

## ОЦІНКА ТОПОЛОГІЇ СЕПАРАЦІЙНОГО КАНАЛУ МІКРОФЛЮЇДНОЇ ЕЛЕКТРОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ЕФЕКТИВНОГО РОЗДІЛЕННЯ АМІНОКИСЛОТ

### Вступ

Визначення амінокислот (АМК) триптофану, тирозину, проліну, метіоніну у крові та сечі є актуальним завданням сучасної медицини. Однак аналіз зразків біологічного походження на вміст АМК практично не можливий без їх попереднього фракціонування. Сепарація підвищує чутливість та надійність наступного аналітичного вимірювання. До одних із найсучасніших і найперспективніших методів фракціонування відноситься капілярний електрофорез (КЕФ), що увібрав у себе всі кращі якості хроматографічних методів і електрофорезу [1]. Особливу увагу привертає його реалізація на чипі [2].

Ефективність проведення КЕФ на чипі суттєво залежить від низки параметрів: топології (геометрії та розмірів) сепараційного каналу, прикладеної напруги та показника кислотності середовища фракціонування і є індивідуальною для кожного аналіта. Це робить актуальним проведення математичного моделювання фракціонування АМК для вибору оптимальних параметрів, зазначених вище, ще до етапу конструкторсько-технологічних та експериментальних робіт із виготовлення мікрофлюїдного чіпу (МФЧ).

Інтерпретації поведінки пробки при проходженні в каналах мікросистем із точки зору математичного моделювання присвячено низку робіт [3-5]. В основному розглядався електрокінетичний рух пробки в каналі круглого перерізу, що пояснюється частим використанням довгого кварцового капіляру для проведення КЕФ, у тому числі в сучасних електрохемилюмінесцентних (ЕХЛ) системах [6-7].

У даній роботі розглянуто випадок реалізації КЕФ і ЕХЛ на МФЧ з поліметилметаакрилату (ПММА) з прямим транспортно-сепараційним каналом трапцеподібного перерізу шириною 200 мкм. Це зумовлено наявністю технологій мікротоворення (лазерної абляції) та прагненням адаптації на мікрочипі ЕХЛ-методу, з урахуванням робіт [8-9].

**Мета роботи** полягає в виборі топології сепараційного каналу для адекватного для фракціонування пробки з АМК (триптофаном (Trp), тирозином (Tyr), проліном (Pro), метіоніном (Met)) шляхом математичного моделювання електрокінетичного руху пробки, що мігрує в буферному розчині в прямому сепараційному каналі МФЧ з наступним ЕХЛ-детектуванням. Для цього необхідно вирішити такі задачі: розглянути базові теоретичні положення, що стосуються електрокінетичного руху пробки при КЕФ та фізико-хімічних властивостей АМК важливих при КЕФ, розробити математичну модель електрокінетичного руху пробки в транспортно-сепараційному каналі мікрофлюїдної системи з чип-реалізацією КЕФ і ЕХЛ за напруг 1 кВ і 2кВ, довжин 2 і 5 см рН 4 та рН 7, обґрунтувати граничні умови, провести чисельне моделювання розподілу АМК вздовж зони пробки, інтерпретувати отримані результати.

### Теоретична частина

КЕФ – електроміграційний метод розділення, що базується на відмінності в електрофоретичній рухливості часток речовини, які переміщуються в електричному полі [1].

При застосуванні КЕФ канали мікрочіпу заповнюються буфером, а пробу завантажують і транспортують по каналу електрокінетичним способом. У системі діє механізм розділення пробки на зони, що супроводжується їх розширенням (дисперсією) по мірі руху вздовж каналу [1]. При КЕФ, значення рН та напруженості поля у всьому просторі каналу залишаються постійними. Призначення буфера при цьому методі розділення – підтримання постійного значення рН та забезпечення транспортного потоку. Значення рН буфера визначає заряд іонів АМК в пробі – в сильноокислій області існують переважно катіони, в сильнолужній – аніони. КЕФ АМК відбувається за наступною схемою: аніонні або катіонні форми АМК ру-

хаються в напрямку відповідного електрода, цвіттер-іони не рухаються. Підбираючи відповідні буферні системи, можна розділяти будь-які АМК.

