

В.Е. Курочкин, Л.А. Стефанович

*(Институт аналитического приборостроения АН СССР,
Ленинград),*

Р.А. Ситдыков, Д.И. Ивницкий

(Самаркандский медицинский институт им. И.П. Павлова)

ОПТИМИЗАЦИЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ ДЕТЕКТОРОВ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ

Амперометрические детекторы получили в настоящее время широкое распространение в жидкостной хроматографии и в проточно-инжекционном анализе (ПИА) [1-3]. Наиболее распространенными являются детекторы следующих типов: трубчатые, тонкослойные, wall-jet, дисковые, конические и проволочные [1-5].

Для описания отклика указанных детекторов предложен ряд уравнений предельного тока как основной аналитической характеристики [6, 7]. Эти уравнения, полученные из теории конвективной диффузии, устанавливают взаимосвязь аналитического сигнала с концентрацией определяемого вещества, а также с гидродинамикой и геометрией детектора. Однако полученные уравнения предельного тока связывают величину предельного тока с концентрацией определяемого вещества только при пробе с бесконечным объемом, что не позволяет проводить расчет оптимальных конструкций и режимов работы детекторов в ПИА, где объемы проб конечны [5].

Детектирование будет оптимальным, если при выбранной конструкции детектора объем пробы, скорость ее прохождения и некоторые другие параметры обеспечат на электроде постоянство величины предельного тока в течение вполне определенной промежутка времени. При этом минимально необходимая величина временного интервала, на котором предельный ток будет постоянным, определяется максимальным быстродействием устройства оценки величины предельного тока. Естественно, что чем больше указанный интервал, тем достовернее результат оценки, однако данное обстоятельство приводит к уменьшению производительности ПИА.

Таким образом, необходимо искать конструкцию детектора и режим прохождения пробы, при которых достигается оптимум, обеспечивающий максимальную производительность анализа при заданной надежности оценки величины предельного тока.

В связи с отсутствием методик оптимизации в статье выполняется указанный пробел на основе модели, описывающей процесс взаимодействия электроактивной пробы с электродом на примере ранее предложенного нового амперометрического детектора коаксиального типа [8] для иммуноферментного анализа (ИФА).

Модель детектирования

Рассматривается предложенный детектор [8] без конструктивных подробностей и особенностей, состоящий из капилляра, в котором расположен осесимметрично круглый электрод (рис. 1). Считается, что профиль скорости потока-носителя в свободном пространстве между электродом и капилляром установившийся и ламинарный. Также принимается, что профиль скоростей пробы, инжектированной в поток-носитель, на известном расстоянии до электрода совпадает с профилем скоростей потока-носителя. В момент времени $t = 0$ в детектор начинает поступать проба, концентрация которой в начальный момент времени равна C_0 на отрезке $ez \in [-l_1; 0]$ и равна нулю вне этого отрезка. Электроактивное вещество пробы, двигаясь по коаксиальному датчику $z \in [0; l_2]$, реагирует с поверхностью электрода, в результате чего при условии замыкания цепи появляется электрический ток.

Условие сохранения массы электроактивного вещества на отрезке канала $[0; l_2]$ имеет вид:

$$\int_a^b \int_0^{l_2} \frac{dC}{dt} r dz dr = j(0) - j(l_2) - \frac{i}{nF}, \quad (1)$$

где $j(0)$ и $j(l_2)$ — потоки вещества на входе и выходе детектора; n — количество электронов, участвующих в электрохимическом акте; F — постоянная Фарадея.

Соответственно условию (1) величина электрического тока будет определяться выражением

$$i = nF [j(0) - j(l_2)] - \int_a^b \int_0^{l_2} \frac{\partial C}{\partial t} r dz dr. \quad (2)$$

Распределение концентрации электроактивного вещества в коаксиальном канале будет описываться уравнением конвективной диффузии следующего вида:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial z} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right], \quad (3)$$

где

$$v = v_{\max} \left[1 - \frac{r^2}{a^2} + \frac{b^2 - a^2}{a^2 \ln \frac{b}{a}} \ln \frac{r}{a} \right]. \quad (4)$$

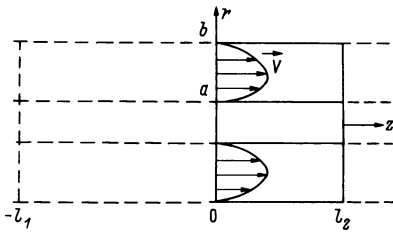


Рис. 1. Функциональная схема коаксиального детектора

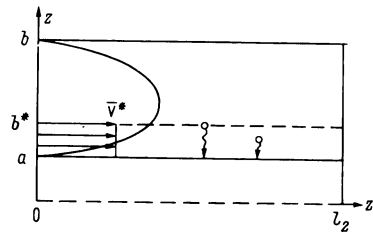


Рис. 2. Пояснение к математической модели

Поскольку вещество реагирует с поверхностью электрода только на участке $z \in [0; l_2]$, то, учитывая начальное распределение концентрации вещества, в общем случае следует решать три отдельные задачи на участках $[-l_1; 0]$, $[0; l_2]$, $[l_2; \infty]$, сшивая их по концентрациям и полным потокам.

