

СИНТЕЗ СТРУКТУРЫ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ СИСТЕМЫ С ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ БИОЖИДКОСТЕЙ

1 Постановка проблемы в общем виде и ее связь с важными научными и практическими задачами

При анализе биожидкостей с целью диагностики существуют две основные проблемы: *биомедицинская*, которая связана с тем, что при изъятии биопробы из организма нарушаются естественные связи ее с другими компонентами, развиваются процессы лизиса, денатурации, разрушения структур и комплексов; *техническая*, связана с выбором/разработкой метода анализа, соответствующей аппаратуры, а также оптимизацией процесса лабораторного анализа.

Решение указанных проблем должно приводить к получению достоверных результатов медицинского лабораторного анализа за наиболее короткий промежуток времени, желательного в *real-time* режиме, с минимальными экономическими затратами и трудовыми ресурсами.

2 Анализ последних достижений и публикаций, в которых начато решение проблемы

Последние 15-20 лет отмечены бурной автоматизацией лабораторных исследований и появлением приборов и устройств, использующих компьютерную технику. Среди наиболее эффективных подходов к автоматизации основных стадий медицинского лабораторного анализа важное место занимает проточно-инжекционный анализ (ПИА) [1]. Этот подход к анализу биожидкости основан на введении дискретных микрообъемов образца в непрерывно движущийся ламинарный поток жидкого носителя и образования контролируемого градиента концентрации компонентов образца в потоке. Большое число публикаций последнего времени посвящено практическому применению ПИА в медицине.

Можно выделить два этапа развития и применения ПИА. Первый этап связан, главным образом, с разработкой и исследованием устройств и методик ПИА как простого и эффективного способа автоматизации известных методик массового анализа жидких образцов. Второй этап включает широкое применение ПИА как нового методологического подхода к непрерывному анализу в потоке с помощью различных инструментальных методов применительно к определению элементов и изучению состава сложных биологически активных материалов. В настоящее время основные сферы применения ПИА в биомедицине – определение метаболитов в крови, моче и других биологических жидкостях; контроль качества изготовления лекарственных препаратов и изучение скорости их растворения. Особенно полезно использование ПИА при проведении массовых анализов в клинических лабораториях для диагностики различных заболеваний.

3 Выделение нерешенных ранее частей проблем

В рассматриваемых проблемах нерешенными остаются вопросы выбора оптимального для данного анализа метода детектирования биокомпонентов и перевода его в вариант ПИА; разработки модификации системы; улучшения основных метрологических характеристик анализа; повышения производительности проточно-инжекционной системы (ПИС), автоматизации всех стадий медицинского лабораторного анализа. В связи с этим актуальным является разработка системы лабораторного анализа биожидкостей, которая за наиболее короткий промежуток времени в *real-time* режиме дает возможность получить достоверные результаты с минимальными экономическими затратами и трудовыми ресурсами.

4 Цель работы

Цель работы заключается в разработке структуры проточно-инжекционной системы для детектирования определенных компонентов в биопробах с помощью метода электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ) режиме ПИА. При этом необходимо решить следующие задачи: 1 – обеспечить высокую чувствительность к изменению концентрации исследуемого объекта; 2 – повысить производительность проточно-инжекционной системы (определений в час) с применением математических методов оптимизации; 3 – минимизировать расход биопробы и реагента; 4 – управлять процессом анализа и обработкой полученных результатов при помощи ЭВМ.

5 Решение задач

Для достижения поставленной цели необходимо определиться с физико-химическим методом анализа. Он должен согласовываться со всеми задачами поставленной цели. В литературе описано более 20 различных аналитических методов [2, 3], при этом для анализа биожидкостей 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, аминокислот, канцерогенных веществ и др. [4]. Например, содержание аминокислот в биопробах мало и составляет микромоли на литр, по этому параметру ЭХЛ-метод, имея низкий предел обнаружения (до 10^{-15} моль/л), обеспечивает решение первой задачи. Отметим, что использование ЭХЛ-метода в сочетании с ПИА значительно повышает производительность ПИС, чем решает вторую задачу. Известно предложенное зарубежными авторами использование ЭХЛ-метода в варианте ПИА для иммуноанализа атразина [5], а также для обнаружения глюкозы с использованием плоского оптического волновода [6]. При многих положительных чертах, достигнутых благодаря совместному применению методов ПИА с ЭХЛ, данные работы не свободны от целого ряда недостатков – отсутствие обоснования выбора модификации ПИС, конструкций основных его элементов. Также рядом недостатков обладают использованные реакторы (аналитические ячейки) и программное обеспечение.