### Математична модель електрокінетичного руху проби

У даній роботі концентраційний профіль потоку (дисперсія) апроксимується рівнянням конвективної дифузії, яке є окремим випадком рівняння Нав'є-Стокса. Варто відмітити, що при трансформації рівнянь Нав'є-Стокса в рівняння конвективної дифузії у КЕФ приймається до уваги (на відміну від високоефективної рідинної хроматографії, де на розмивання зон впливають повздовжня дифузія, вихрова дифузія, складова масопереносу), виключно параметр поздовжньої дифузії [1]. Це дає можливість значно спростити математичну модель, що апроксимує електрокінетичний рух. Дана математична модель має вигляд

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - u \frac{\partial c}{\partial x},$$

де  $c = c(x, t)$  – розподіл концентрації речовини;  $u$  – швидкість електрофоретичного переміщення,  $u = \mu E = L^2/Ut$  ( $L$  – довжина капіляра від місця введення проби до детектора;  $t$  – час переміщення;  $\mu$  – електрофоретична рухливість;  $U$  – прикладена напруга);  $x$  – аксіальна координата;  $D$  – коефіцієнт дифузії.

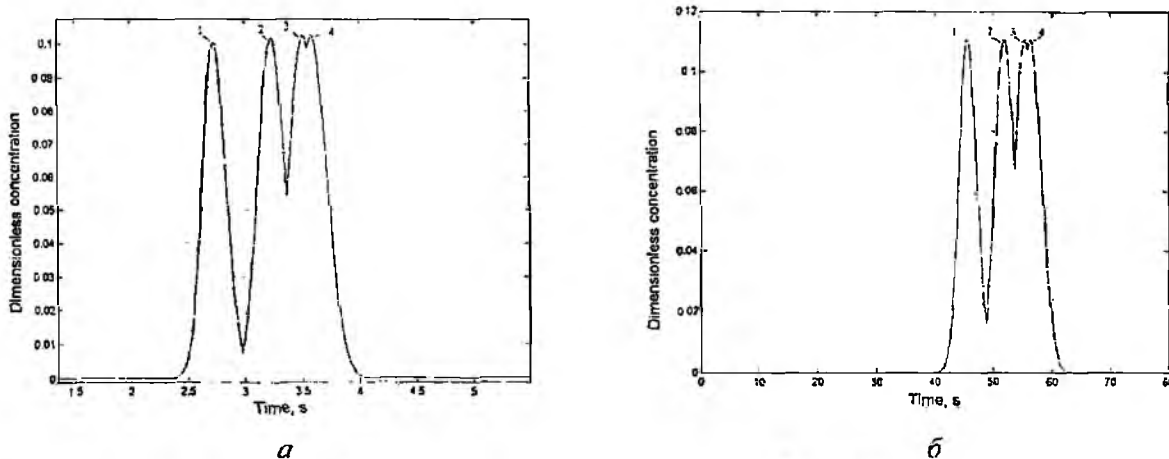
### Результати розрахунків та їх обговорення

З урахуванням наведених припущень розроблено та реалізовано модель електрокінетичного руху на базі чисельного розв'язку рівняння переносу фази методом кінцевих різниць. Розв'язок отриманих рівнянь отриманий із застосуванням апарату матричних обчислень, який реалізований в пакеті MatLab.

Моделювання проводилось на прикладі руху штучної суміші АМК (Трр, Тур, Про, Мет) вздовж зони проби в буферному розчині при різних значеннях рН (4, 7). Електрофоретичні рухливості обраних для аналізу АМК складають ( $\times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$ ): Трр –  $20.8 \pm 0.3$ ; Тур –  $21.5 \pm 0.2$ ; Про –  $30.7 \pm 0.9$ ; Мет –  $24.4 \pm 0.2$  [11].

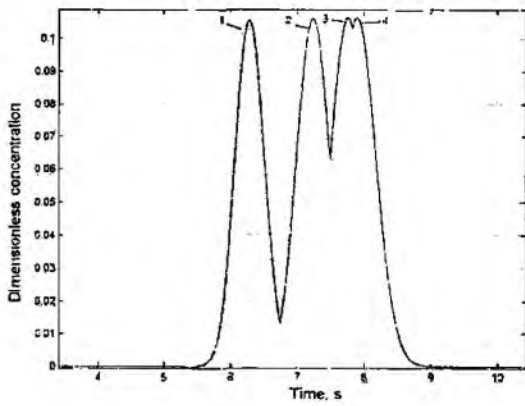
Повна електрокінетична рухливість кожної з АМК дорівнює сумі її електрофоретичної рухливості та електроосмотичної рухливості обраного буферу в мікроканалі з ПММА ( $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$ ) [12].

