Schematische Explosionszeichnung des Demonstrators. Dieser besteht aus mehreren Einzelkomponenten. Hervorzuheben sind der Sensorkopf mit LED und Photodetektor sowie die Steuerelektronik auf einer passenden Leiterplatte. Der Probenhalter aus ABS ist mit einem integrierten Substratträger aus Glas ausgestattet.

Anschließend wurden 2 μL der fertigen Farbstoff-Matrix mit einer Mikropipette in die Mitte des Substrats aufgebracht und 24 Stunden bei 110 °C ausgehärtet. Es wurden hierfür vier verschiedene Substratträger untersucht: Aluminium, Glas, PLA und ABS. Abb. 4 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der ausgehärteten Ru(dpp)_3^{2+} -Sol-Gel-Mischung für jedes Substratmaterial.

Messparameter

Die LED wurde mit einer Modulationsfrequenz von 5 kHz und einer Stromamplitude von 20 mA betrieben. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels eines Lock-In-Algorithmus mit einer Zeitkonstante von 10 ms digital verarbeitet. Der Sensor wurde für alle Messreihen in eine additiv hergestellte Messkammer integriert (Vgl. Abb. 4 (b)).

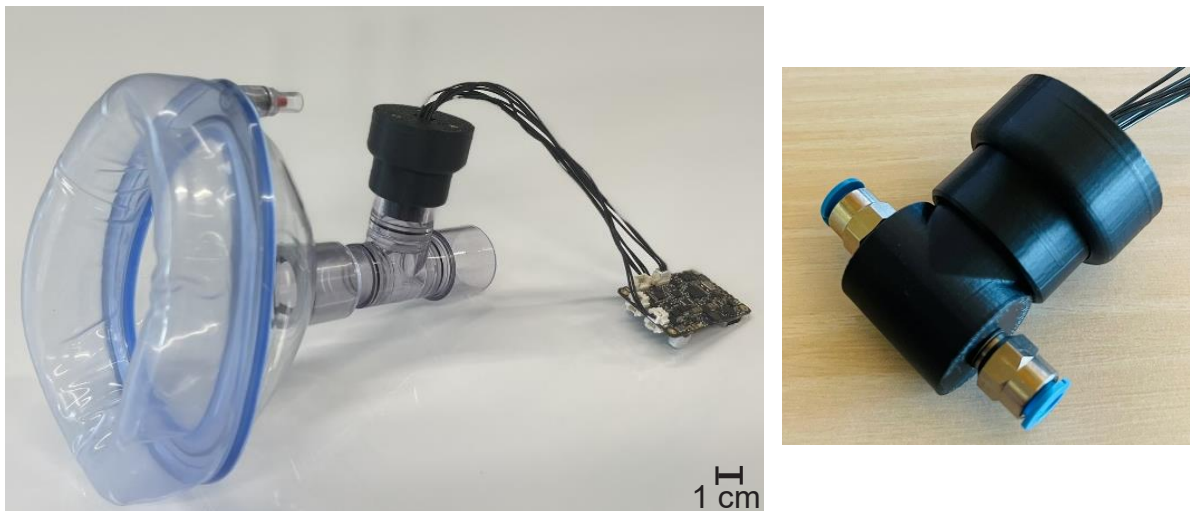


Abb. 3 (a) Foto des Sensors, der in einen medizinischen T-Verbinder integriert und an eine Beatmungsmaske angeschlossen ist. (b) Messaufbau für die ersten Funktionstests.

