

УДК 543.866:541.13

Электрохимический детектор для твердофазного иммуноферментного анализа. Ситдыков Р.А., Курочкин В.Е., Ивницкий Д.М., Рейфман Л.С. // Научное приборостроение. Формирование пучков заряженных частиц. Л.: Наука, 1990. – С. 93–99.

Приводятся теоретические и экспериментальные результаты исследований проточного амперометрического датчика с системой подачи раствора носителя. Установлено, что нижний предел обнаружения по ферменту-маркеру пероксидазе равен $5 \cdot 10^{-12}$ М, диапазон определения составляет $5 \cdot 10^{-12}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ М, производительность детектора не менее 360 проб/ч, объем исследуемой пробы 50–100 мкл. Лит. – 6 назв., ил. – 6.

Р.А.Ситдыков, В.Е.Курочкин, Д.М.Ивницкий, Л.С.Рейфман (НТО АН СССР)

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании антителами определяемого антигена, широко применяются в различных областях медицины, биохимической промышленности, сельского хозяйства и с целью контроля окружающей среды.

В последние годы интенсивные исследования проводятся в области иммуноферментного анализа (ИФА). Причиной этому является высокая чувствительность (10^{-11} – 10^{-15} М) и специфичность ИФА, доступность и относительная дешевизна многих ферментов-маркеров, длительная сохранность меченных реактивов, безопасность работы с ними. Область применения ИФА также широка, как и радиоиммунологического метода анализа. Вместе с тем быстрое внедрение ИФА в практику требует решения ряда важных технических проблем. В первую очередь это связано с разработкой простой портативной регистрирующей аппаратуры.

Большинство иммуноферментных методов анализа базируются на спектрофотометрической детекции результатов. Для этого используются специальные фотометры, серийный выпуск которых в нашей стране начался в 1989 году. С этой целью разработан электрохимический детектор результатов ИФА.

В основу его работы положены иммунохимическая реакция в лунках полистироловых планшет, реакция пероксидазного окисления иодид-ионов и электрохимическое

восстановление продукта ферментативной реакции (молекулярного иода) на поверхности индикаторного электрода. Величина тока при электровосстановлении иода прямо пропорциональна концентрации фермента-маркера (пероксидазы) [1].

Детектор является проточно-инжекционным (рис.1) и состоит из перистальтического насоса (ПН), демпфера (Д), клапана ввода проб (ВП), проточного амперометрического датчика (АД), регистратора (Р). Амперометрический датчик включает платиновый проволоочный индикаторный электрод (Э), длиной l_3 , размещенный в стеклянном капилляре (K_3), диаметром d_k (рис.2) и хлоридсеребряный электрод сравнения ЭВШ - 1 МЗ. Датчик работает в гальваническом режиме.

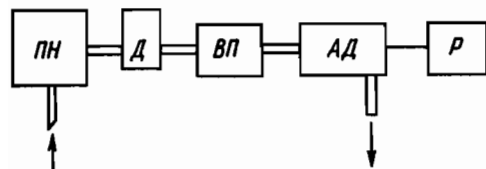


Рис.1. Блок-схема электрохимического детектора для ИФА

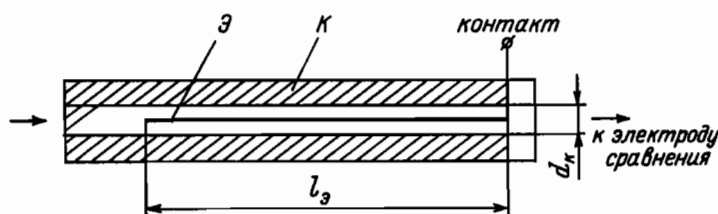


Рис.2. Схема рабочей ячейки проточного амперометрического датчика

Для нахождения аналитических характеристик детектора проведены теоретические и экспериментальные исследования проточного амперометрического датчика, а также систем подачи раствора-носителя и пробы.

Основным параметром амперометрического датчика является величина предельного тока

$$i_{пр} = n \cdot F \cdot I_{диф}, \quad (1)$$

где n - число электронов, участвующих в единичном электрохимическом акте; F - постоянная Фарадея; $I_{диф}$ - полный диффузионный поток электроактивного вещества на поверхность индикаторного электрода, рассчитываемый из уравнений конвективной диффузии в жидкости.

