

03;12

## Капли биологических жидкостей, высыхающие на твердой подложке: динамика морфологии, массы, температуры и механических свойств

© Т.А. Яхно, В.В. Казаков, О.А. Санина, А.Г. Санин, В.Г. Яхно

Институт прикладной физики РАН,  
603950 Нижний Новгород, Россия  
e-mail: tanya@awp.nnov.ru; tanya-yakhno@rambler.ru

(Поступило в Редакцию 24 августа 2009 г. В окончательной редакции 8 декабря 2009 г.)

С целью уточнения механизмов процесса самоорганизации в высыхающих каплях биологических жидкостей исследованы временные изменения их морфологии, массы, температуры и интегральных механических свойств. В экспериментах использована дистиллированная вода, физиологический (0.9 wt.%) водный раствор NaCl, 7 wt.% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в воде и 7 wt.% раствор BSA в физиологическом растворе. Показано, что динамика массы капли высыхающих растворов может быть описана наклонной прямой, имеющей два небольших нелинейных участка — в начале и в конце процесса высыхания. Раннему нелинейному участку соответствует также более интенсивное снижение температуры, которое становится менее интенсивным и стабилизируется по мере формирования слоя насыщенного пара над каплей. Поздний нелинейный участок в динамике массы капли растворов связан с замедлением диффузии воды через отвердевающую среду. Динамика температуры высыхающих капель определяется суммой эндотермических (испарение воды) и экзотермических (кристаллизация соли, гелеобразование) фазовых переходов. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях изменяет их механические свойства, что может быть выявлено методом акустической импедансометрии.

### Введение

В настоящее время капли, высыхающие на твердой подложке, широко используются в качестве естественной модели для исследования нелинейных неравновесных процессов: распределения растворенных веществ и формирования структур [1–4], интенсивности испарения в зависимости от массы капли и исходного контактного угла [5], временной эволюции трещинообразования и геометрии капли [6,7], электропроводности [7] и т.д. В медицинской диагностике развивается новый подход, основанный на характере структурообразования в высыхающих каплях биологических жидкостей [8–11].

Поскольку процессы самоорганизации в высыхающих каплях очень чувствительны к внешним воздействиям, важно развивать методы неразрушающего контроля для их исследования. Поэтому для регистрации динамики ряда физических параметров капель в процессе их высыхания используется ультразвуковая диагностика. Для выяснения степени влияния процедур измерения на процессы самоорганизации использовалось морфологическое сравнение исследуемых капель с интактными каплями тех же жидкостей, высохшими на предметных стеклах. Было установлено, что процедуры измерений, проводимых в данной работе, не нарушают формирования специфических радиальных зон и морфологических особенностей исследуемых жидкостей.

Нами исследуются процессы самоорганизации в естественных и модельных биологических жидкостях, в которых соотношение общего белка, соли и воды соответствует сыворотке крови человека. Было показано,

что в процессе испарения свободной воды в каплях происходят следующие события [12,13]:

- 1) прикрепление капли к подложке путем образования нижнего адсорбционного слоя;
- 2) перераспределение коллоидной фазы внутри капли благодаря центробежному течению;
- 3) формирование разных условий для фазовых переходов белка, расположенного вдоль края капли (на трехфазной границе) и в ее центре;
- 4) стеклование альбумина по краю капли;
- 5) каскад фазовых переходов альбумина (от коацерватов до геля) благодаря растущему соотношению концентрации соли к концентрации белка в жидкой (центральной) части капли;
- 6) кристаллизация соли в гелевом матриксе.

Фазовые превращения в высыхающей капле приводят к изменению ее физических параметров: массы, плотности, вязкости, эластичности и трения. Были разработаны метод и устройство для регистрации, воспроизведения и математической обработки динамики акустомеханического импеданса (АМИ) высыхающих капель [14,15], который интегрально включает в себя эти физические параметры. Экспериментально показано, что при одинаковых внешних условиях динамика АМИ высыхающих капель является паспортной характеристикой, отражающей состав и структуру многокомпонентной жидкости. Данный метод был успешно испытан в медицинской диагностике [16,17], при выявлении различных запахов [14,18], воздействии УФ-облучения и низкоинтенсивного магнитного поля [18,19]. Метод также оказался перспективным для контроля качества пищевых продуктов и лекарств [20–22].

В настоящей статье проведено сравнение временных изменений динамики АМИ, температуры и массы капля во время их высыхания. Для этого были созданы лабораторные установки, позволяющие регистрировать массу и температуру капля с помощью бесконтактных датчиков. Прежде всего, представляло интерес уточнить наши представления о начале и об окончании фазовых переходов белка и соли по инкременту температуры. С другой стороны, данные синхронных измерений трех показателей должны способствовать лучшему пониманию физики процесса высыхания капля.