Для решения второй задачи следует рассмотреть особенности метода ПИА.

Главной особенностью ПИА, отличающей его от других методов анализа в потоке, состоит в том, что для ПИА существенна дисперсия образца и образование контролируемого градиента концентрации образца в ламинарном потоке носителя (реагента), а детектирование аналитического сигнала осуществляется в тот момент, когда ни физические процессы, ни химические реакции не завершены.

Существование границы раздела образец/носитель в потоке приводит к частичному размыванию (разбавлению) зоны образца по мере ее продвижения через проточно-инжекционную систему. Это явление и получило название физической дисперсии образца [7]. Степень дисперсии вдоль зоны образца неодинакова. В двух крайних частях зоны она является результатом диффузии и конвекции, а в центральной части, где отсутствует граница раздела носитель/образец – только конвекции. При этом дисперсия может проходить как в радиальном, так и в аксиальном направлениях. Для количественной оценки степени дисперсии образца в потоке используется коэффициент дисперсии D , равный отношению начальной концентрации образца c_0 к его концентрации $c_{град}$, соответствующей какой-либо точке концентрационного профиля, в частности, точке максимума $c_{макс}$:

$$D = \frac{c_0}{c_{град}}, \quad D = \frac{c_0}{c_{макс}}, \quad (1)$$

Коэффициент дисперсии больше или равен 1. В зависимости от значения D проточные системы делятся на три группы:

- 1) системы с ограниченной дисперсией, $1 < D_{мин} < 3$;

2) системы со средней дисперсией, $3 < D_{\text{мин}} < 10$;

3) системы с высокой дисперсией, $D_{\text{мин}} > 10-15$.

Экспериментально коэффициент дисперсии рассчитывают косвенным путем [8]. В случае детектора, сигнал которого высотой H линейно зависит от концентрации c , значение $D_{\text{мин}}$ можно оценить по уравнению:

$$D_{\text{мин}} = \frac{H_0}{H}. \quad (2)$$

Таким образом, чем меньше $D_{\text{мин}}$, тем меньше разность между аналитическими сигналами, измеренными в условиях динамического равновесия (H_0) и переходными сигналами ПИА (H). В общем случае соотношение $\frac{H_0}{H}$ определяется уравнением:

$$f = \frac{H_0}{H} = \frac{c_0 D_{\text{мин}} e k_{\text{равн}}}{c_{\text{макс}} q E k_{\text{ПИА}}}, \quad (3)$$

где q – степень разбавления образца при измерении сигнала в равновесных условиях; e и E – степень образования продукта реакции в условиях равновесия и ПИА соответственно; $k_{\text{равн}}$, $k_{\text{ПИА}}$ – константы.

Из данного соотношения следует, что при $D_{\text{мин}}/q < 1$ и в случае быстрых химических реакций ($e/E = 1$) предел обнаружения в системе ПИА может быть ниже, чем в условиях равновесия, т.е. $f < 1$. Отсюда следует, что при разработке проточно-инжекционных систем следует добиваться максимального значения отношения E/D . При этом лучше увеличивать E , чем уменьшать D .

Отметим, что дисперсия образца оказывает существенное влияние на производительность проточно-инжекционной системы (определений в час) [9]:

$$F_{\text{макс}} = \frac{3600}{k\sigma} = \frac{3600}{t_b} (k = 4,6), \quad (4)$$

где σ – аксиальная дисперсия образца; t_b – ширина основания пика, s ; k – константа.