На рис. 1, 2, 3 наведено результати чисельного розрахунку часового розподілу відносних концентрацій АМК (Про; Мет; Тур; Трр) на виході каналу в залежності від прикладеної напруги. Оскільки емісія світла та електричний струм в ЕХЛ-аналізі пропорційні концентрації [8], то можна вважати отримані графіки електрофореграмами, тобто розподілом піків інтенсивності сигналу в часі.

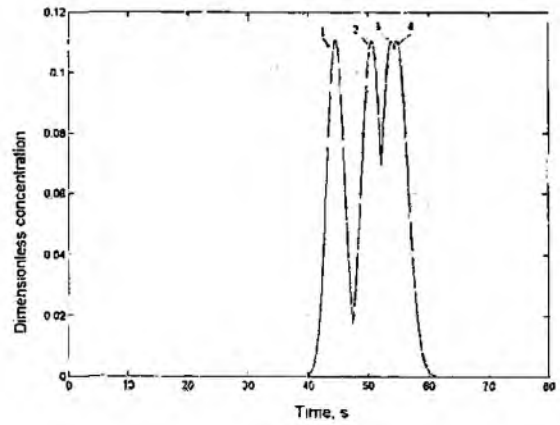


Електрофореграми АМК (1 – Про; 2 – Мет; 3 – Тур; 4 – Трр) при: а – рН = 4,  $U = 2 \text{ кВ}$ ,  $L = 2 \text{ см}$ ; б – рН = 4,  $U = 2 \text{ кВ}$ ,  $L = 5 \text{ см}$

Рис. 1



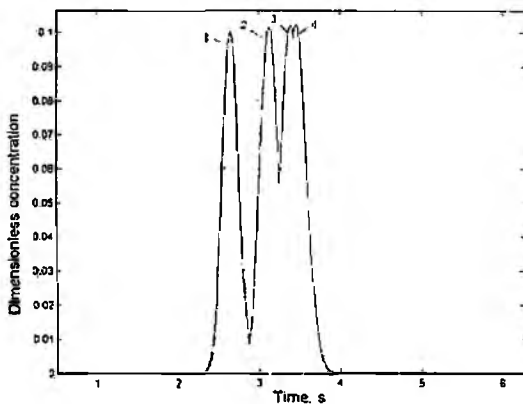
*a*



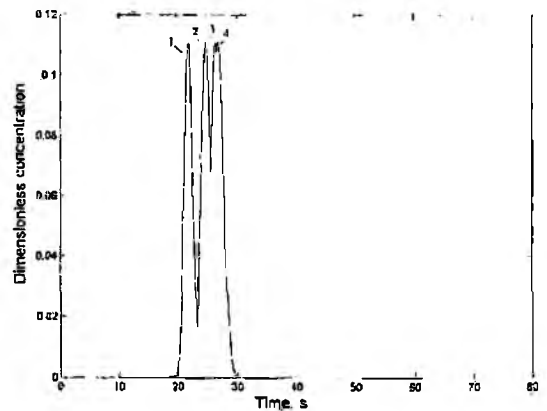
*б*

Електрофореграми АМК 1 – Про; 2 – Мет; 3 – Тур; 4 – Тгр) при: *a* – рН = 7,  $U = 1$  кВ,  $L = 2$  см; *б* – рН = 7,  $U = 1$  кВ,  $L = 5$  см

Рис. 2



*a*



*б*

Електрофореграми АМК 1 – Про; 2 – Мет; 3 – Тур; 4 – Тгр) при: *a* – рН = 7,  $U = 2$  кВ,  $L = 2$  см; *б* – рН = 7,  $U = 2$  кВ,  $L = 5$  см

Рис. 3

Аналізуючи електрофореграми з однаковими значеннями рН сепараційного буферу, напруги ( $U$ ), але за різних величин сепараційних каналів ( $L$ ), слід відмітити:

- чим довше канал, тим далі в часі розміщений максимум емісії, тим ширше профіль електрофоретичних піків;

- при рН = 7,  $U = 1$  кВ час розділення за довжини каналу рівній 2 см становила 9 с, що майже в 6 разів менше, ніж при 5 см (рис. 2, *a* і 2, *б*);

- при рН = 7,  $U = 2$  кВ час розділення за довжини каналу рівній 2 см становила 4 с, що майже в 8 разів менше, ніж за довжини 5 см (рис. 3, *a* і 3, *б*);

Аналізуючи випадок КЕФ АМК, за однакової довжини сепараційного каналу, однакової напруги, але різних значеннях рН (рис. 1 та рис. 3), можна відмітити:

- зростання рН не впливає на час аналізу;

- при зростанні рН електрофоретичні піки звужуються, що вказує на підвищення ефективності розділення АМК.