Для определения $I_{диф}$ допустим, что поперечное сечение проволоочного индикаторного электрода длиной l_3 - многогранник, течение раствора-носителя ламинарное, а скорость электрохимической реакции много больше скоростей диффузионного и конвективного переноса электроактивного вещества. В таком случае уравнение конвективной диффузии известно [2]:

$$U_x \frac{\partial C}{\partial x} + U_y \frac{\partial C}{\partial y} = D^2 \frac{\partial^2 C}{\partial y^2}, \quad (2)$$

где U_x и U_y - координаты скорости движения жидкости относительно поверхности электрода в продольном и перпендикулярном направлении, соответственно; C - кон-

центрация электроактивного вещества; D - коэффициент диффузии. Из уравнения (2) найдена плотность диффузионного потока на поверхность грани электрода

$$j = D \left(\frac{\partial C}{\partial y} \right)_{y=0} = 0,34 \frac{D C \sqrt{U}}{\sqrt{\nu \ell_3}} \left(\frac{\nu}{D} \right)^{1/3},$$

где U - максимальная линейная скорость жидкости вдали от поверхности электрода; ν - кинематическая вязкость.

Проинтегрировав j по всей поверхности и учитывая, что

$$U = \frac{6}{\pi} \left(\frac{V_0}{d_k^2 - d_3^2} \right),$$

где d_3 - диаметр электрода; d_k - внутренний диаметр капилляра рабочей ячейки; V_0 - объемная скорость жидкости, получим

$$I_{\text{диф}} = 2,94 C D^{2/3} \ell_3^{1/2} \nu^{-1/6} d_3 \left(\frac{V_0}{d_k^2 - d_3^2} \right)^{1/2}. \quad (3)$$

Из уравнений (1) и (3) получаем предельный ток амперометрического датчика с проволоочным индикаторным электродом:

$$i_{np} = 2,94 n \cdot F \cdot C \cdot D^{2/3} \ell_3^{1/2} \nu^{-1/6} d_3 \left(\frac{V_0}{d_k^2 - d_3^2} \right)^{1/2}, \quad (4)$$

где единицы измерения следующие: i_{np} - мкА; F - Кл/моль; C - ммоль/л; D - см²/с; ν - см²/с; ℓ_3 , d_3 , d_k - см; V_0 - см³/с.

Анализ уравнения (4) показывает, что оно может быть приведено к следующему виду:

$$i_{np} = K \cdot n \cdot C \cdot F \cdot D \omega (S_c)^{1/3} \cdot (R_c)^\alpha, \quad (5)$$

где $S_c = \nu/D$ - число Шмидта; $R_c = \bar{U} \ell^* / \nu$ - число Рейнольдса, ω , K , α , ℓ^* - параметры, зависящие от типа и геометрических размеров электрода.

Следует отметить, что выражение (5) ранее было известно лишь для трубчатого, дискового и конического электродов. Уравнение (4), являясь частным случаем выражения (5), позволяет рассчитать геометрические размеры ранее неизвестного детектора с проволоочным электродом, рассматриваемого в данной работе. Так, для регистрации результатов ИФА диаметр электрода $d_3 = 0,03$ см, диаметр капилляра детектора $d_k = 0,1 - 0,005$ см, длина электрода $\ell_3 = 8,0$ см, $\alpha = 0,5$. Расход пробы составляет от 50 до 240 мл/ч.

Для указанных параметров данной конструкции детектора конвективная составляющая диффузии электроактивного вещества на электрод мажорирует.

На рис.3 приведены рассчитанные по уравнению (4) экспериментальные и теоретические зависимости сигнала амперометрического датчика с проволоочным электродом ($\ell_3 = 8,0$ см, $d_3 = 0,03$ см) от скорости потока раствора-носителя (0,1 М ацетатный буферный раствор pH 4,2 KCl - 0,3 М), содержащего $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М молекулярного иода, при двух различных объемах рабочей ячейки датчика (60 и 20 мкл). Кривые 1 и 2 при $d_k = 0,01$ см; 3 и 4 при $d_k = 0,065$ см.

Из приведенных данных видно, что экспериментальные зависимости коррелируют с теоретическими и уравнение (4) хорошо описывает работу проточного амперометрического датчика с проволоочным индикаторным электродом.