Важным этапом проектирования ПИС является моделирование и анализ концентрационного профиля дисперсии. Природа и степень дисперсии определяются главным образом физическими параметрами системы (объемом пробы, скоростью потока, длиной и диаметром трубопровода, конструкцией дозатора, детектора и потокораспределительного устройства, геометрией смесителей и химических реакторов), а также физико-химическими свойствами текущего раствора (вязкостью, коэффициентом молекулярной диффузии и др.). Варьируя эти параметры, можно изменять степень дисперсии, что оптимизирует гидродинамическую структуру ПИС с целью улучшения основных метрологических характеристик анализа.

Построение математической модели базируется на анализе физической модели процесса.

Математические модели физической дисперсии зоны образца в одноканальной системе ПИА с прямым трубопроводом при отсутствии химической реакции описываются двумя подходами.

В основе первого подхода лежит общая теоретическая модель Тейлора [9]:

$$d_m \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{\partial c}{\partial t} + u_0 \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (5)$$

где d_m – коэффициент молекулярной диффузии, $\text{м}^2/\text{с}$; c – концентрация образца в точке потока (x, r, t), моль/л (М); x – аксиальное расстояние от точки ввода образца в прямом трубопроводе, м ; r – радиальное расстояние от центра трубопровода ($0 \leq r \leq R$), м ; R –

внутренний радиус трубопровода, м; u_0 – максимальная линейная скорость потока в центре трубопровода, м/с.

Если проба, содержащая m молей вещества, вводится в поток носителя в точке трубопровода с координатой $x = 0$ ($z = 0$) и медленно движется по узкой прямой трубке радиусом R , то образующийся концентрационный профиль зоны образца в момент времени t описывается уравнением, которое является приближенным численным решением уравнения Тейлора для экстремального случая, в котором дисперсия контролируется молекулярной диффузией в аксиальном направлении:

$$c = \frac{m}{\pi R^2 L} \left[\frac{1}{2(\pi\delta)^{1/2}} \cdot e^{-(L-x)^2/L^2 4\delta} \right], \quad (6)$$

где m – количество вещества в пробе, моль; δ – дисперсионное число ($\delta = d_m t / L^2$); L – общая длина трубопровода, м.

Для точки максимума пика ($c = c_{\max}$) это уравнение имеет вид:

$$c_{\max} = \frac{m}{\pi R^2 L} \cdot \frac{1}{2(\pi\delta)^{1/2}}. \quad (7)$$

В этом случае коэффициент дисперсии D_{\min} (при $t = \bar{T}$, $x = L$) можно выразить формулой

$$D_{\min} = k_1 2(\pi\delta)^{1/2} = k_1 (2\pi)^{1/2} \sigma, \quad (8)$$

где σ – аксиальная дисперсия образца; k – константа скорости химической реакции.

Из данного уравнения при использовании модели аксиальной дисперсии Тейлора – Ари-са, согласно которой $\sigma_i^2 = TR^2 / 24d_m$, (σ_i – аксиальная дисперсия в момент времени t) [8] получены следующие зависимости:

$$D_{\min} = \text{const}_1 \bar{T}^{1/2}, \quad (9)$$

$$D_{\min} = \text{const}_2 L^{1/2}, \quad (10)$$

$$D_{\min} = \text{const}_3 R^2. \quad (11)$$

Предложенная модель справедлива при условии, что радиус R очень мал, а среднее время пребывания образца в системе \bar{T} , наоборот, достаточно велико вследствие низкой линейной скорости потока, и выполняется соотношение:

$$\bar{T} \geq R^2 / 3,8^2 d_m. \quad (12)$$

Существующие теоретические подходы позволяют оценить влияние основных параметров системы ПИА на степень дисперсии образца и аналитический сигнал, а также высказать ряд рекомендаций по конструированию элементов системы с целью получения наиболее высокой производительности и качества анализа.

Решая третью задачу минимизации расхода биопробы и реагента, рассмотрим подробнее ячейку, где непосредственно и протекает ЭХЛ-процесс. Подробно ЭХЛ-ячейка как часть оптохемотронного (ОХ) сенсора рассмотрена в [10], поэтому здесь отметим лишь ее основные особенности тонкослойной конструкции: реагент фиксирован на электроде сенсора, что позволяет снизить его расход; высокая чувствительность метода позволяет работать с малыми объемами исследуемого вещества (объем ЭХЛ-ячейки составляет 5мкм).