Однако, можно рассмотреть упрощенную постановку, позволяющую аналитическим путем, не прибегая к сложным выкладкам, получить результаты, адекватные экспериментальным.

В случае, когда характерное конвективное время больше характерного диффузионного ($t_{\text{конв}} > t_{\text{диф}}$), будем

использовать вместо v среднюю скорость $\bar{v} = \frac{\int_a^b v r dr}{\int_a^b r dr}$.

Однако, чаще приходится иметь дело с обратной ситуацией: $t_{\text{конв}} \ll t_{\text{диф}}$. В этом случае целесообразно ввести некоторый эффективный радиус b^* (рис. 2), такой, что носители заряда в пробе, двигающейся со средней скоростью \bar{v}^* в пределах этого радиуса, за время движения вдоль электрода успевают на него диффундировать. Очевидно, что радиус b^* найдется из соотношения

$$\frac{(b^* - a)^2}{D} = \frac{l_2}{\bar{v}^*},$$

где $\bar{v}^* = \frac{\int_a^{b^*} v r dr}{\int_a^{b^*} r dr}$, а скорость $v(r)$ задается

выражением (4). Введение эффективного радиуса капилляра b^* позволяет считать, что все вещество, которое в начальный момент времени находилось за пределами b^* , на электрод не попадает, т.е. будет „балластом“, не дающим вклад в ток. В этом случае вместо скорости v в уравнении (3) необходимо использовать \bar{v}^* .

С учетом изложенного задача ставится следующим образом:

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} + \bar{v}^* \frac{\partial C_1}{\partial z} = D \left[\frac{\partial^2 C_1}{\partial z^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C_1}{\partial r} \right) \right]. \quad (5)$$

Граничные условия по r :

$$C_1 \Big|_{r=a} = 0, \quad \frac{\partial C_1}{\partial r} \Big|_{r=b^*} = 0.$$

Граничные условия по z :

$$\bar{v}^* C_1 - D \frac{\partial C_1}{\partial z} \Big|_{z=0} = \bar{v}^* C_0; \quad \bar{v}^* C_1 - D \frac{\partial C_1}{\partial z} \Big|_{z=l_2} = 0.$$

Начальное условие: $C_1 \Big|_{t=0} = 0$, где C_1 — концентрация пробы в канале капилляра в интервале времени $0 \leq t \leq \hat{t} = l_1 / \bar{v}^*$. Аналогично ставится задача при $t \geq \hat{t} = l_1 / \bar{v}^*$.

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} + \bar{v}^* \frac{\partial C_2}{\partial z} = D \left[\frac{\partial^2 C_2}{\partial z^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C_2}{\partial r} \right) \right], \quad (6)$$

при этом граничные условия по r записываются в следующем виде:

$$C_2 \Big|_{r=a} = 0, \quad \frac{\partial C_2}{\partial r} \Big|_{r=b^*} = 0,$$

граничные условия по z выглядят так:

$$\bar{v}^* C_2 - D \frac{\partial C_2}{\partial z} \Big|_{z=0} = 0, \quad \bar{v}^* C_2 - D \frac{\partial C_2}{\partial z} \Big|_{z=l_2} = 0,$$

начальное условие обусловлено равенством концентраций C_1 и C_2 в момент $t = \hat{t}$:

$$C_2 \Big|_{t=\hat{t}} = C_1(\hat{t}),$$

где C_2 — концентрация пробы при $t \geq \hat{t} = l_1 / \bar{v}^*$.

В этих условиях выражение для силы тока (2) в различные интервалы времени будет выглядеть по-разному:

$$i = n \cdot F \int_a^b \left[-\frac{\partial \bar{C}_1}{\partial t} + C_0 \bar{v} \right] r dr, \quad 0 \leq t \leq \hat{t},$$

$$i = n \cdot F \int_a^b \left[-\frac{\partial C_2}{\partial t} \right] r dr, \quad t \geq \hat{t},$$

где $\bar{C}_k = \int_0^{l_2} C_k dz$, $k = 1, 2$.

