

УДК 543.422.5; 543.432; 537.363

© М. А. Проскурнин, М. А. Нечаев, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун

## ДЕМОНСТРАЦИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ (УРАЦИЛА И ХРОМАТ-ИОНОВ) НА ПРИБОРЕ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА МИКРОЧИПАХ SHIMADZU MCE-2010

В результате испытаний прибора для электрофореза на микрочипах Microchip Electrophoresis System MCE-2010 фирмы Shimadzu найдены условия получения воспроизводимых пиков урацила и хромата как модельных низкомолекулярных соединений. Показано, что прибор MCE-2010 характеризуется экспрессностью электрофоретического разделения и высокой воспроизводимостью времени выхода и площади пиков. Достигнуто 7–10-кратное повышение экспрессности определения по сравнению с традиционным капиллярным зонным электрофорезом. Пределы обнаружения урацила и хромата составляют 2 и 1 мкг/мл соответственно.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время появляются первые коммерческие приборы, в которых в аналитическом цикле для пробоподготовки, разделения и определения используют микрофлюидные чипы. Для многих из них все еще отсутствует методологическое и метрологическое обеспечение, что препятствует их внедрению в широкую практику химического анализа. Прибор для электрофореза на микрочипах Microchip Electrophoresis System MCE-2010 фирмы Shimadzu, появившийся в продаже в 2004 году, реализует высокоскоростной электрофоретический анализ в микроформате [1]. Хотя эта система использует те же принципы, что и капиллярный электрофорез, она обеспечивает высокоскоростное разделение с чрезвычайно малым расходом рабочего буфера и пробы [2]. Кроме того, разделительный канал короче и обеспечивает лучшее рассеивание тепла в сравнении с обычным капиллярным электрофорезом. Однако для данного прибора в настоящее время существуют только методики разделения и определения ДНК и подобных биологических объектов [2–4].

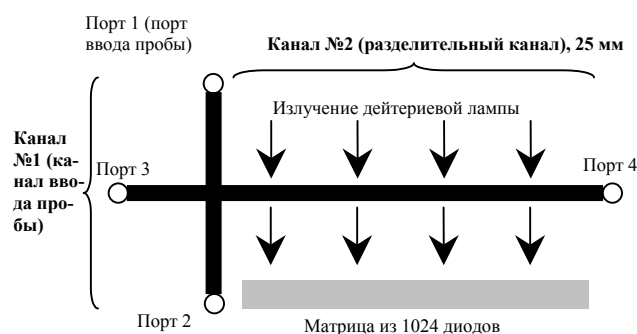
В данной работе исследована возможность электрофоретического определения низкомолекулярных веществ на микрочипах. Отсутствие методик для этих веществ существенно ограничивает применение MCE-2010. В качестве модельных соединений выбраны урацил и хромат калия. Урацил часто используют в хроматографии в качестве маркера мертвого времени удерживания. Пик его имеет симметричную форму, что позволяет оценивать размывание. Хромат часто используют в качестве буферного электролита в капиллярном электрофорезе. Кроме того, эти вещества хорошо поглощают УФ-излучение и для них существуют

надежные методики определения методом капиллярного электрофореза [5, 6].

### АППАРАТУРА, РЕАГЕНТЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

#### Характеристики прибора

Shimadzu MCE-2010 способен автоматически проводить электрофоретическое разделение и детектирование в микроканалах, изготовленных в микрочипах на кварцевой подложке методом фотолитографии. В качестве источника излучения используется дейтериевая лампа, монохроматором служит дифракционная решетка. Рабочий диапазон длин волн 190–370 нм. Детектором служит фотодиодная матрица, состоящая из 1024 элементов (минимально определяемая оптическая плотность  $1 \times 10^{-5}$ ) [1, 2]. В работе использована длина волны 254 нм как наиболее часто используемая в капиллярном электрофорезе.