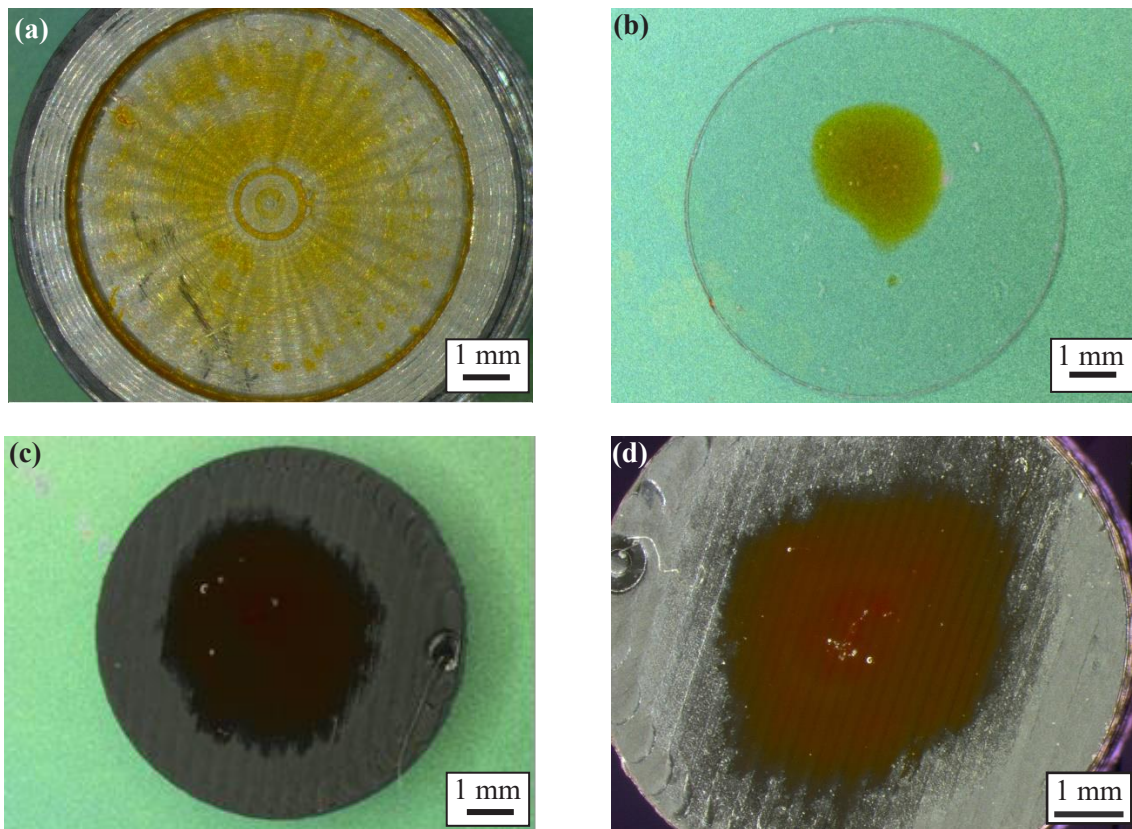


Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Ru(dpp)_3^{2+} -Sol-Gel-Schicht auf verschiedenen Substratträgern: (a) Aluminium, (b) Glas, (c) PLA und (d) ABS. Die Aufnahmen wurden mit einem ZEISS Smartzoom 5 Mikroskop aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen eines Funktionstest wurde die Sauerstoffkonzentration im Bereich von 0 bis 20 Vol.-% O₂ in N₂ variiert. Hierfür wurden Massendurchflussregler (MFC, Bronkhorst, Deutschland) und zwei zertifizierte Gasflaschen (Westfalen, Deutschland) zum verwendet: eine mit reinem Sauerstoff und eine mit reinem Stickstoff. Während der Messung wurde der Gasfluss konstant auf 2 l/min eingestellt. Die Sauerstoffkonzentration wurde schrittweise auf 0, 5, 10 und 20 Vol.-% eingestellt, während die Intensität der Fluoreszenzlöschung kontinuierlich gemessen wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einer Messrate von 1 Hz aufgezeichnet (Abb. 5).

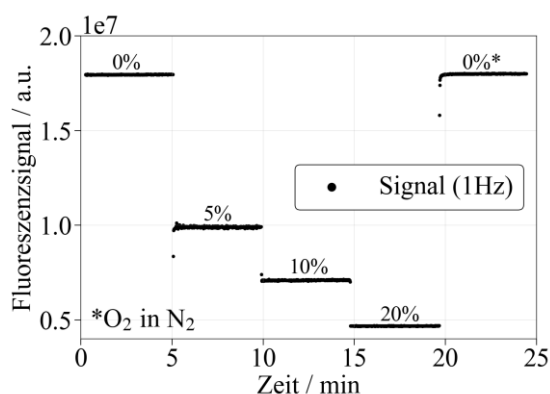


Abb. 5: Fluoreszenzsignal bei einer Messrate von 1 Hz aufgetragen über die Zeit bei unterschiedlichen O₂-Konzentration (0,5,10,20 Vol.-% O₂ in N₂) bei Raumtemperatur.