## 1. Методы и материалы

### 1.1. Метод и устройство для регистрации динамики АМИ

Подробное описание метода и устройства дано в [23]. Принцип метода состоит в регистрации комплексной электрической проводимости резонатора, нагруженного каплей исследуемой жидкости, в режиме сдвиговых колебаний. Частота колебаний резонатора при измерении принудительно поддерживается на резонансной частоте ненагруженного резонатора (60 kHz). В процессе регистрации измеряемый сигнал автоматически пересчитывается в АМИ, результат выводится на экран в режиме реального времени в виде кривой. Форма кривой отражает динамику интегральных механических свойств сохнувшей капли.

### 1.2. Лабораторная установка для регистрации динамики массы капли

Общий вид установки приведен на рис. 1. Капля помещается на тонкую стеклянную подложку, закрепленную на упругой тонкой проволоке длиной 12 см. Один конец проволоки закреплен на массивном основании, а к другому приклеен лист бумаги ( $1.5 \times 1.5$  см), играющий роль пассивного отражателя. Антенна ультразвукового лоатора расположена под отражателем и регистрирует его перемещения. Выходной сигнал лоатора пропорционален расстоянию между лоатором и отражателем.

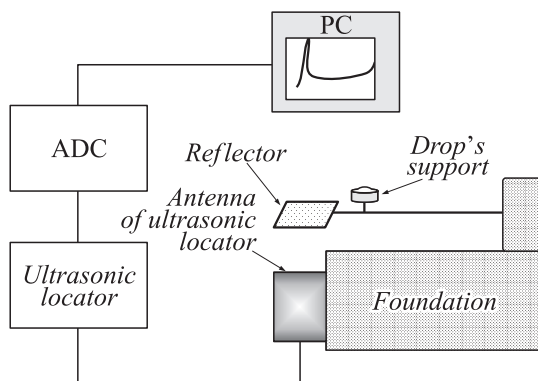


Рис. 1. Схема лабораторной установки для измерения динамики массы капли в процессе высыхания.

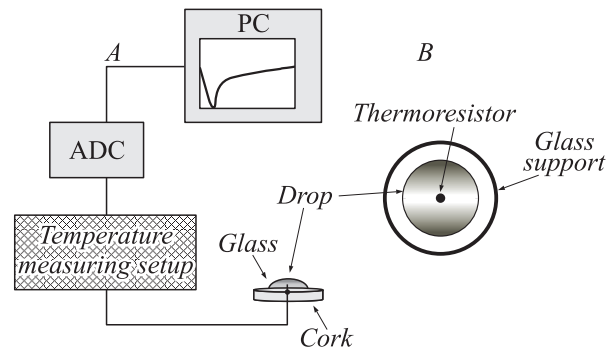


Рис. 2. Схема устройства для измерения динамики температуры капли в процессе высыхания. А — измерительная схема; В — измерительный модуль, вид сверху.

Сигнал поступает в компьютер через АЦП и отображается на экране.

### 1.3. Лабораторная установка для регистрации динамики температуры капли

Капля исследуемой жидкости помещается на круглую подложку (рис. 2), состоящую из двух слоев: верхнего, представляющего собой стеклянную пластинку (толщиной 0.2 мм), и нижнего — пробкового (7 мм толщины). Пробка используется в качестве термоизолятора. Терморезистор ST1-18 (диаметром 0.3 мм и массой 0.003 г,  $\tau \leq 1$  s) размещен непосредственно под слоем стекла в центре подложки и включен в измерительную сеть постоянного тока. Выходное напряжение измерительной цепи, пропорциональное температуре датчика, через АЦП поступает в компьютер и отражается на экране.

### 1.4. Оптическая микроскопия

Морфологические наблюдения высыхающих капля проводились с помощью микроскопа МБС-10 и цифровой фотокамеры „Canon“ через окуляр при суммарном увеличении  $\times 28$ .