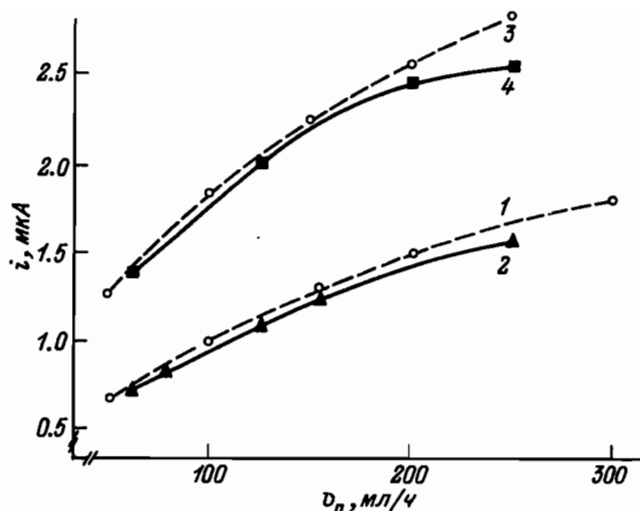


Рис.3. Зависимости выходного сигнала амперометрического датчика от скорости потока раствора-носителя при $C_2 = 1 \cdot 10^{-5}$ М: кривые 1, 3 – теоретические, кривые 2, 4 – экспериментальные

в уравнении (4)); C – концентрация молекулярного иода в инжестируемой пробе в момент контакта с индикаторным электродом. Вводя коэффициент дисперсии D , показывающий степень разбавления инжестируемой пробы при ее движении от клапана ввода к индикаторному электроду, можно записать [4]

$$D = \frac{C}{C^*} = \frac{i_{np}}{i_{max}} \quad (8)$$

При выборе геометрических и гидродинамических параметров проточно-инжестиионной системы необходимо минимизировать коэффициент D (при $D \rightarrow 1$, $i_{max} \rightarrow i_{np}$).

Зная коэффициент дисперсии по уравнениям (8) и (4), можно вычислить амплитуду аналитического пика электрохимического детектора (i_{max}). Длительность пика рассчитывали по времени контакта пробы (t_k) с индикаторным электродом

$$t_k = \frac{V_a}{V_n} \left(1 + \frac{V}{V_a} \right), \quad (9)$$

где V_a – объем рабочей ячейки амперометрического датчика; V – объем инжестируемых проб.

Из уравнения (9) следует, что если объем пробы много меньше объема рабочей ячейки ($V \ll V_a$), то форма аналитического сигнала – прямоугольник, если $V < V_a$ – трапеция, если $V = V_a$ – равнобедренный треугольник, при $V > V_a$ – равнобедренная трапеция.

На рис.4 показаны формы аналитических пиков, рассчитанные по уравнениям (4), (8) и (9). Пунктиром обозначены пики, построенные по экспериментальным данным прецизионной оцифровки с разрешением 10 мс. Отличие их формы от расчетной обусловлено, в основном, разбавлением пробы при инжестии в поток носителя и ее движении к индикаторному электроду. Для приближения значения амплитуды аналитических пиков к величинам i_{np} необходимо, чтобы объем инжестируемых проб был больше или соизмерим с объемом рабочей ячейки.

Встраивание амперометрического датчика в проточно-инжестиионную систему потребовало проведения расчетов, учитывающих разбавление (дисперсию) инжестируемых микропроб. Значение максимального тока амперометрического датчика в проточно-инжестиионном режиме (i_{max}) меньше i_{np} на величину i^* [3]

$$i_{max} = i_{np} - i^* \quad (6)$$

Значение i^* можно определить из выражения

$$i^* = K(C - C^*), \quad (7)$$

где K – коэффициент инструментальной чувствительности амперометрического датчика (совокупный множитель при C в уравнении (4)).

На форму и величину аналитического пика могут влиять пульсации скорости потока раствора-носителя, обусловленные нестабильностью режима работы перистальтического насоса. При этом колебания в амперометрическом отклике (di), являющиеся результатом пульсаций скорости потока (dV_n), можно записать в виде [5]

$$\frac{di}{i} = \alpha \frac{dV_n}{V_n},$$

где α - безразмерная величина, зависящая от геометрических параметров (формы) индикаторного электрода. Для датчика с проволочным электродом $\alpha = 1/2$.

Для подавления пульсаций на выходе перистальтического насоса применяют демпфирующие системы [5, 6]. Установлено, что наиболее эффективное

подавление пульсаций обеспечивается одним или двумя цилиндрическими демпферами 8-10 мм, объемом 10-15 см³. В таблице представлены результаты влияния типа используемого насоса, демпфирования и способа инъекции проб на воспроизводимость результатов определения фермента-маркера (пероксидазы) электрохимическим детектором. Установлено, что применение воздушных демпферов и автоматической инъекции позволяет снизить величину относительного стандартного отклонения до 0,01. При этих условиях нижний предел обнаружения фермента-маркера не ниже, чем $5 \cdot 10^{-12}$ М, диапазон определения $5 \cdot 10^{-12}$ - $2 \cdot 10^{-9}$ М. Производительность электрохимического детектора 360 проб/ч при объеме инжестируемых проб 50-100 мкл.