Der Funktionstest zeigt neben der grundsätzlichen Sauerstoffempfindlichkeit auch ein schnelles Ansprechverhalten des Sensors. Es zeigt sich, dass bei einer Flussrate von 2 l/min kein einziger Datenpunkt zwischen den variierenden O₂-Konzentrationsstufen liegt. Aufgrund der relativ niedrigen Messrate (1 Hz) lässt sich daraus lediglich schließen, dass die Antwortzeit unter 1 s liegt. Trotzdem deutet es daraufhin, dass die Sensorreaktion kein limitierender Faktor für die Echtzeitmessung im Atem darstellt. Die bei der Atmung auftretenden Volumenströme liegen über dem im Experiment eingestellten Wert von 2 l/min. Das Atemvolumen eines Erwachsenen beträgt typischerweise zwischen 6 bis 40 l/min [9]. Es ist daher zu erwarten, dass der Sensor in der praktischen Anwendung eine Antwortzeit deutlich unter 1 s aufweist, da ein höherer Gasfluss den Austausch in der Messkammer zusätzlich beschleunigt.

Zur Untersuchung des Einflusses des Substratträgers auf die Sensorantwort wurden Glas, Aluminium sowie die additiv gefertigten Kunststoffe ABS und PLA als Trägermaterialien für die Ru(dpp)₃²⁺-Sol-Gel-Kombination eingesetzt. Die Kunststoffe wurden dabei mittels 3D-Druck hergestellt. Für diese Messreihe wurde die Sauerstoffkonzentration zwischen 16 und 21 Vol.-% O₂ in N₂ variiert. Diese Konzentrationswerte wurden gewählt, da 21 Vol.-% in etwa dem Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft entspricht, während 16 Vol.-% O₂ einen typischen Sauerstoffgehalt der Ausatemluft darstellt [9]. Die Differenz zwischen beiden Werten entspricht näherungsweise dem vom Körper aufgenommenen Sauerstoffanteil. Zur Bewertung der Sensorantwort auf den jeweiligen Substratträger wurde das Verhältnis von Signaländerung zu Rauschen herangezogen (Gl. 3).

$$SNR_{\Delta} = (S_0 - S_1) / \sigma_1 \quad (3)$$

Dabei ist S₀ der gemittelt Fluoreszenzwert über 100 Messpunkte (100 s) bei einer Sauerstoffkonzentration von 16 Vol.-%, S₁ der Fluoreszenzwert (Mittelwert, 100 s) bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 Vol.-% und σ_1 die Standardabweichung des Mittelwerts bei der 21 Vol.-% O₂-Stufe. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Verhältnis zwischen Signaländerung (16 zu 21 Vol.-% O₂ in N₂) und Rauschen für vier verschiedene Substratträger.

Substrat	SNR _Δ
Alu	204
Glas	131
PLA	75
ABS	202

Es zeigt sich, dass Alu und ABS mit einem SNR_Δ von ca. 200 das beste Verhältnis liefert und damit für die beste Auflösung sorgt. Besonders ABS erweist sich als interessanter Substratträger, da sowohl die Material- als auch die Fertigungskosten im Vergleich zu Aluminium und Glas deutlich geringer sind. PLA hingegen liefert als Substratträger die schlechtesten Ergebnisse, das Signal erscheint bereits beim „Eye-Test“ deutlich instabiler (Vgl. Abb. 6 (c)). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Farbstoff auf PLA nicht unter den erforderlichen Aushärtungsbedingungen verarbeitet werden konnte, da PLA lediglich eine Wärmeformbeständigkeit von etwa 50 bis 60 °C

aufweist und somit keine Aushärtung bei Temperaturen über 100 °C ermöglicht.