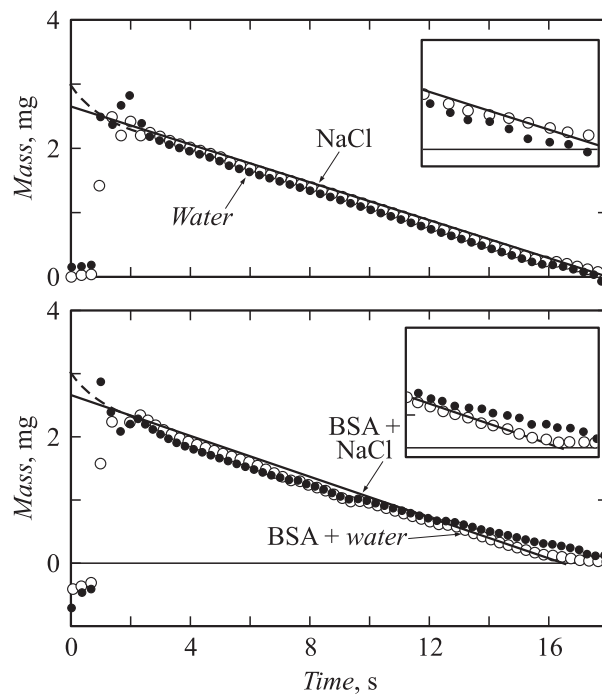
### 1.5. Материалы

Для исследования были использованы дистиллированная вода, 0.9 wt.% NaCl водный раствор (физиологический солевой раствор), 7 wt.% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в дистиллированной воде или физиологическом солевом растворе. Были использованы BSA (68 kDa, Sigma, USA) и NaCl марки „химически чистый“ (Reaktiv, Inc., Russia). Все растворы были приготовлены за 1–3 дня до экспериментов, хранились в холодильнике при температуре 4°C и согревались до комнатной температуры (21–22°C) перед процедурой измерения. Все эксперименты проводились при одинаковых внешних условиях.

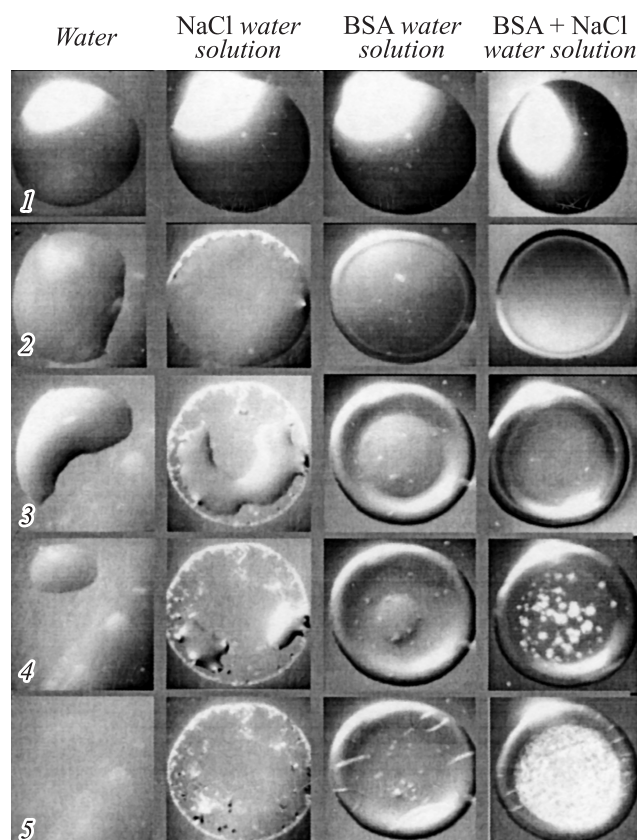
## 2. Результаты и обсуждение

В самом начале высыхания капли исследуемых жидкостей выглядят одинаково (рис. 3, ряд 1). Финальные картины каплей (после испарения свободной воды) показаны на нижней строке того же рисунка.

Типичная динамика массы высыхающих капель исходным объемом  $3 \mu\text{l}$  представлена на рис. 4. Процесс высыхания в основном демонстрирует линейную зависимость массы капли от времени. Интересно, что начальный период высыхания, который не удалось зарегистрировать благодаря времени установления отражателя после возмущения, вызванного размещением капли, должен быть нелинейным, поскольку исходная масса капли не может быть меньше  $3 \text{ mg}$ . Предполагается, что более высокая скорость испарения в этот период связана с формированием слоя насыщенного пара над каплей, который замедляет испарение [5]. После формирования этого слоя интенсивность испарения, контролируемая диффузией, снижается и достигает постоянного значения, становясь линейной. В конце высыхания растворы также демонстрируют отклонение от линейной зависимости (рис. 4). Подобное отклонение впервые было выявлено при высыхании суспензии коллоидных частиц в работе [2]. Картинки высыхающих каплей (рис. 3, ряды 3–5) демонстрируют разные условия, ведущие к разным уровням испарения в каплях исследуемых



**Рис. 4.** Изменение массы высыхающих капель исходным объемом  $3 \mu\text{l}$ . Начальные данные не отображены из-за времени установки отражателя после возмущения, вызванного размещением капли на подложке. Сплошная кривая продолжает линейный участок на момент начала измерения. Пунктиром обозначен предполагаемый нелинейный участок изменения массы в начале высыхания. На вставках показаны финальные участки соответствующих кривых при большем увеличении.