Поскольку нас интересует не абсолютная величина концентраций C_1 и C_2 , а величины \bar{C}_1 и \bar{C}_2 , проинтегрируем уравнения (5) и (6) по z на интервале $[0; l_2]$ с учетом соответствующих граничных условий по z . Далее, последовательно решая задачи (5) и (6) методом Гринберга [9], получим выражения для силы тока:

$$i = nF \sum_k \left[1 - e^{-\lambda_k t} \right] \frac{\bar{v}^* C_0 L_k^2}{N_k}, \quad 0 \leq t < \hat{t}, \quad (7)$$

$$i = nF \sum_k \left[e^{-\lambda_k (t - \hat{t})} - e^{-\lambda_k t} \right] \frac{\bar{v}^* C_0 L_k^2}{N_k}, \quad t \geq \hat{t},$$

где λ_k — корни следующего уравнения:

$$\frac{J_0 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} a \right]}{N_0 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} a \right]} = \frac{J_1 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} b \right]}{N_1 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} b \right]},$$

$$L_k = \int_a^b r R_k dr,$$

$$R_k = J_0 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} r \right] - \frac{J_1 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} b \right]}{N_1 \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} b \right]} N \left[\sqrt{\frac{\lambda_k}{D}} r \right],$$

$$N_k = \int_a^b R_k R_k r dr, \quad C_0 — \text{концентрация вещества в пробе, } t —$$

момент окончания поступления пробы в канал детектора.

Выражение (7) является откликом детектора, т.е. временной зависимостью электрического тока, обусловленной прохождением пробы через детектор.

Варьируя параметры детектора и режим его работы, а именно: длину капилляра l_1 , диаметр капилляра $2a$, диаметр электрода $2b$, объем пробы, скорость потока-носителя \bar{v} , можно получить временные зависимости тока детектора $i(t)$, т.е. рассчитать параметры формы, длительность и амплитуду сигнала (пика) амперометрического детектора. Таким образом, зависимости параметров формы, длительности и амплитуды пиков от параметров детектора и режима его работы, получаемые с помощью модели (7), позволяют однозначно найти условия достижения постоянства предельного тока в течение минимально необходимого интервала времени, т.е. найти оптимум, доставляющий максимальную производительность ПИА, при необходимой достоверности анализа.

Результаты моделирования

Выше отмечалось, что основной характеристикой проточного амперометрического детектора является величина предельного тока, соответствующая сигналу в цепи детектора при потоке „бесконечной“ пробы ($I_1 \gg I_2$) с некоторой концентрацией электроактивного вещества. При работе в системе ПИА необходимо выбрать такие гидродинамические и конструктивные параметры детектора, при которых амплитуда сигнала была бы близка к величине предельного тока при минимально возможной длительности пика и при наличии постоянства предельного тока в течение заданного временного интервала.

В связи с этим с помощью предложенной модели рассчитаны зависимости амплитуд аналитических пиков и их длительностей от соотношений размеров элементов коаксиального детектора a/b и l_1/l_2 , а также скорости прохождения пробы через детектор \bar{v} .

При моделировании были приняты следующие значения: концентрация носителей зарядов $C_0 = 0.6 \cdot 10^{21} \text{ 1/м}^3$, коэффици-

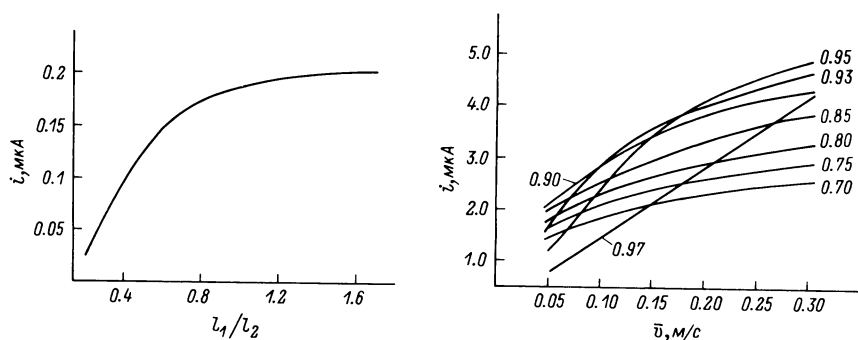


Рис. 3. Зависимость величины предельного тока амперометрического детектора от отношения длины столбика пробы l_1 к длине электрода l_2

Рис. 4. Зависимость величин амплитуд предельных токов детектора от скорости транспортирования пробы \bar{v} при различных отношениях радиуса электрода a к радиусу капилляра b

ент диффузии зарядов в пробе $D = 1.1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, длина электрода $l_2 = 0.09 \text{ м}$ и внутренний диаметр капилляра $2b = 0.001 \text{ м}$.