**Рис. 1.** Схема микрочипа прибора для электрофореза на микрочипах Shimadzu MCE-2010

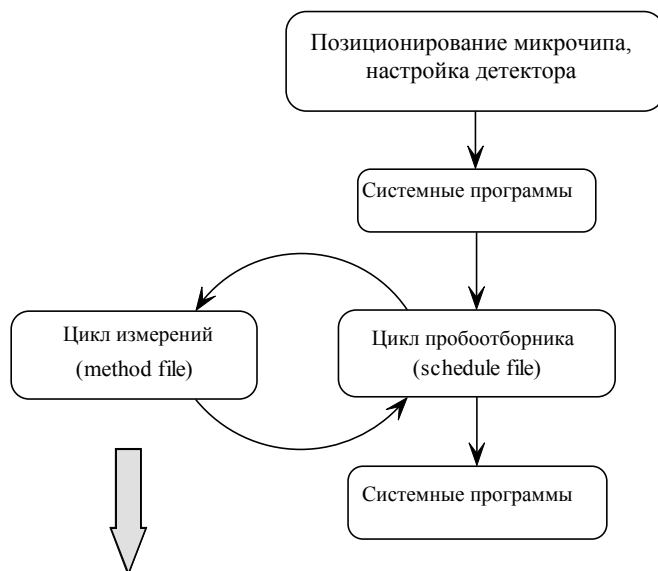
На рис. 1 представлена схема микрочипа для электрофоретического разделения. Вследствие того что фотодиодная матрица проводит одновременное измерение по всей длине разделительного канала в течение всего процесса разделения, вместо традиционной временной шкалы в электрофореграммах, получаемых на Shimadzu MCE-2010, ось абсцисс имеет размерность длины и ее масштаб неизменен (25 мм — длина разделительного канала, рис. 1).

В работе использован микрочип для общего анализа Shimadzu Type U[50-20] (ширина каналов — 50 мкм, глубина — 20 мкм). Паспортное число теоретических тарелок 100 000 тт/м.

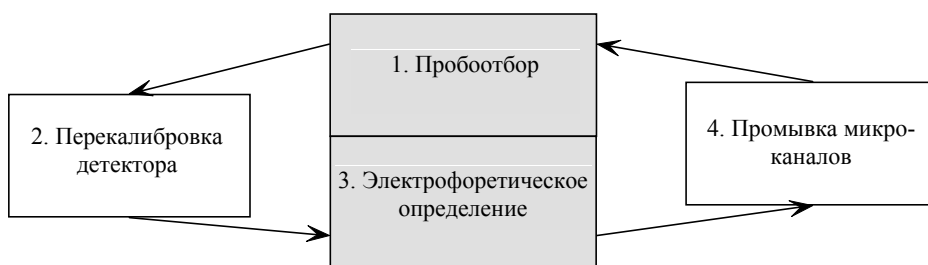
### Программное обеспечение MCE-2010

Управление прибором (в том числе извлечение и установка чипа) полностью контролируется программным обеспечением компьютера, подключенным к MCE-2010. Общий цикл измерений представлен на рис. 2. Он состоит из позиционирования микрочипа относительно фотодетектора вдоль и поперек канала, измерения фонового поглощения пустого микрочипа и проверки работоспособности проточной системы (т. н. блок "перекалибровки детектора") [2]. Далее выполняются системные программы и управление передается программам аналитического цикла: общей программы действий и цикла измерений (рис. 2).

### Общая программа действий:



### Цикл измерений:



**Рис. 2.** Принципиальная схема цикла аналитических измерений на приборе для электрофореза на микрочипах Shimadzu MCE-2010

Файлы общей программы действий (schedule file) содержат информацию о числе анализируемых проб и последовательности их измерений и о соответствующих файлах цикла измерений и отчета. Последовательность операций анализа одной пробы задается файлами цикла измерений (method file, рис. 2). В них содержится информация о дополнительных (опционных) системных операциях: промывка системы водой, буферным раствором, параметры системы при детектировании (тип чипа, рабочая длина волны, полярность, объем пробы и буферного раствора, напряжение на капиллярах на каждой стадии анализа, продолжительность каждой стадии и т. д.), параметры обработки полученной информации (необходимо ли вычитание фона и т. п.).