Требование четвертой задачи 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.

Таким образом, вырисовывается общая картина решения поставленной цели: обоснован выбор ЭХЛ-метода в сочетании с ПИА.

Первоначально разрабатывается и монтируются проточно-инжекционная система. С помощью насоса жидкий носитель прокачивается по узким трубкам-каналам по направлению к ЭХЛ-ячейке. Через заданные интервалы времени равные микрообъемы жидкого анализируемого образца вводятся определенным образом в поток носителя. При этом в потоке возникает зона образца, с двух сторон которой находится носитель. Затем поток проходит через ЭХЛ-ячейку. Последняя непрерывно измеряет величины светоиспускания и электродного потенциала (в случае ЭХЛ-анализа), фиксируя их изменение в момент прохождения зоны образца.

В трубопроводной системе проба находится недолго. За это время ни физические процессы анализа, ни химические реакции не завершаются. Отсюда одна из важнейших особенностей ПИА – определение проводится в неравновесных условиях. Однако строгий контроль времени пребывания пробы в системе и степени ее разбавления в потоке позволяет получать надежные, хорошо воспроизводимые результаты.

Исходя из вышеприведенного анализа, можно вывести определенные предпосылки для разработки электронного комплекса ПИА с ЭХЛ-детектированием.

Разработанный электронный комплекс проточно-инжекционной системы с ЭХЛ-анализом биожидкостей состоит из следующих основных устройств: устройства управления и контроля (УУК), измерительной ЭХЛ-ячейки, потенциостата (ПТ), фотодетектора (ФД), обработки выходного сигнала с ФД (ОБС). УУК включает компьютерное управление в виде персонального компьютера (ПК), драйверы и клавиатуру, оно соединяется с остальными устройствами в обоих направлениях посредством интерфейса.

Для обеспечения работы комплекса предназначены следующие блоки:

1) блок высоковольтного (ВВ) питания фотозлектронного умножителя (ФЭУ). Цифроаналоговый преобразователь (ЦАП) при наличии команд УУК создает управляющее напряжение, которое подается на высоковольтный преобразователь, вырабатывающий при этом напряжение питания ФЭУ;

2) блок обработки сигнала с выхода ФЭУ, предусматривающий работу ФЭУ в токовом режиме и режиме счета фотонов. Режимы переключаются коммутатором. Во втором режиме сигнал с ФЭУ подается на усилитель, далее на дифференциальный дискриминатор-счетчик одноэлектронных импульсов, который сопряжен с ПК. Токковый режим обработки аналитического сигнала с ФЭУ реализуется с помощью преобразователя ток-напряжение (ПТН) с дальнейшей его оцифровкой

3) блок управления подачей сигналов на электроды предусматривает с помощью ЦАП контроль формы, длительности и пауз запускающего сигнала, после чего генерируется напряжение необходимой формы, которое прикладывается к электродам измерительной ячейки, проходя через усилитель. Для запуска ЭХЛ-процесса на рабочий электрод (РЭ) и вспомогательный электрод (ВЭ) подается управляющий сигнал через схему контроля формы запускающего сигнала, где определяются его параметры.

ЦАП контроля формы управляющего сигнала имеет четыре внутренних регистра, посредством которых задаются: паузы t_1 и t_3 , длительности импульсов t_2 и t_4 (рис. 1). Поскольку различные вещества имеют свои значения потенциалов окисления и восстановления ($\varphi_{ок}$, $\varphi_{восп}$), то в ЭК предусматривается возможность их изменения.