Электрохимический детектор апробирован в ИФА различных биологически активных веществ (сывороточные белки, ферменты, гормоны, бактериальные клетки и др.). Параллельно результаты ИФ реакций оценивали на фотометрах для ИФА MR-580 (Dynatech) и Uniskan-1 (LabSystems).

Зависимость величины относительного стандартного отклонения в определении фермента-маркера от типа перистальтического насоса, демпфирования и способа инъекции проб

Тип насоса	Роликовый		Волновой	
	без демпфера	с демпфером	без демпфера	с демпфером
Ручная инъекция	0,16-0,20	0,040	0,05	0,030
Автоматическая инъекция	-	0,012	-	0,010

На рис.5 показано сравнение результатов ИФА донорской крови при выявлении антител к вирусу СПИДа, полученные с электрохимическим детектором и фотометром

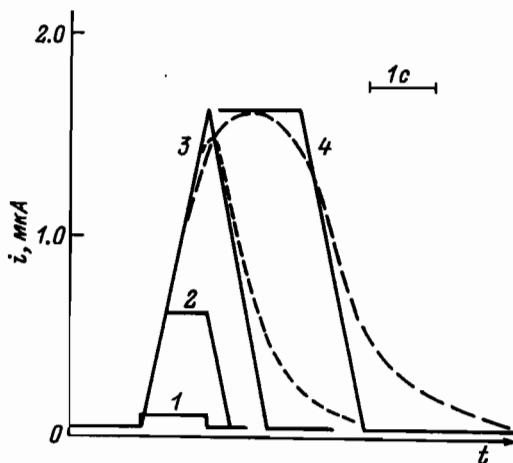


Рис.4. Форма расчетного аналитического пика: 1 - при $V \ll V_n$; 2 - при $V < V_n$; 3 - при $V = V_n$; 4 - при $V > V_n$ ($V_n = 60$ мкл, $V_n = 250$ мл/ч, $C_{j2} = 1 \cdot 10^{-5}$ М)

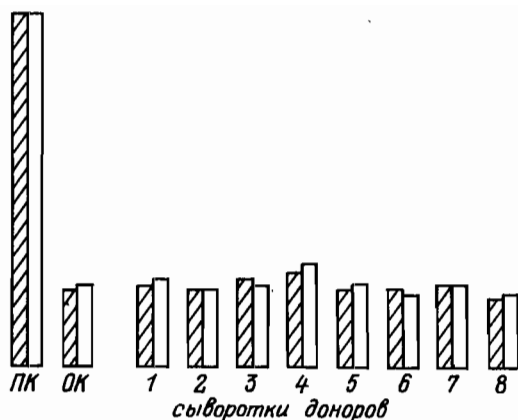


Рис.5. Относительное сравнение результатов ИФА донорской крови на антитела к вирусу СПИДа, полученных с электрохимическим детектором (■) и фотометром *Uniskan*-I (□): ПК - положительный контроль, ОК - отрицательный контроль

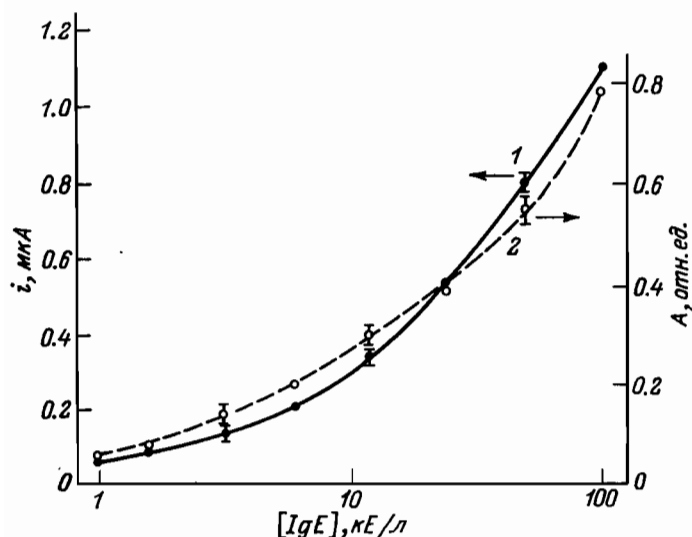


Рис.6. Градуировочные графики ИФА IgE

т.п. Регистрируемые результаты не зависят от оптической чистоты носителей и растворов, что позволяет получать более достоверные данные анализов. Простота изготовления основных элементов, возможность автоматизации процессов регистрации и обработки данных, с учетом приведенных результатов, показывают перспективность электрохимического детектора для иммуноферментного анализа в плане дальнейшей приборной разработки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивницкий Д.М. и др.//ЖАХ. - 1989. - Т.44, № 1. - С.151.