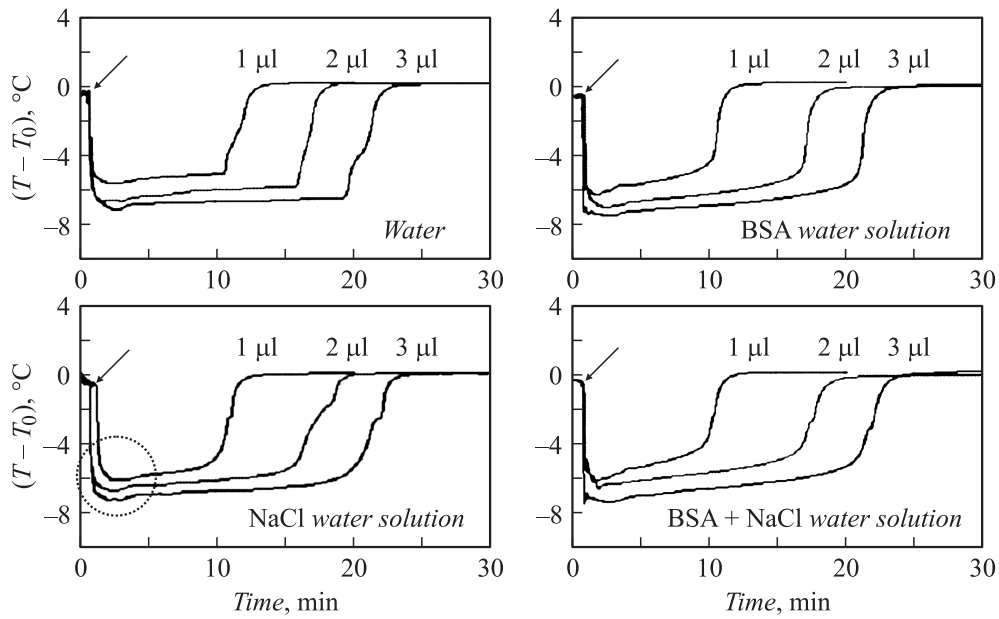


**Рис. 3.** Морфологическая эволюция высыхающих каплей исследуемых жидкостей (ряды 1–5).

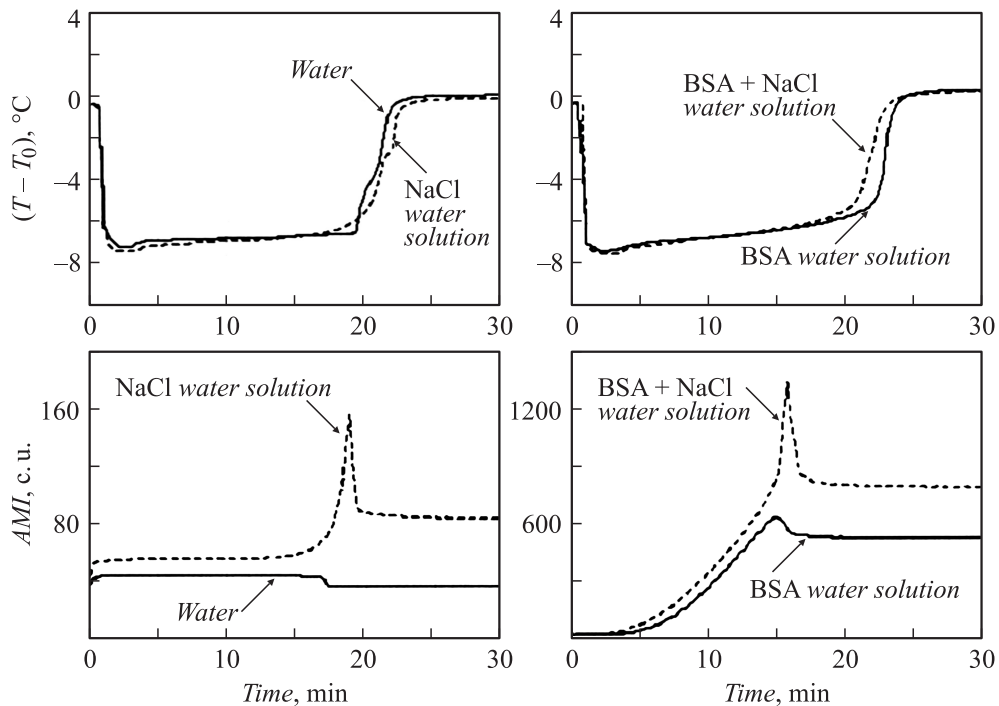
жидкостей. Геометрическая форма каплей, вязкости и плотность отвердевающей массы являются важными факторами, лимитирующими испарение воды в конце высыхания [24,25].