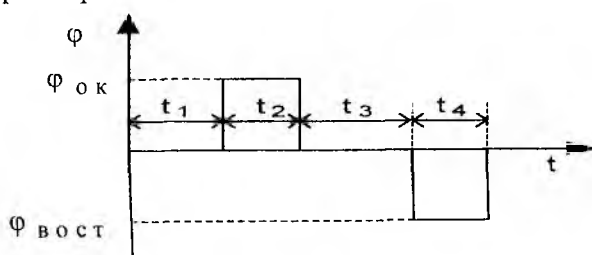


Рис. 1

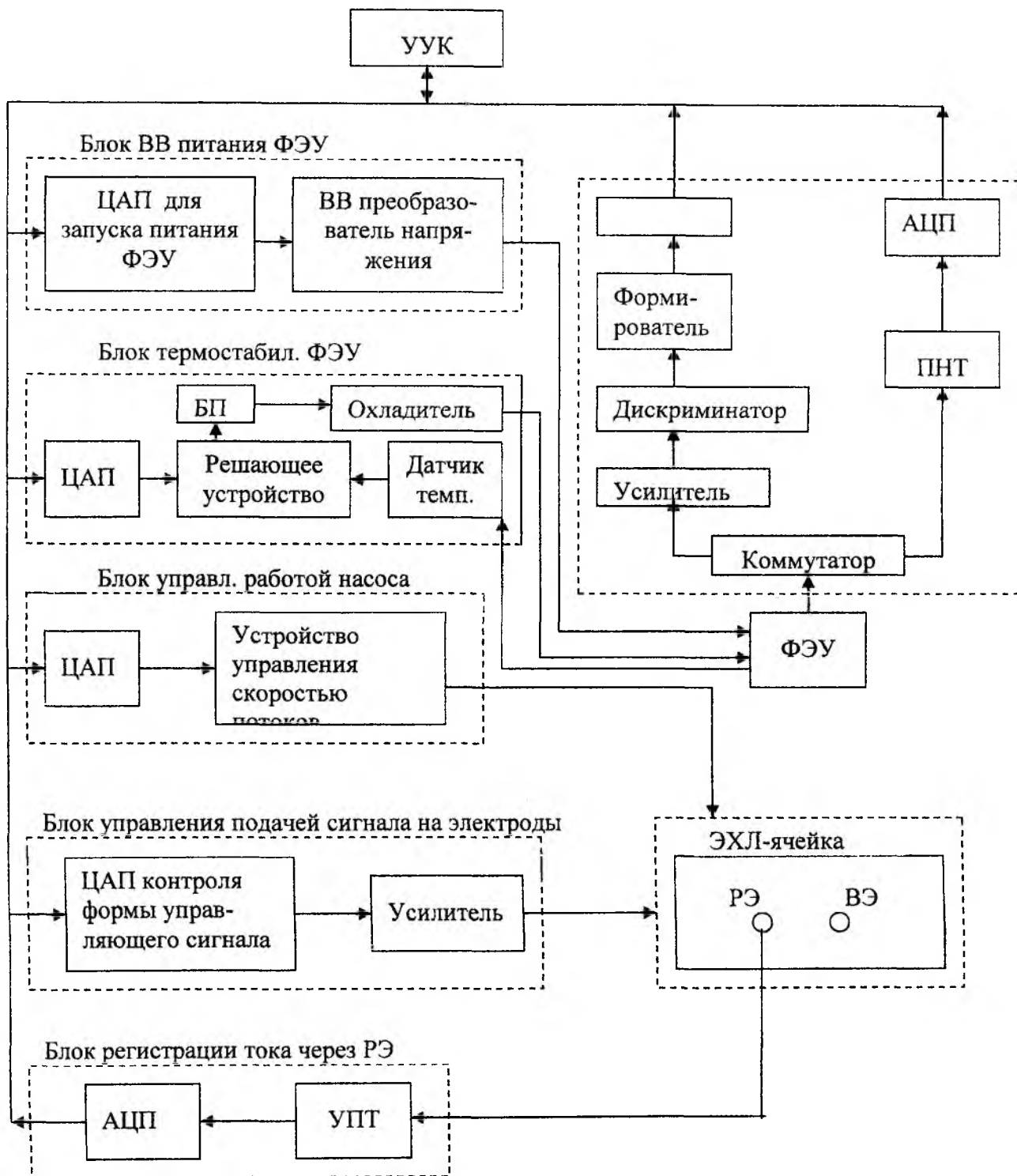


Рис. 2

4) блок регистрации тока через РЭ. Ток через РЭ, несущий информацию по управлению характеристиками всей ЭХЛ-системы, проходит через усилитель и посредством оцифровки в аналогово-цифровом преобразователе АЦП, поступает в УУК.