### Реагенты

В работе использована деионизованная вода с удельным сопротивлением 18 МОм·см (рН 5.8, установка очистки воды Milli-Q, Millipore, Франция). Все использованные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. В качестве рабочего буферного электролита использованы трис-боратные буферные растворы (50 мМ тетрабората натрия и 50 мМ трис(гидроксиметил)аминометана). Водные растворы урацила (0.8 мг/мл) и хромата калия (1.0 мг/мл) в соответствующем буферном растворе служили в качестве исходных.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие управляющие файлы (управления потоками и управления напряжениями на портах) оптимизированы в Shimadzu MCE-2010 для разделения и определения ДНК и микрочипов со специальным покрытием [3, 4]. Первые эксперименты показали, что параметры файлов цикла измерений, предлагаемые в руководстве к прибору [1] или имеющиеся в открытой печати для биологических методик [2–4], не пригодны для электрофоретического разделения низкомолекулярных веществ. В результате задачей работы был подбор параметров системы, которые позволили бы получать воспроизводимые пики выбранных модельных соединений. Кратко остановимся на основных моментах.

На чипе имеются перекрещивающиеся каналы: канал № 1 для ввода пробы, в канале № 2 происходит разделение компонентов. На чипе сделаны специальные углубления для ввода и вывода растворов, называемые "портами". При анализе пробы можно выделить три стадии. В стадии 1 на порт 1 прикладывается большое напряжение, а на порт 2 — нулевое. Напряжение на порты 3 и 4 подается равным и так, чтобы через них поток практически не шел. В результате электроосмотический поток движется только по первому каналу

в направлении порта 2 (электрофоретический ввод пробы). В стадии 2 высокое напряжение прикладывается к порту 3, и электроосмотический поток движется по (разделительному) каналу № 2 в направлении порта 4. На стадии 3 напряжение на всех портах устанавливается нулевым и происходит фотометрическое детектирование вдоль всего канала в течение некоторого заданного времени (для улучшения соотношения сигнал-шум).

Основными изменяемыми параметрами были напряжения на капиллярах. В отличие от разделения биомолекул ввод в микрочип пробы объемом свыше 10 мкл приводит к возникновению большого пика или плато, окруженного отрицательными пиками. Причиной этого является, по-видимому, попадание пробы в разделительный канал на стадии ввода пробы и/или затягивание пробы в стадии 2 из канала ввода пробы в течение всего процесса разделения. Для минимизации этих процессов напряжения в стадии 2 на портах 3 и 4 увеличены по сравнению с определением биомолекул [2–4] для дополнительного сжатия зоны пробы (см. таблицу). Аналогично напряжения на портах 1 и 2 уменьшены для увеличения оттока пробы из канала 1. Оптимальный объем пробы для обоих модельных соединений составил 5 мкл.

Следует отметить, что работа прибора становится нестабильной при повышении напряжений на канале выше 1.4 кВ, а при токах порядка 800–1000 мкА прибор автоматически отключается. Таким образом, при электрофоретическом разделении низкомолекулярных веществ приходится исходить из компромисса между высокими напряжениями на портах (узкая зона пробы) и нестабильной работой системы разделения или увеличением размывания пробы.

Оптимальный объем буферного раствора для разделения и определения одной пробы, составил 100 мкл, что полностью соответствует имеющимся данным [2–4]. Однако рекомендация промывания системы между анализами рабочим буферным раствором [2] приводила к снижению воспроизводимости результатов из-за различных значений токов в системе. Существенно лучшие результаты (форма пика и воспроизводимость) получали при двукратной промывке системы водой после каждого анализа (системная программа "water purge" [1], длительность 3 мин, 500 мкл воды). Поэтому в файле общей программы действий добавлена команда системе производить системную промывку "water purge" перед и после каждого анализа. Общее время анализа одной пробы составило, таким образом, 7 мин.

Параметры полученного файла цикла измерений для урацила представлены в таблице, типичная электрофореграмма представлена на рис. 3, а. Экспериментальное значение эффективности разделения составило 40 000 тт/м. По сравнению

Условия электрофоретического определения урацила и хромат-ионов на МСЕ-2010 и некоторые метрологические характеристики определения ( $P = 0.95$ ,  $n = 3$ ). Объем пробы 5 мкл, объем буферного раствора, расходуемого на одну пробу, — 100 мкл