Температурные кривые высыхающих каплей жидкостей разного состава и массы имеют черты сходства и различия (рис. 5). Кривая температуры капли воды после помещения ее на датчик испытывает резкий спад, затем относительную стабилизацию и возвращение к исходному уровню через резкий переход от стабильного к восходящему участку. Кривые температуры высыхающих каплей растворов различного состава после начального снижения имеют слегка восходящий участок, плавно переходящий в крутой подъем. Сравнив начальные изменения температуры (рис. 5) и массы (рис. 4), можно заметить совпадение расположения нелинейных участков на соответствующих кривых. Это согласуется с предположением о формировании слоя насыщенного пара над поверхностью капли в этот период.

На рис. 6 показаны типичные экспериментальные кривые динамики температуры и АМИ в процессе высыхания каплей. Видно, что динамика механических свойств (АМИ) более выразительна и демонстрирует большие различия для жидкостей разного состава, чем динамика температуры, регистрируемая данным методом.



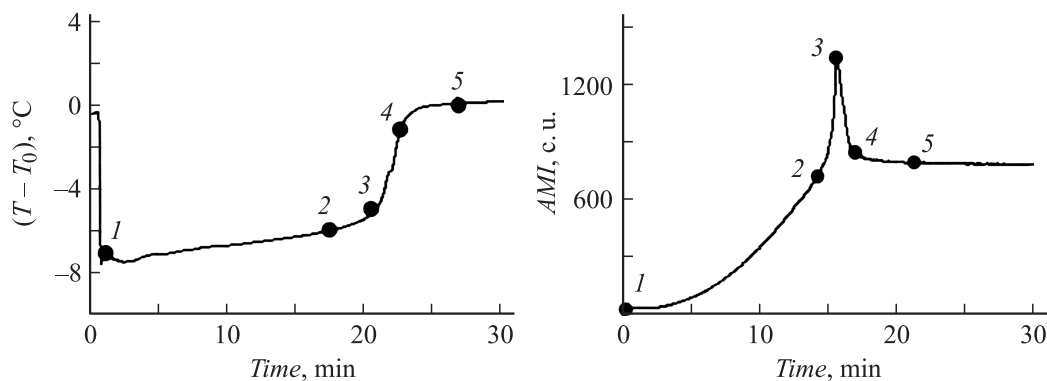
**Рис. 5.** Изменение температуры высыхающих капель исследуемых жидкостей при разном исходном объеме. Стрелки указывают момент помещения капли на подложку. Кругом обозначен участок, соответствующий времени формирования слоя насыщенного пара над поверхностью капли.



**Рис. 6.** Сравнение динамики температуры (верхние рисунки) и АМИ (нижние рисунки) в процессе высыхания капель исследуемых жидкостей при исходном объеме  $3 \mu\text{l}$ .

Визуальные наблюдения позволяют определять фазовые переходы белка и соли в каплях водных растворов BSA + NaCl в процессе испарения воды. Различные периоды высыхания отмечены на рис. 7. На поверхности сенсора капли высыхают несколько быстрее, чем на стекле, поскольку благодаря возвратно-поступательным

колебаниям кварца эти капли приобретают слегка овальную форму с большей испаряющей поверхностью. Тем не менее эти капли сохраняют такие же концентрические зоны и ту же морфологическую структуру, что и капли, высохшие на стеклянной подложке. Так, точка 1 (рис. 7) соответствует картинкам ряда 1 (рис. 3); от



**Рис. 7.** Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях водных растворов BSA + NaCl в соответствии с визуальным наблюдением: 1 — начало высыхания; 1–2 — конденсация и гелеобразование альбумина; 2–3 — кристаллизация соли; 3–4 — испарение остатков свободной воды; 5 — достижение равновесия.

точки 1 до точки 2 (рис. 7) идет конденсация альбумина и гелеобразование; от точки 2 до точки 3 происходит кристаллизация соли в гелевом матриксе (рис. 3, ряды 3–4); время, ограниченное точками 3–4 (рис. 7), соответствует испарению остатков свободной воды и установлению равновесия (рис. 3, ряды 3–4).

Для получения количественных различий в динамике температуры при высыхании капель жидкостей разного состава были введены два параметра, характеризующие производную температурной кривой на участках гелеобразования альбумина и кристаллизации соли. Формальная процедура вычисления этих параметров состояла в следующем.

