

ЭЛЕКТРОННЫЙ КОМПЛЕКС ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОГО АНАЛИЗА С ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ АМИНОКИСЛОТ

Н.В. МАСОЛОВА, Е.Н. МУЗЫКА, Н.Н. РОЖИЦКИЙ

Разработан электронный комплекс для детектирования аминокислот в жидких пробах, поддерживающий режим проточно-инжекционного анализа. В качестве методики детектирования используется электрохемилюминесцентный метод анализа. Достоинства предлагаемого комплекса заключаются в экономии реагента, экспрессности и низком пределе обнаружения метода, возможности автоматизации всего процесса и использовании его в массовом анализе.

An electron complex for detecting amino acids in liquid samples which maintains the mode of flow-injection analysis is developed. The electrochemiluminescent method of analysis is used as a detection technique. The advantages of the complex suggested consist in saving of a reagent, expressness and low limit of detection, scope for automatization of the whole process and its use in mass analysis.

Количественное содержание аминокислот (АМК) является диагностическим показателем состояния здоровья человека. Так, в неонатологии актуальным является анализ концентрации фенилаланина, что при своевременном выявлении нарушения его обмена позволяет снизить детскую инвалидность; в [1] отмечается рост ряда форм заболеваний легких на протяжении 10 лет после Чернобыльской аварии, которые сопровождаются изменением содержания свободных аминокислот в сыворотке крови, что позволяет диагностировать наличие пневмонии, экссудативного плеврита (возрастает в 3–5 раз содержание глутаминовой кислоты, глицина, аланина, валина, цистеина), плазма крови больных с активными формами туберкулеза легких характеризуется изменением в 2–3 раза величин концентраций метионина, лейцина, аргинина и гистидина.

Отсюда видно, что анализ АМК является достаточно информативным, а следовательно, и необходимым в медицинской практике для диагностики ряда заболеваний. Среди способов определения концентрации АМК известны способы определения в пробирках [2, 3]. Однако они обладают существенными недостатками: работа с сывороткой или с большим количеством исследуемой крови, высушенной на бумаге; трудоемкость; малая производительность; использование крупногабаритного и дорогостоящего оборудования. Концентрацию АМК также определяют, проводя реакцию в многолунном микропланшете с последующим измерением флуоресцентных сигналов в течение 1 мин. В этом случае: 1 – необходимо дополнительно проводить автоклавирование бланков с кровью, что требует комплектации лаборатории автоклавом; 2 – при переносе элюата из лунок одного микропланшета в соответствующие лунки другого существует дополнительная возможность возникновения ошибки; 3 – для анализа используются большие количества реагента.

Как видно из вышесказанного, существует потребность в современном аналитическом оборудовании для детектирования АМК. Из данной проблемы вытекает цель работы и постановка задачи.

Целью данной работы является разработка электронного комплекса (ЭК) для проведения проточно-ин-

жекционного анализа (ПИА) с электрохемилюминесцентным (ЭХЛ) детектированием аминокислот.

Постановка задачи в данном случае заключается в необходимости построения устройства для детектирования АМК, отсюда вытекают и исходные данные. Устройство должно обладать: 1 – высокой чувствительностью к изменению концентрации исследуемого объекта (в данном случае АМК); 2 – высокой скоростью анализа; 3 – работа с малыми объемами; 4 – возможность управления процессом анализа при помощи ЭВМ.

Для решения данной задачи необходимо определиться с методом анализа. Он должен удовлетворять всем пунктам постановки задачи. В литературе описано более 20 различных аналитических методов, при этом для анализа АМК используют спектрометрические, химические, электрохимические, в частности электрохемилюминесцентные методы. В последнее время ЭХЛ-метод все чаще используется для анализа в медицине, биологии, фармакологии, сельском хозяйстве, экологии с целью определения ряда веществ: белков, углеводов, АМК, канцерогенных веществ и др.). Отметим, что содержание АМК в биопробах мало и составляет микромоли на литр, по этому параметру ЭХЛ-метод, имея низкий предел обнаружения (до 10^{-15} моль/л), удовлетворяет 1-му пункту постановки задачи. Переходя ко второму пункту, отметим, что ЭХЛ-процесс относится к медленным, поэтому и скорость анализа будет зависеть от длительности метода, что снимает вопрос быстрого действия аппаратуры. Решая 3-ий пункт задачи, рассмотрим подробнее ячейку, где непосредственно протекает ЭХЛ-процесс. Подробно ЭХЛ-ячейка как часть оптохемотронного (ОХ) сенсора рассмотрена в [4, 5], поэтому здесь отметим лишь ее структурные особенности: реагент зафиксирован на электроде сенсора, что позволяет снизить его расход, а высокая чувствительность метода позволяет работать с малыми объемами исследуемого вещества (объем ЭХЛ-ячейки составляет 5 мкм). Требование 5-го пункта в настоящее время общее для всех измерительных устройств, так как позволяет упростить эксплуатацию, ускорить анализ и повысить его точность, исключить человеческий фактор. Данный вопрос успешно решается и