2. Левич В.Г. Физико-химическая гидродинамика. - М.: Физматгиз. 1956. - 520 с.

Uniskan -I. Установлено, что отношение соответствующих величин "положительного контроля" к "отрицательному" для обеих систем детекции идентично. Для всех образцов сывороток получены равноотрицательные результаты на наличие тестируемых антител.

На рис.6 приведены градуировочные графики ИФА общего сывороточного иммуноглобулина Е. Кривая 1 получена с электрохимическим детектором, кривая 2 - с фотометром *Uniskan* -I. Сравнение результатов иммуноферментного определения уровня IgE в 205 сыворотках крови больных и здоровых доноров показало хорошую корреляцию для обеих систем детекции.

При использовании электрохимического детектора в твердофазном ИФА становится возможным применять в качестве иммуносорбентов микропланшеты с различной конфигурацией лунок, латексы, шарики, магнитные сорбенты и

3. Ситдыков Р.А. и др.//ЖАХ. - 1989. - Т.44, № 8. - С. 1457.
4. Rusicka J., Hansen E.H. Flow injection analysis, N.York, Intersc., 1981.
5. Maskoul D. et al//Anal.Chemistry. - 1984. - V.56, n 3. - P. 436.
6. Курочкин В.Е./Принципы построения проточной цитофлуориметрической аппаратуры/Приборы контроля окружающей среды и биоинформации. - Л.: ЛИАП-ЛЭТИ им.В.И.Ульянова (Ленина), 1978. - Вып. 128. - С. 37.

В.Д.Саченко, С.Б.Туртца, А.П.Щербаков (НТО АН СССР),
Ю.А.Милешкин, Н.Н.Рязанцева (ВНИИ неорганических материалов им.А.А.Бочвара)

РАСЧЕТ ИОННО-ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МАЛОГАБАРИТНОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРА ДЛЯ АНАЛИЗА ЛЕГКИХ ГАЗОВ

Технологические системы регенерации и очистки газовой топливной смеси и изотопов водорода термоядерного реактора предусматривают контроль за изотопным и химическим составом газовых смесей. Изотопный анализ предполагает определение содержания изотопов водорода (H_2, D_2, T_2), гелия ($^3He, ^4He$). Химический анализ предполагает в смесях изотопов водорода и гелия определение примесных газов, таких как пары воды, метан, оксид и диоксид углерода, аммиак, азот, кислород и т.п. Одним из универсальных методов для решения подобных задач является масс-спектрометрический метод. Особенности масс-спектрометрического анализа указанных газов заключаются в том, что для прецизионного изотопного анализа и идентификации примесей требуются высокая разрешающая способность (табл.1); сравнительно высокая абсолютная и изотопическая чувствительность; учет или сведение к минимуму дискриминационных эффектов в ионно-оптической, напускной и откачной системах; исключение влияния радиоактивного трития на работоспособность систем откачки, регистрации ионного тока и т.п. [1, 2].

В настоящее время выпускаются или разработаны специализированные масс-спектрометры лабораторного типа для анализа легких газов: GASAB фирмы Micromass, MAT271/45 фирмы MAT, МИЗ305, МИЗ302 [3-6]. Однако из публикаций, рекламных проспектов и сообщений зарубежных фирм известна единственная работа об использовании масс-спектрометра (квадрупольного типа) в режиме "in-line" в системах, содержащих тритий [7]. Масс-спектрометр использовался в технологической системе очистки трития и обеспечивал лишь суммарное количественное определение примесей, не решая всего комплекса задач по прецизионному изотопному анализу и идентификации примесей.

Целью настоящей работы являлся расчет ионно-оптической схемы масс-анализатора, обеспечивающей создание на ее основе малогабаритного масс-спектрометра, позволяющего в режиме "in-line" обеспечить все требования к контролю газовых смесей в тритиевых технологических системах.

В качестве составляющих элементов ионно-оптической системы (ИОС) масс-анализатора выбраны секторные электростатический тороидальный конденсатор и магнит с плоскопараллельными полюсными наконечниками (рис.1). Для увеличения чувствительности за счет обеспечения условий максимальной пропускающей способности масс-анализатора тороидальный конденсатор расположен между источником ионов и магнитным каскадом. Такой порядок расположения элементов ИОС позволяет не только оптимально согласовать источник ионов и магнитный каскад и обеспечить тем самым оптимальную транспортировку ионов через последний, но также создать необ-