На рис. 3 приведена зависимость отклика детектора от величины отношения длины столбика пробы l_1 к длине электрода l_2 . Моделирование проведено при $a/b = 0.9$ и скорости $\bar{v} = 0.125 \text{ м/с}$. Из зависимости следует, что по мере увеличения длины столбика пробы l_1 (фиксирована длина электрода l_2) амплитуда токов растет вплоть до $l_1/l_2 = 1.7$. Последующее увеличение объема пробы не приводит к увеличению максимального тока, что объясняется происхождением пробы через детектор без размывания ее центральной части. Расчеты отклика также показывают, что вершины пиков тока детектора из остроконечных начинают утолщаться при отношении $l_1/l_2 > 1.2$ и по достижении значения $l_1/l_2 = 1.6$ предельный ток поддерживается постоянным в течение 0.1 с. Отношение $l_1/l_2 > 2$ выбирать нецелесообразно. Действительно, величина отношения $l_1/l_2 \approx 2$ обеспечивает длительность плоской вершины пика в течение 0.3 с, что позволяет при современном быстродействии аналого-цифровых и вычислительных устройств оценивать амплитуду пика, соответствующую предельному току, с требуемой точностью. Длительность пика тока детектора при этом позволяет достигать производительности ПИА до 600 проб/ч. Кроме этого, из зависимости на рис. 3 видно, что при вели-

чине отношения $I_1/I_2 \approx 2$, амплитуда предельного тока уже не зависит от объема пробы, что, в свою очередь, позволяет снизить требования к точности дозирующих пробу устройств.

На рис. 4 приведены зависимости амплитуды пиков тока детектора от скорости транспортирования пробы \bar{v} при изменении отношения a/b от 0.7 до 0.97. Видно, что при фиксированном отношении a/b в рабочем интервале скоростей \bar{v} амплитуда пика тока монотонно растет с ростом скорости потока \bar{v} . Увеличение отношения радиуса проволоочки к радиусу капилляра a/b (при постоянном радиусе капилляра) на изменении амплитуды пика сказывается двояким образом: с одной стороны, увеличение отношения a/b ведет к увеличению площади поверхности электрода, что должно вести к росту максимального тока, с другой стороны, фактическое утолщение электрода ведет к „схлопыванию“ объема свободной фазы, что при постоянной скорости потока транспортной среды \bar{v} означает уменьшение поступления количества вещества пробы в канал в единицу времени, и, следовательно, уменьшение величины постоянного тока. В сумме эти две противодействующие тенденции ведут к тому, что с ростом отношения a/b зависимость максимального тока от скорости потока становится более крутой: при малых скоростях сказывается „нехватка“ вещества в канале, поэтому с ростом a/b ток падает, при больших скоростях, когда вещества в канал накачивается достаточно, электрод с большей поверхностью (большим отношением a/b) дает больший ток. Другими словами, при параметрах $a/b = 0.93$ (скорость $\bar{v} = 0.05-0.1$ м/с) и $a/b = 0.95$ (скорость $\bar{v} = 0.05-0.15$ м/с) детектор переходит из амперометрического режима в кулонометрический, а при $a/b = 0.97$ во всем диапазоне скоростей существует кулонометрический режим.

Таким образом, моделирование функции отклика детектора позволяет установить соотношения геометрических и гидродинамических характеристик, соответствующих оптимуму, при котором обеспечивается достоверность и высокая производительность ПИА. Действительно, условие постоянства предельного тока в ПИА ($I_1/I_2 \approx 2$) обеспечивает существенное демпфирование флуктуаций амплитуды пиков, обусловленных погрешностями дозирующих пробу устройств. При этом, если верхняя граница обсуждаемого условия значительно не превышает, то теоретически достижимая производительность ПИА сохраняется. Кроме этого необходимо отметить, что оценка амплитуды пика тока детектора в данном случае сводится к наиболее простой задаче оценивания — к оцениванию величины постоянного тока.