Розглядаючи випадок рівності довжин сепараційного каналу, рН буферу, але за різних напруг проведення КЕФ, видно:

- зі зростанням напруги вдвічі час аналізу в сепараційному каналі довжиною 2 см скорочується з 9 с до 4 с (рис. 2, *a*, 3, *a*);

- зі зростанням напруги вдвічі час аналізу в сепараційному каналі довжиною 5 см скорочується з 60 с до 30 с (рис. 2, *б*, 3, *б*);

Порівнюючи отримані електрофореграми для АМК із експериментальними результатами [7]. а саме, електрофореграми АМК у МФЧ із сепараційним каналом довжиною 5,5 см за напруженості електричного поля 183 В/см (прикладена напруга приблизно 1 кВ), можна стверджувати про задовільний збіг результатів. Деяка несхожість може пояснюватись, очевидно, впливом відмінності в ширині і матеріалі каналу.

### Висновки

Таким чином, аналіз результатів чисельного моделювання процесу фракціонування проби з АМК в ЕХЛ-КЕФ МФС за заданих напруг електричного поля (1 і 2 кВ), ширини сепараційного каналу з ПММА (200 мкм), при рН буферу рівних 4 і 7, показує, що у всіх розглянутих випадках адекватно розділились пролін, метіонін. Піки триптофану і тирозину перекрилились, що пояснюється практично однаковими значеннями їх електрофоретичних рухливостей і значною дисперсією. Це означає, що задані умови адекватні лише для розділення сумішей з 3-х АМК: Про, Мет, Тур або Про, Мет, Трп. Отже, щоб піки АМК Тур і Трп були більше розділені в часі при заданих напруженостях електричного поля необхідно збільшити довжину сепараційного каналу.

*Роботи виконана за підтримки гранту, наданого Українським науково-технологічним центром (проект G-77 «Розробка новітніх технологій і оптихемотронних сенсорів аналізу рідин на основі електрохемілюмінесцентних молекулярних конденсованих плівок Ленгмюра-Блоджетт із новими електрохемілюмінофорами»).*

**Список літератури:** 1. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филитов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А., Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей. 2004. 528 с. 2. Gübitz G., Schmid M. G., Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // *Electrophoresis*. 2004. Vol. 23. P. 3981–3996. 3. Ghosal S., Electrokinetic Flow and Dispersion in Capillary Electrophoresis // *Ann. Rev. Fluid Mech.* 2006. Vol. 38. P.309–338. 4. Буляница А.Л., Евстранов А.А., Рудницкая Г.Е., Метод моментов при расчете параметров каналов в микроразмерных системах // *Научное приборостроение*. 2003. Т. 13, № 4. С. 28–40. 5. Tsai C.-H., Tai C.-H., et al. Experimental and numerical analysis of the geometry effects of low-dispersion turns in microfluidic systems // *J. Micromech. Microeng.* 2005. Vol.15. P. 377–385. 6. Ghosal S., Electrokinetic Flow and Dispersion in Capillary Electrophoresis // *Ann. Rev. Fluid Mech.* 2006. Vol. 38. P.309–338. 7. Tsai C.-H., Tai C.-H., et al. Experimental and numerical analysis of the geometry effects of low-dispersion turns in microfluidic systems // *J. Micromech. Microeng.* 2005. Vol.15. P. 377–385. 8. Рожницкий Н.Н., Бых А.И., Красногоровец М.А. Электрохимическая люминесценция: Монография. Харьков: ХТУРЭ, 2000. 320 с. 9. Музыка Е.Н., Рожницкий Н.Н. Моделирование физических процессов в проточно-инжекционной системе с электрохемілюмінесцентным детектором // *Радиотехника: Всеукр. міжвед. научн.-техн. сб.* 2006. Вып. 145. С. 47–50. 10. Остерман Л.А. Хроматография для белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 535 с. 11. Zuskova I., Novotna A., Vcelakova K. et al., Determination of limiting mobilities and dissociation constants of 21 amino acids by capillary zone electrophoresis at very low pH. *Journal of Chromatography B*. 2006. №841. P. 129–134. 12. Bilitewski U., Genrich M., Kadow S., Mersal G., Biochemical Analysis with Microfluidic Systems // *Anal Bioanal Chem*. 2003. Vol. 377. P. 556–569.

Харківський національний  
університет радіоелектроніки

Надійшла до редколегії 07.08.2007