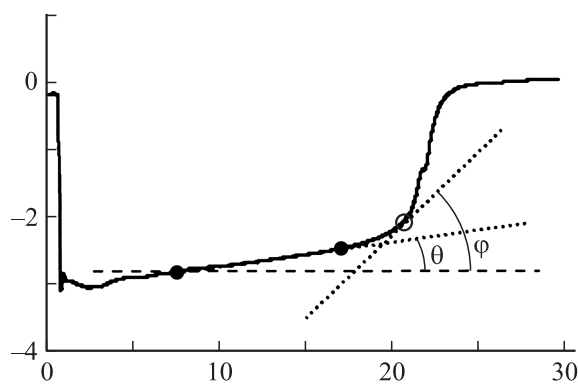
На этапе гелеобразования была выделена прямолинейная часть температурной кривой — отрезок между двумя черными кружочками (рис. 8). Параметр 1 численно равен тангенсу угла наклона этого прямолинейного отрезка к абсциссе ( $\text{tg } \theta$ ).

На этапе кристаллизации соли был выделен участок температурной кривой, на котором производная возрастала от значения  $\text{tg } \theta$  до фиксированного значения  $\text{tg } \varphi = 0.3$  (между черным и светлым кружочками на рис. 8). Выделенный участок разбивался на 100 интервалов равной продолжительности, в начальной точке каждого интервала вычислялось значение производной. Параметр 2 численно равен среднему арифметическому значений полученных производных. Эта процедура была применена ко всем температурным кривым исследуемых жидкостей. На рис. 9 показаны результаты обработки кривых с помощью данного алгоритма. В действительности оценивалась температура системы „капля + стеклянная подложка“ при их теплообмене с окружающей средой. Полный анализ термодинамики такой системы довольно сложен. Тем не менее можно выделить главные факторы, ответственные за изменение температуры.

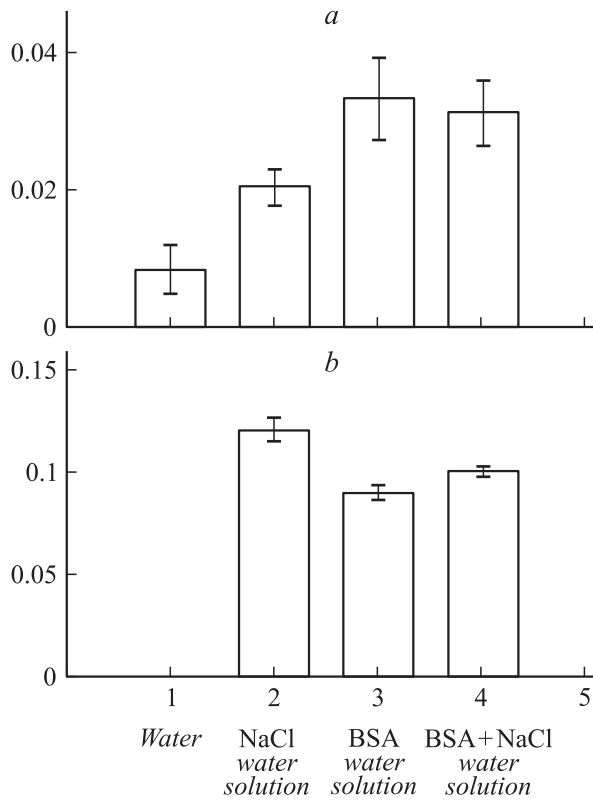
До эксперимента подложка имела комнатную температуру ( $T_0$ ). После помещения капли на подложку система резко охлаждалась за счет теплоты испарения

воды. При нормальном давлении (1 atm) эта теплота составляет 2260 kJ/kg, или 6.78 J/3  $\mu\text{l}$ . Наибольшая интенсивность охлаждения системы соответствовала первым двум минутам после помещения капли на подложку, когда слой насыщенного пара на границе жидкость–воздух еще не был сформирован. В этот период капля теряла около 0.7 mg, т.е. приблизительно 25% своей исходной массы. Таким образом, средняя скорость испарения воды в начальный момент высыхания капли составляла 0.35 mg/min. Затем скорость испарения снижалась и становилась линейной, составляя приблизительно 0.14 mg/min (рис. 4).

На рис. 5 видно, что наклон линейного участка кривой к абсциссе у разных жидкостей различен (величина параметра 1). Вода имеет наименьший уровень наклона данного участка. Это, по-видимому, связано с уменьшением площади испаряющей поверхности капли (рис. 3, ряды 1–5) и, следовательно, с уменьшением влияния теплоты испарения воды на теплообмен с окружающей



**Рис. 8.** Схема расчета параметров 1 и 2, характеризующих динамику температуры высыхающих капель. Параметр 1 равен величине  $\text{tg } \theta$  линейного участка кривой на этапе гелеобразования. Параметр 2 — среднее арифметическое от значений производной в точках выделенного участка кривой (между светлым и темным кружочками), где производная возрастает от  $\text{tg } \theta$  до заданного значения  $\text{tg } \varphi = 0.3$ .