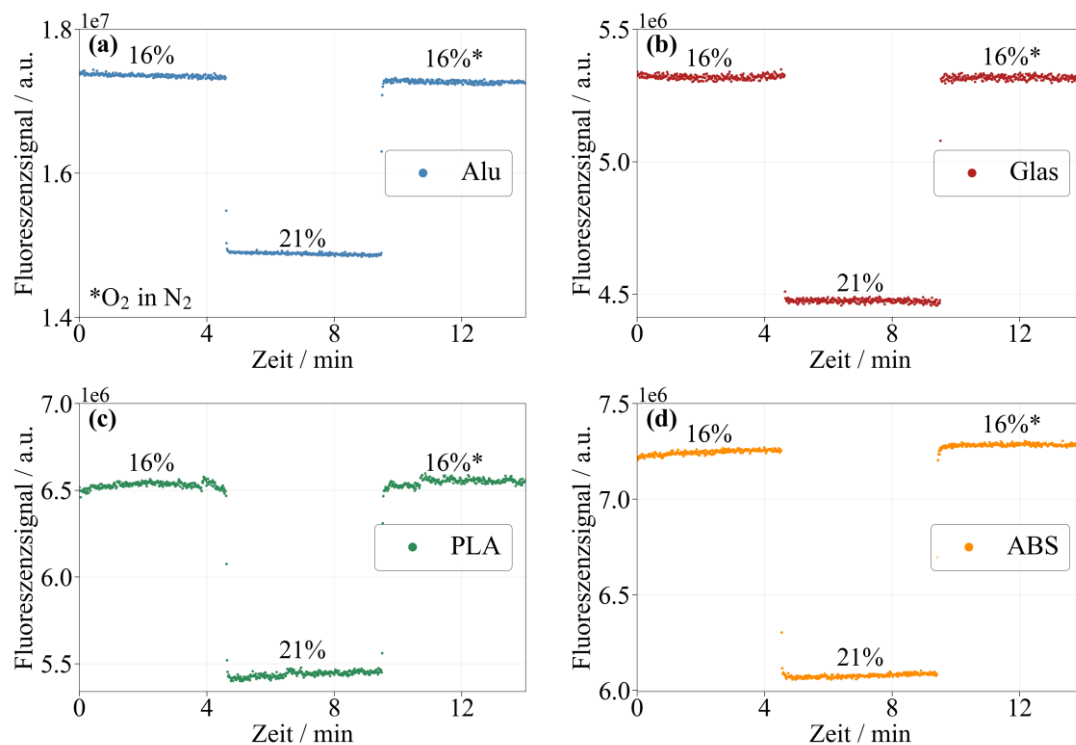


Abb. 6: Fluoreszenzsignal aufgetragen über die Zeit für verschiedene Substratträger: Alu (a), Glas (b), PLA (c) und ABS (d). Bei jeder Messreihe (a)-(d) wurde die Sauerstoffkonzentration bei Raumtemperatur zwischen 16 und 21 Vol. % O₂ in N₂ variiert.

Literatur

- [1] J. E. Hall und A. C. Guyton, *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 13. Aufl. (Student consult). Philadelphia, Pa.: Elsevier, 2016.
- [2] D. C. Poole und A. M. Jones, "Oxygen uptake kinetics," *Comprehensive Physiology*, Jg. 2, Nr. 2, S. 933–996, 2012, doi: 10.1002/cphy.c100072.
- [3] J. J. Pretto, T. Roebuck, L. Beckert und G. Hamilton, "Clinical use of pulse oximetry: official guidelines from the Thoracic Society of Australia and New Zealand," *Respirology (Carlton, Vic.)*, Early Access. doi: 10.1111/resp.12204.
- [4] D. León-Valladares *et al.*, "Determining factors of pulse oximetry accuracy: a literature review," *Revista clinica espanola*, Early Access. doi: 10.1016/j.rceng.2024.04.005.
- [5] H. Prasad *et al.*, "Correlation and agreement between arterial and venous blood gas analysis in patients with hypotension-an emergency department-based cross-sectional study," *International journal of emergency medicine*, Early Access. doi: 10.1186/s12245-023-00486-0.
- [6] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [7] V. Balzani und S. Campagna, *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I* (280). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [8] C. Higgins, D. Wencel, C. S. Burke, B. D. MacCraith und C. McDonagh, "Novel hybrid optical sensor materials for in-breath O₂ analysis," *The Analyst*, Early Access. doi: 10.1039/B716197B.
- [9] J. D. Pleil, M. Ariel Geer Wallace, M. D. Davis und C. M. Matty, "The physics of human breathing: flow, timing, volume, and pressure parameters for normal, on-demand, and ventilator respiration," *Journal of breath research*, Early Access. doi: 10.1088/1752-7163/ac2589.