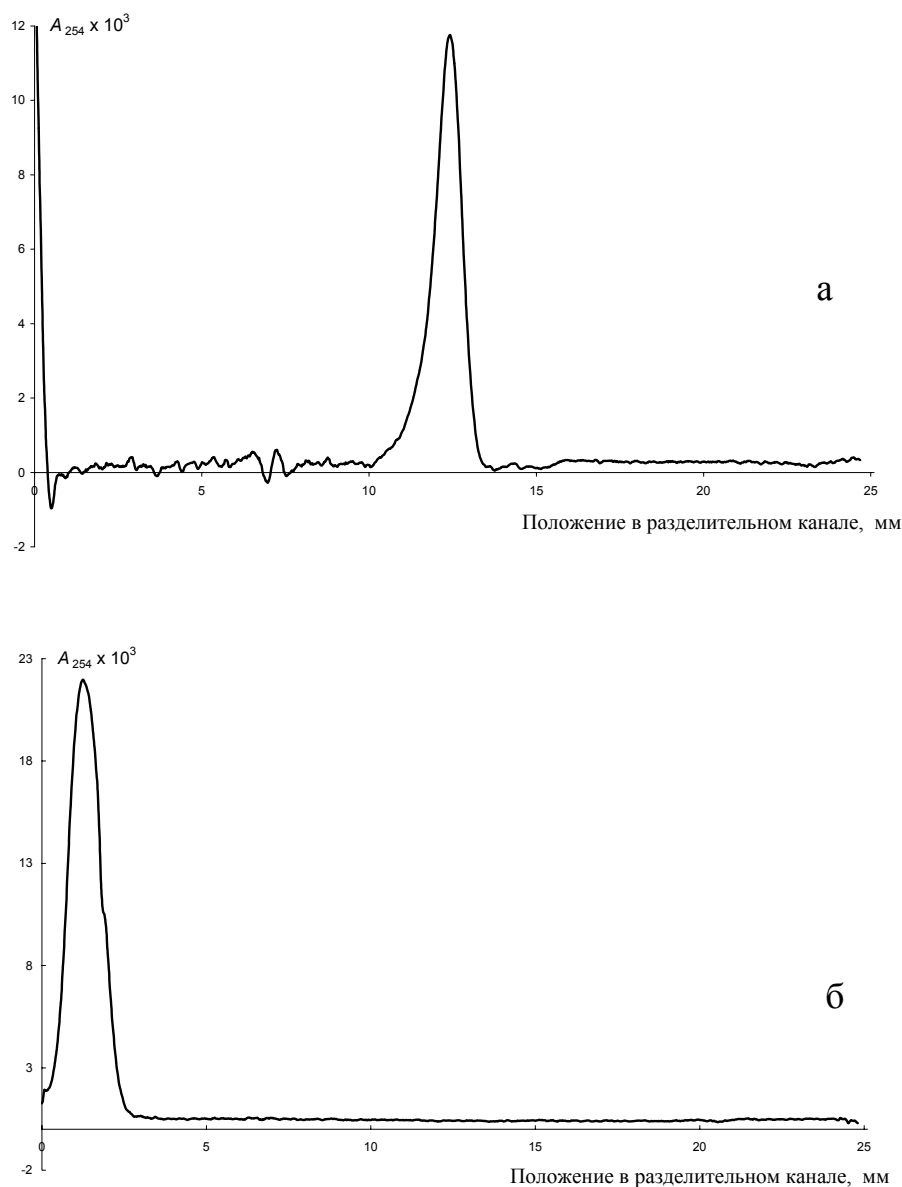
Параметр системы	Урацил	Хромат-ионы
Время ввода пробы (стадия 1), с	3	7
Время электрофоретического разделения в разделительном канале (стадия 2), с	40	45
Время накопления окончательной электрофореграммы (стадия 3), с	20	25
Суммарное время измерений, с	65	85
Приложенное напряжение на канал № 1 на стадии электрофоретического ввода пробы (стадия 1), кВ	0.3	0.45
Приложенное напряжение на канал № 2 на стадии электрофоретического ввода пробы (стадия 1), кВ	0.25	0.35
Напряженность поля на канале 2 на стадии электрофоретического разделения (стадия 2), кВ/см	2.2	-0.4
Приложенное напряжение на порты 1 и 2 на стадии электрофоретического разделения (стадия 2), кВ	0.8	0.6
Среднее расстояние удерживания, мм	$12.0 \pm 0.1$	$0.11 \pm 0.03$
Предел обнаружения, мкг/мл	2	1
Абсолютный предел обнаружения, нг	10	5
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости времени выхода пика, %	2	0.4
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости площади пика (середина диапазона определяемых содержаний), %	5	0.5