**Рис. 9.** Значения расчетных параметров 1 (a) и 2 (b) для исследуемых жидкостей (см. текст).

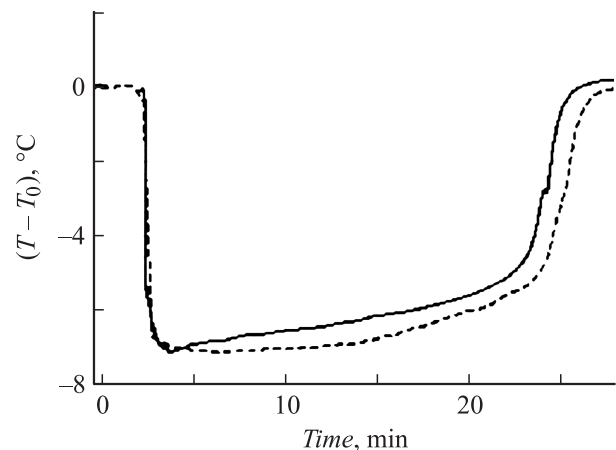
средой. Таким образом, система „капля + подложка“ после резкого охлаждения медленно согревалась за счет теплообмена с окружающим воздухом. При высыхании капля физиологического солевого раствора параметр 1 более чем вдвое превышал соответствующий показатель для капель воды (рис. 9). Учитывая одинаковую скорость испарения воды в этих растворах (рис. 4), можно предположить, что это связано с образованием зародышевых центров кристаллизации — процесса экзотермического. Растворы альбумина (как содержащие, так и не содержащие соль) имели наибольшее значение параметра 1. Эта часть кривых соответствовала времени образования нижнего адсорбционного слоя белка на подложке. Известно, что адгезия и гелеобразование также являются экзотермическими процессами, т.е. в процессе увеличения массы подложки за счет отложений белка система „капля + подложка“ согревается быстрее, чем капли физиологического раствора за то же время. Это свидетельствует о том, что вклад экзотермических процессов (адгезии и гелеобразования) превышает эндотермические (испарение воды), и теплота фазовых переходов альбумина превышает теплоту зародышевого кристаллообразования в физиологическом растворе NaCl.

Параметр 2 (рис. 9), соответствующий времени распространения видимой глазом волны кристаллизации соли, отсутствовал в воде, имел наибольшее значение в физиологическом растворе и был выше в растворе BSA,

содержащем соль, по сравнению с не содержащим соли раствором BSA. Учитывая тот факт, что кристаллизация соли в растворе альбумина происходит внутри ранее образованного геля (рис. 3, ряды 3–5), становится понятно, почему теплота кристаллизации соли имеет небольшой, но достоверный эффект. Ненулевое значение параметра 2 для раствора BSA, не содержащего соли, связано с процессами, описанными для параметра 1.

Для проверки предположений о вкладе теплоты фазовых переходов в изменение общей температуры системы „капля + подложка“ в процессе высыхания капли, был проведен дополнительный эксперимент. После проведения измерений температуры при высыхании  $3 \mu\text{l}$  капли водного раствора BSA + NaCl к высохшим остаткам капли добавили  $3 \mu\text{l}$  воды комнатной температуры, и измерения динамики температуры провели повторно. Эксперимент повторили 10 раз. Во всех случаях предварительное растворение остатков капли приводило к более значительному снижению температуры при ее повторном высыхании (рис. 10). Таким образом, был продемонстрирован вклад эндотермического процесса растворения компонентов в общую динамику температуры рассматриваемой системы.

Рассмотрена динамика морфологии, массы, температуры и интегральных механических свойств высыхающих капель модельных биологических жидкостей. Показано, что изменение массы высыхающих капель аппроксимируется наклонной прямой, имеющей два небольших нелинейных участка — в начале и в конце высыхания. Ранний нелинейный участок связан с более интенсивным испарением, когда слой насыщенного пара над поверхностью капли еще не сформирован. Раннему нелинейному участку соответствует также более интенсивное снижение температуры, которое становится менее интенсивным и стабилизируется по мере формирования слоя



**Рис. 10.** Динамика температуры высыхающих капель водных растворов BSA + NaCl при исходном объеме  $3 \mu\text{l}$  (сплошная кривая). Пунктиром показана динамика температуры после добавления к сухим остаткам дополнительно  $3 \mu\text{l}$  дистиллированной воды комнатной температуры и повторного высушивания капли.