Что касается выбора оптимального отношения a/b и скорости транспортирования пробы через детектор \bar{v} , то модель (7) позволяет по заданным коэффициенту диффузии носителей зарядов в пробе и ее объему однозначно определить параметры детектора и режима его работы (a ; b ; I_1 и \bar{v}). Наибольшая чувствительность (предельный ток) достигается увеличением диаметра электрода. Существенная зависимость величины предель-

ного тока от скорости транспортирования пробы как в амперометрическом, так и в кулонометрическом режимах, требует ее высокой стабильности, причем абсолютная величина скорости должна обеспечивать мажорирование диффузионной составляющей потока носителей зарядов на электрод.

Выбор оптимальных размеров детектора коаксиального типа для проточно-инжекционного варианта ИФА

Объем проб в твердофазном ИФА лежит в пределах 50—200 мкл, поэтому в данном примере приведены расчеты конструкции коаксиального детектора для объема анализируемых проб, равного 50 мкл.

Поскольку оптимальное соотношение объема пробы к внутреннему объему коаксиальной системы детектора ≈ 2 , то объем системы должен быть 25 мкл. Выбрав внутренний диаметр капилляра равным 1.0 мм и принимая во внимание величину оптимального отношения a/b , получим, что диаметр электрода должен быть равен 0.9 мм. Далее по известным размерам коаксиальной системы найдется длина электрода, которая в данном случае ≈ 166 мм. Техническое исполнение такой системы проблематично, поэтому целесообразно уменьшить диаметр электрода до 0.8 мм, при этом его длина составит ≈ 90 мм.

Для электрохимической регистрации фермента-маркера (пероксидазы) по продукту реакции перекисного окисления — молекулярному иоду ($D = 1.1 \cdot 10^{-9}$ м²/с) скорость транспортирования пробы должна быть $\bar{v} \approx 0.2-0.3$ м/с).

В заключение можно сформулировать некоторые основополагающие положения по оптимизации электрохимических детекторов и выводы.

В статье сформулирован критерий оптимизации электрохимических детекторов, заключающийся в том, что конструкция детектора и режим его работы должен обеспечивать достижение постоянства предельного тока в течение минимально необходимого временного интервала для оценивания амплитуды сигнала. Оптимизация детекторов по данному критерию позволяет достичь максимальной производительности ПИА при заданной достоверности оценивания величины концентраций электроактивных веществ.

Предложена модель электрохимического детектирования, позволяющая численно получать адекватный временной отклик детектора, обусловленный имитацией прохождения пробы через детектор. Модель позволила исследовать зависимости параметров формы, длительности и амплитуды пиков от параметров детектора и режима его работы. Указанная модель может быть легко модифицирована и для других типов электрохимических детекторов, например, трубчатого, конусного и др.

Моделирование позволило установить существование режима работы детектора, при котором не только достигается оптимум, максимальная производительность — заданная достовер-

ность анализа, но и при котором существенно демпфируются флуктуации амплитуды сигнала, обусловленные флуктуациями объема инжектируемых проб. Установленное положение позволяет снижать в известных пределах требования к точности дозирующих пробу устройств.

Выполнена оптимизация детектора коаксиального типа для проточно-инжекционного варианта твердофазного ИФА, которая позволила достичь производительности не менее 360 проб/ч при СКО случайной составляющей погрешности не более 0.5 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stúlik K., Pacaková V.* // *Ann. Chim.* — 1986. — V. 76. N 9, 10 — P. 315-322.
2. *Ruzicka J., Hansen E.H.* *Flow injection analysis*, New York, Wiley Intersc., 1981.
3. *Kemula W., Kuthner W.* / *Modern Trends // Anal. Chem.*, Pt. A-B., Budapest. — 1984. — 1984. — P. A3-A31.
4. *Vamada J., Matsuda H.* // *J. Electroanal. Chem.* — 1973. — V. 44, — P. 189.
5. *Ситдыков Р.А., Иеницкий Д.М., Агасян П.К., Рейфман Л.С.* // *ЖАХ.* — 1989. — Т. 44. — № 8 — С. 1457-1461.
6. *Elbicky J.M., Morgan M.D., Weber S.* // *Anal. Chem.* — 1984. — V. 56. — N 6. — P. 978-985.
7. *Ненекamp Н.В., Van Nieuwkerk* // *Anal. Chim. Acta.* — 1980. — V. 121. — P. 13-22.
8. *Ситдыков Р.А., Курочкин В.Е., Иеницкий Д.М., Рейфман Л.С.* // *Научное приборостроение: сб. научн. тр.* — Л.: Наука. — 1990. — С. 93-99.
9. *Жукова-Малицкая Г.А., Кузьмин Ю.Н.* *Задачи по математической физике.* — Л.: ЛПИ им. М.И. Калинина, 1976. — С. 116.

Рукопись поступила 10.10.90