с определением урацила в случае хромата все напряжения в стадии 2 немного уменьшены, что позволило достичь высокой воспроизводимости определения (см. таблицу). Наилучшая форма пиков получалась при низкой (порядка 1–3 кВ) разности потенциалов между портами 3 и 4 на стадии 2. Также к улучшению результатов привело увеличение времени накопления информации (стадия 3) с 20 до 25 с. Параметры файла цикла измерений для хромат-ионов представлены в таблице, типичная электрофореграмма представлена на рис. 3, б. Суммарно время разделения и определения составляет 65–85 с в зависимости от определяемого соединения, т. е. в 7–10 раз быстрее, чем для традиционного капиллярного зонного электрофореза при определении этих соединений [5, 6]. Достигнутые пределы обнаружения — 2 и 1 мкг/мл — находятся на уровне пределов обнаружения этих

веществ при помощи капиллярного электрофореза [5, 6].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных испытаний системы Shimadzu МСЕ-2010 найдены условия получения воспроизводимых пиков урацила и хромата в качестве модельных соединений. Показано, что прибор характеризуется экспрессностью электрофоретического разделения и высокой воспроизводимостью времени выхода и площади пиков. Достигнуто 7–10-кратное повышение экспрессности определения по сравнению с традиционным КЗЭ. Однако разработка полных методик определения этих веществ методом капиллярного электрофореза на микрочипе требует дальнейших экспериментов.



**Рис. 3.** Определение урацила (0.8 мг/мл) (а) и хромата (0.78 мг/мл) (б) в буферном растворе (50 мМ тетрабората натрия и 50 мМ трис). Объем пробы — 5 мкл, объем буферного раствора — 100 мкл. Длина волны — 254 нм. Другие параметры разделения представлены в таблице

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MCE-2010 Instruction Manual. Kyoto: Shimadzu Corporation, 2002. 190 p.
2. Arai A., Nishine T., Fujiwake H. Development of Microchip Electrophoresis and Its Applications // *Bunseki Kagaku*. 2002. V. 58, N 3-4. P. 101–109.
3. Xu Z., Nishine T., Arai A., Hirokawa T. Performance of Electrokinetic Supercharging for High-Sensitivity Detection of DNA Fragments in Chip Gel Electrophoresis // *Electrophoresis*. 2004. V. 25, N 21-22. P. 3875–3881.
4. Shintani T., Torimura M., Sato H., Tao H., Manabe T. Rapid Separation of Microorganisms by Quartz Microchip Capillary Electrophoresis // *Anal. Sci.* 2005. V. 25, N 1. P. 57–60.
5. Salerno C., d'Eufemia P., Celli M., Finocchiaro R., Crifo C., Giardini O. Determination of Urinary Orotic Acid and Uracil by Capillary Zone Electrophoresis // *J. Chromatogr. B. Biomed.*

- Appl. 1999. V. 734, N 1. P. 175–178.  
6. Thornton M.J., Fritz J.S. Separation of Inorganic Anions in Acidic Solutions by Capillary Electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1997. V. 770. P. 301–310.

*Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, химический факультет*

Материал поступил в редакцию 20.04.2005.

## **DEMONSTRATION OF THE POSSIBILITY OF DETERMINATION OF LOW-MOLECULAR ANALYTES (URACIL AND CHROMATE IONS) ON A SHIMADZU MCE-2010 MICROCHIP ELECTROPHORESIS SYSTEM**

**M. A. Proskurnin, M. A. Nechaev, A. V. Pirogov, O. A. Shpigun**

*Chemical Department, Moscow State University*

The traceable conditions for the detection of uracil and chromate peaks as test model low-molecular analytes using a Shimadzu MCE-2010 Microchip Electrophoresis System were found. It is shown that the MCE-2010 shows high speed of electrophoretic separation and high reproducibility of the peak emergence times and areas. A 7- to 10-fold improvement in the analysis time compared to conventional capillary-zone electrophoretic separation is achieved. The limits of detection of uracil and chromate are 2 and 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.