в случае ЭХЛ-анализа, причем автоматизации подвергается не только измерительный процесс, но и процесс доставки исследуемой пробы в ЭХЛ-ячейку. Для доставки пробы к месту измерения выбран метод проточной инъекции, где управлению подвергается не только ввод/вывод пробы в/из измерительной ячейки, но и скорость прокачки раствора. Проточно-инжекционные системы различаются в зависимости от метода детектирования [6, 7]. Семьдесят процентов работ по ПИА выполнено при использовании спектрометрического детектирования. В последнее время ПИА часто используется с электрохимическими методами, в том числе и ЭХЛ [6]. Привлекательны основы принципов ПИА: 1 – введение образца в ламинарный поток носителя (буфера); 2 – стабильное движение зоны образца в системе, сопровождающееся протеканием различ-

ных физико-химических процессов (смешивание, химическое взаимодействие, диализ, экстракция и т. д.); 3 – контроль дисперсии (размывания и разбавления) введенного образца в процесс транспорта его через систему, определяемой схемой, геометрическими и гидродинамическими параметрами; 4 – постоянство пребывания образца в системе; 5 – непрерывное измерение некоторой физической величины и детектирование переходного аналитического сигнала.

Таким образом, вырисовывается общая картина решения поставленной задачи: обоснован выбор ЭХЛ-метода в сочетании с ПИА, поэтому ЭК в данном случае можно представить как рис. 1.

Из рис. 1 видно, что ЭК состоит из следующих основных устройств: устройства управления (УУ), измерительной ЭХЛ-ячейки, потенциостата (ПТ),