насыщенного пара над каплей. Поздний нелинейный участок образуется благодаря замедлению диффузии воды через отвердевающие компоненты раствора. Чистая вода не имеет позднего нелинейного участка. Динамика температуры высыхающих капель определяется суммой эндотермических (испарение воды) и экзотермических (кристаллизация соли, гелеобразование) фазовых переходов. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях изменяет их механические свойства, что может быть выявлено методом акустической импедансометрии.

Авторы надеются, что данное исследование будет полезно при дальнейшем комплексном изучении феномена самоорганизации высыхающих капель многокомпонентных жидкостей.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов по программе ОФН РАН „Фундаментальные проблемы нелинейной динамики“ и АФГИР RMA 10214-BNL-36943.

## Список литературы

- [1] Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A. // *Phys. Rev. E*. 2000. Vol. 62. N 1. P. 756.
- [2] Deegan R.D. // *Phys. Rev. E*. 2000. Vol. 61. N 1. P. 475.
- [3] Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A. // *Nature (London)*. 1997. Vol. 389. P. 827.
- [4] Tarasevich Yu.Yu., Pravoslavnova D.M. // *Eur. Phys. J. E*. 2007. Vol. 22. P. 311.
- [5] Popov Yu.O. // *Phys. Rev. E*. 2005. Vol. 71. P. 036313.
- [6] Pauchard L., Parisse F., Allain C. // *Phys. Rev. E*. 1999. Vol. 59. P. 3737.
- [7] Annarelli C., Fornazero J., Bert J., Colombani J. // *Eur. Phys. J. E*. 2001. Vol. 5. P. 599.
- [8] Раниц Е.Г. // *Бюллетень офтальмологии*. 1976. Т. 4. С. 62.
- [9] Савина Л.В. Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека. Краснодар: Советская Кубань, 1999. 79 с.
- [10] Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001. 300 с.
- [11] Killeen A.A., Ossina N., McGlennen R.C., Minnerath S., Borgos J., Alexandrov V., Sarvazyan A. // *Mol. Diag. Ther.* 2006. Vol. 10. N 6. P. 371.
- [12] Yakhno T. // *J. Colloid Interf. Sci.* 2008. Vol. 318. P. 225.
- [13] Яхно Т.А., Яхно В.Г. // *ЖТФ*. 2009. Т. 79. Вып. 8. С. 133.
- [14] Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., Pelyushenko A.S. // *Proc. SPIE*. 2003. Vol. 5119. P. 87.
- [15] Yakhno T., Sanin A., Pelyushenko A., Kazakov V., Shaposhnikova O., Chernov A., Yakhno V., Vacca C., Falcone F., Johnson B. // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 22. N 9–10. P. 2127.
- [16] Yakhno T., Sanin A., Yakhno V., Pelyushenko A., Egorova N.A., Terentiev I.G., Smetanina, S.V., Korochkina O.V., Yashukova E.V. // *IEEE Eng. Med. Biol.* 2005. Vol. 24. N 2. P. 96.
- [17] Yakhno T., Sanin A., Yakhno V., Pelyushenko A., Dowell M., Vacca C., and Goutorova V. // *Proc. SPIE*. 2005. Vol. 5692. P. 188.

- [18] Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., Pelyushenko A.S. // *Nonlinear Dynam.* 2005. Vol. 39. P. 369.
- [19] Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. // *ЖТФ*. 2004. Т. 49. Вып. 8. С. 1055.
- [20] Yakhno T., Yakhno V., Sanin A., Sanina O., Pelyushenko A., Usvatov V., Kutyaikin V., and Tsumanets N. // *Proc. Euro Food Chem XII. Strategies for safe food*. Brugge, Belgium, 2003. Vol. 1. N 1. P. 342.
- [21] Яхно Т.А., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Тихомиров Д.А., Яхно В.Г. // *Сб. мат. VI Межд. конф. „Вода, напитки и соки“* М., 2005. С. 66.
- [22] Санина О.А., Шапошникова О.Б., Санин А.Г., Яхно Т.А., Яхно В.Г. // *Тез. докл. межд. конф. „Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий техники и медицины“*. Иваново. 2008. С. 236.
- [23] Яхно Т.А., Санин А.Г., Vacca C.V., Falcione F., Санина О.А., Казаков В.В., Яхно В.Г. // *ЖТФ*. 2009. Т. 79. Вып. 10. С. 22.
- [24] Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. // *ЖТФ*. 2007. Т. 77. Вып. 4. С. 119.
- [25] Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. // *ЖТФ*. 2007. Т. 77. Вып. 4. С. 123.