5) блок контроля работы насоса, предназначен для управления с помощью УУК посредством ЦАП, работой мотора насоса. Так, для закачки пробы в систему детектирования с ПК поступает сигнал, запускающий мотор насоса через устройство управления мотором

насоса, которое устанавливает фиксированную скорость прокачки жидкости через измерительную ЭХЛ-ячейку.

б) блок термостабилизации, включающий датчик температуры, охладитель и элементы, необходимые для обеспечения определенного температурного режима ФЭУ.

Таким образом, на основании проведенной работы можно сделать следующие выводы:

Для доставки пробы к месту измерения выбран метод проточной инъекции, что позволяет вводить образец в ламинарный поток носителя (буфера), стабилизировать движение зоны образца в системе, сопровождающееся протеканием различных физико-химических процессов; контролировать степень дисперсии (размывания и разбавления) введенного образца в процессе переноса его через систему, определяемую схемой, геометрическими и гидродинамическими параметрами; следить за постоянством пребывания образца в системе. Вышеперечисленное позволяет повысить скорость анализа и работать с малыми объемами.

Работу всех блоков регулирует устройство управления, в состав которого входят ПК, драйверы и клавиатура, оно соединено с электронным комплексом в обоих направлениях посредством параллельного интерфейса. Управлению подвергается не только процесс измерения, но и ввод/вывод пробы в/из измерительной ячейки, включая возможность управления скоростью прокачки жидкости. Полная автоматизация процесса позволяет упростить эксплуатацию, ускорить анализ, повысить его точность, исключить человеческий фактор.

Закрывающая система ПИА открывает возможность детектирования лабильных веществ в ион-радикальных состояниях и позволяет генерировать их прямо в потоке.

На основе проведенных исследований можно указать на перспективы развития: применение математических методов оптимизации, что необходимо прежде всего для нахождения оптимальных значений химических факторов и физических параметров проточно-инжекционных систем, влияющих на величину аналитического сигнала и селективность определения; миниатюризация проточно-инжекционных устройств и разработка новых быстродействующих и высокоселективных ОХ-сенсоров, так как последние обладают рядом положительных характеристик (полная гальваническая развязка между входным токовым и выходным оптическим каналами сенсора, что обуславливает высокую помехозащищенность и возможность сопряжения с оптико-волоконными линиями передачи данных при проведении дистанционного анализа). Подобные устройства найдут широкое применение в клиническом анализе и биохимических исследованиях, так как позволяют использовать объемы проб на уровне субмикролитров и экономить дорогостоящие реагенты.

Список литературы: 1. *Ruzicka J.* The Second Coming of Flow-Injection Analysis // *Anal. chim. Acta.* 1992. Vol. 261, №1/2/. P. 3-21. 2. *McCaman M.W., Robins E.* Fluorometric 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. *Рожницкий М.М., Бух А.И., Красноголовец М.О.* Электрохімічна люмінесценція. Харків: ХТУРЕ, 2000. 320 с. 5. *Wilson R., Barker M.H.* Electrochemiluminescence flow injection immunoassay for atrazine // *Biosensors & Bioelectronic* Vol. 12 No. 4, pp. 277 – 286, 1997. 6. *Wilson R.* Detection of glucose via electrochemiluminescence in a thin-layer cell with planar optical waveguide // *Meas. Sci. Technol* 1995. P. 1325 – 1328. 7. *Ruzicka J., Hansen E.H.* // *Anal. chim. Acta.* 1975. V78. №1. P. 145. 8. *Ruzicka J., Hansen E.H.* // *Anal. chim. Acta.* 1981.P.207. 9. *Taylor G.* // *Proc. R. Soc. London., Ser. A.* 1953. V. 219. №2. P. 186. 10. *Масолова Н.В., Рожницкий Н.Н.* Перспективы использования модифицированных электродов для создания аналитических датчиков ОХ-сенсоров // *Новые технологии.* 2003. №3. С. 74 – 78