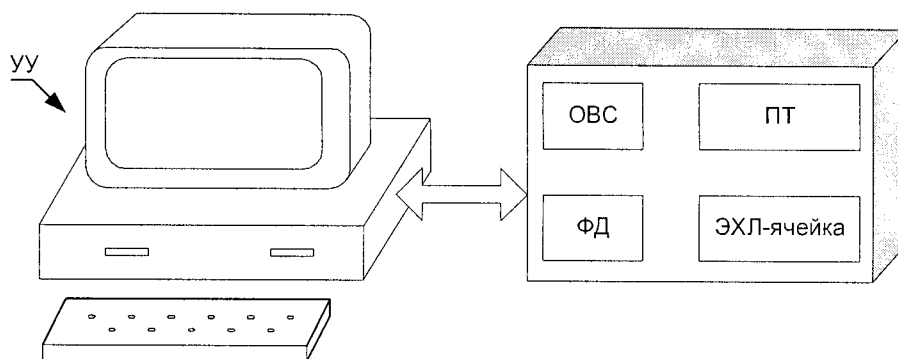


Рис. 1. Аппарат для проведения ЭХЛ-измерений в режиме ПИА

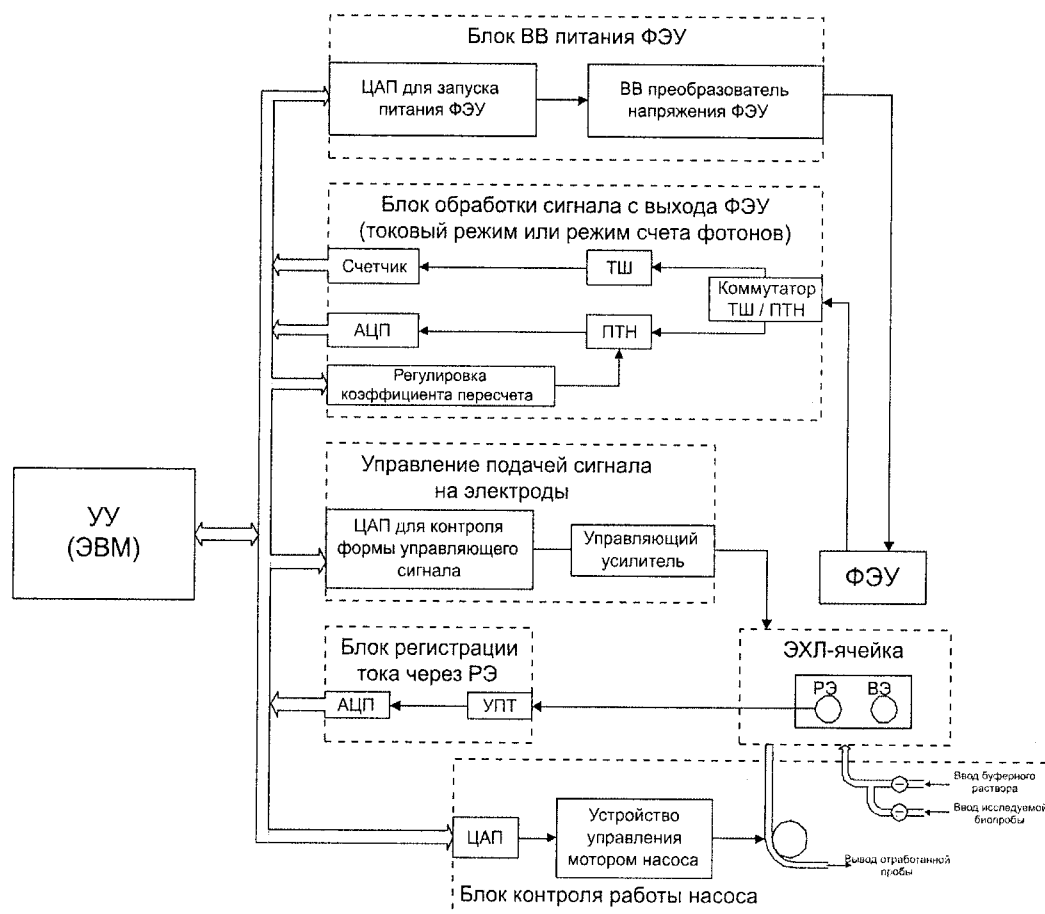


Рис. 2. Схема системы ЭХЛ-детектирования в режиме ПИА

фотодетектора (ФД), обработки выходного сигнала с ФД (ОВС). УУ включает компьютерное управление в виде ПК, драйверы и клавиатуру, оно соединяется с остальными устройствами в обоих направлениях по средствам интерфейса RS232.

Схематично реализацию ЭК отображает рис. 2. Здесь работа каждого блока контролируется с помощью УУ. Так, для закачки пробы в систему детектирования с ЭВМ поступает сигнал, запускающий мотор насоса через устройство управления мотором насоса, которое устанавливает фиксированную скорость прокачки жидкости через измерительную ЭХЛ-ячейку.

Для запуска ЭХЛ-процесса на электроды РЭ, ВЭ (рабочий и вспомогательный соответственно) подается управляющий сигнал через схему контроля формы запускающего сигнала, где определяются его параметры.

ЦАП контроля формы управляющего сигнала имеет 4 внутренних регистра, посредством которых задаются: паузы t_1 и t_3 , длительности импульсов t_2 и t_4 (рис. 3). Поскольку различные вещества имеют свои значения потенциалов окисления и восстановления ($j_{ок}$, $j_{вос}$), то в ЭК предусматривается возможность их изменения.

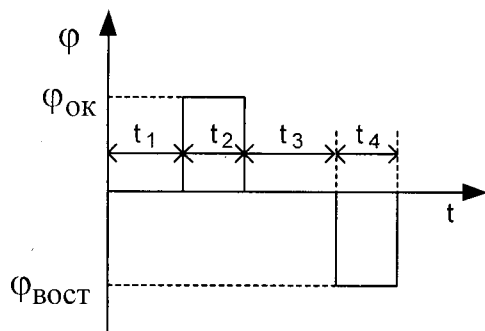


Рис. 3. Управляющий сигнал

Для запуска цепи регистрации аналитического сигнала (интенсивности $I_{ЭХЛ}$), в данном случае ФЭУ, с УУ на высоковольтный преобразователь напряжения ФЭУ подается сигнал запуска питания ФЭУ.

Сигнал с выхода ФЭУ поступает через коммутатор ТШ/ПТН на устройство преобразования. В цепи ТШ реализован режим регистрации малых интенсивностей, т. е. режим счета фотонов. Счетчик ведет подсчет числа фотонов с выхода ФЭУ по импульсу, поступающему с ТШ (одному фотону соответствует один импульс). Токковый режим регистрации аналитического сигнала с ФЭУ реализуется при помощи преобразователя тока-напряжение (ПТН) с дальнейшей оцифровкой и обработкой сигнала на ЭВМ. Через УУ осуществляется регулировка коэффициента пересчета в ПТН.

Так как интенсивность свечения не единственный информационный сигнал в ЭХЛ-исследованиях, то в аппарат рис. 1 включен блок регистрации тока через РЭ. Этот сигнал проходит через усилитель постоянного тока (УПТ) и после оцифровки обрабатывается в УУ.

В результате данной работы разработан ЭК для детектирования АМК в жидких пробах. Данный комплекс поддерживает принцип ПИА с ЭХЛ-детектиро-

ванием. Преимуществом использования ПИА в данной работе является высокая производительность, достоверность получаемой информации (за счет закрытости системы, что сводит к минимуму воздействие факторов внешней среды). Особенностью данного ЭК являются: работа ФЭУ в двух режимах (токовом и счета фотонов); использование ОХ-сенсора с модифицированным электродом; автоматизация процесса анализа; наличие двух информационных каналов (фотодетектирование и контроль тока через РЭ), что повышает достоверность полученных результатов.

Литература. 1. С. Гараева, Г. Редкозубова, А. Буздуган, В. Дьюгостран. Заболевания легких и их диагностика при помощи аминокислотного анализа // 2-я Междунар. конф.: Отдаленные медицинские последствия Чернобыльской катастрофы. Киев. 1998. С. 208. 2. McCaman M.W., Robins E. Fluorimetric method for determination of phenylalanine in serum // J. Lab. Clin. Med. 1962. Vol. 59. P. 885–890. 3. Hill J.B., Summert G.K., Pender M.W., Roszel N.O. An automated procedure for blood phenylalanine // Clin. Chem. 1987. Vol. 33. P. 1152–1154. 4. Н.В. Масолова. Система анализа биожидкости с использованием ЭХЛ-сенсора // Сб. научных трудов по материалам 1-го Международного радиоэлектронного Форума: «Прикладная радиоэлектроника. Состояние и перспективы развития» МРФ-2002. Ч. 2. С. 631–633. 5. Н.В. Масолова, Н.Н. Рожницкий. Перспективы использования модифицированных электродов для создания аналитических датчиков ОХ-сенсоров // Новые технологии, 2003. № 3. С. 74–78. 6. Kunihito Hayakawa, Yasuhiro Yoneda, Yasuaki Okamoto, Takahiro Kumamaru, Masahiko Ikeda Rapid determination of oil in water using flow injection analysis and IR detection // Analytical Sciences. 1999. Vol. 15. P. 803–805. 7. Robert J. Forster, Conor F. Hogan Electrochemiluminescent metallopolymer coatings: combined light and current detection in flow injection analysis // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. №72. P. 5576–5582.

Поступила в редколлегию 18.12.03 г.



Масолова Наталья Витальевна, аспирант кафедры биомедицинской электроники ХНУРЭ. Область научных интересов: биомедицинская электроника, люминесценция, электрохемилюминесценция.



Музыка Екатерина Николаевна, студент 5-го курса специальности «Биотехнические медицинские аппараты и системы» ХНУРЭ. Область научных интересов: биомедицинская электроника, люминесценция, электрохемилюминесценция.



Рожицкий Николай Николаевич, доктор физ.-мат. наук, проф. кафедры биомедицинской электроники ХНУРЭ. Область научных интересов: биомедицинская электроника, люминесценция, электрохемилюминесценция, биофизика, биомеханика, квантовая химия.