

На правах рукописи

Почекутов Алексей Александрович

ЭЛЕКТРОДИФФУЗИОННЫЕ ГРАДИЕНТЫ
КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ
РАЗДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

03.00.02 — биофизика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск–2003

Работа выполнена на кафедре биофизики Красноярского государственного университета

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Хлебопрос Рем Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
Гуревич Юрий Леонидович,
доктор физико-математических наук,
профессор Захаров Юрий Владимирович

Ведущая организация: Институт вычислительного моделирования
СО РАН, г.Красноярск

Защита состоится «_____» _____ 2004 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 в Институте биофизики
СО РАН по адресу: 600036, Красноярск, Академгородок

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики
СО РАН

Автореферат разослан «_____» _____ 2004 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
к.ф.-м.н.

Л.Г.Косолапова

Общая характеристика работы

Актуальность работы. В биофизике, молекулярной биологии и биохимии большое значение имеют методы фракционирования, концентрирования и идентификации веществ биологического происхождения. Многие из этих веществ являются слабыми электролитами, благодаря чему широкое распространение получили электрофоретические методы их разделения и очистки. Для веществ цвиттер-ионной природы, прежде всего белков, особенно эффективен метод изоэлектрического фокусирования, позволяющий с высокой точностью разделять вещества на основе различия их изоэлектрических точек (которые для белковых молекул являются практически индивидуальной характеристикой каждого вида белков). Основной трудностью этого метода является создание градиента рН, в котором проводится электрофорез разделяемых молекул.

Существует ряд методов создания градиентов рН для изоэлектрического фокусирования, но все они обладают теми или иными недостатками и ограничениями. Поэтому актуальна задача разработки новых методов создания градиентов рН для изоэлектрического фокусирования.

Для слабых электролитов не цвиттер-ионной природы также актуальна задача разработки методов их разделения, подобных изоэлектрическому фокусированию, то есть позволяющих фокусировать вещества в узкие, не уширяющиеся в процессе фракционирования зоны, разделяя вещества на основе их индивидуальных характеристик (таких, например, как константа диссоциации).

Цель работы. Теоретическое исследование электродиффузионных (формирующихся за счёт электромиграции и диффузии ионов электролита) градиентов концентраций ионов, в частности, градиентов рН, в неподвижной и движущейся среде. Теоретическое исследование пригодности таких градиентов в качестве градиентов рН для изоэлектрического фокусирования и возможных модификаций этого метода. Теоретическое исследование возможности электрофокусирования неамфотерных слабых электролитов.

Задачи исследования. Решение уравнений, описывающих электродиффузионные распределения концентраций ионов в неподвижной и в движущейся среде. Анализ полученных решений в аспекте пригодности этих распределений концентраций ионов в качестве градиентов рН для изоэлектрического фокусирования и его возможного аналога для неамфотерных слабых электролитов. Решение уравнений, описывающих распределение концентрации слабого электролита в среде, движущейся относительно градиента концентрации рабочих ионов. Теоретическое описание электрофокусирования слабых электролитов в среде, движущейся относительно градиента концентрации рабочих ионов. Определение необходимых и до-

статочных условий фокусирования.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе уравнений электродиффузии получены формулы, позволяющие рассчитывать форму самоформирующихся стационарных электродиффузионных градиентов концентраций ионов в неподвижной и в движущейся среде.
2. Теоретически показано, что электродиффузионные градиенты рН могут использоваться для изоэлектрического фокусирования белков и других амфотерных цвиттер-ионов.
3. Теоретически показана возможность электрофокусирования слабых электролитов в среде, движущейся относительно градиента концентрации рабочих ионов.

Научная новизна. Проведено исследование решений электродиффузионных уравнений, описывающих распределение концентраций ионов электролита в электрофоретической камере. Определены необходимые и достаточные условия, при которых эти уравнения имеют точное электронейтральное решение. Получено приближённое решение для случаев несоблюдения строгой электронейтральности.

Предложен метод электрофокусирования слабых электролитов в среде, движущейся относительно градиента концентрации рабочих ионов. Определены необходимые и достаточные условия фокусирования. Проведено теоретическое исследование электродиффузионных градиентов концентраций ионов, которые могут быть предложены для использования в этом методе.

Практическая значимость работы. Проведённое исследование электродиффузионных распределений концентраций ионов свидетельствует о применимости их в качестве градиентов рН для изоэлектрического фокусирования, что является вкладом в доведение до практического использования электродиффузионного метода создания градиента рН для изоэлектрического фокусирования.

Предложенный метод электрофокусирования слабых электролитов может быть эффективен для разделения неамфотерных слабых электролитов биологического происхождения.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 статей и тезисов докладов.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на III, IV и VI Всероссийских семинарах «Моделирование неравновесных систем» (Красноярск, 2000, 2001, 2003 гг.).

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 109 страницах машинописного текста, включая 13 рисунков и список литературы из 52 наименований.

Содержание работы

Глава 1. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

Метод изоэлектрического фокусирования предназначен для разделения веществ, являющихся амфотерными цвиттер-ионами, прежде всего белков, на основе различия их изоэлектрических точек pI (значений pH , при котором кислые и основные ионогенные группы цвиттер-иона диссоциированы в равной мере и его суммарный заряд равен нулю). Изоэлектрическое фокусирование представляет собой электрофорез в среде с градиентом pH , в результате которого разделяемые вещества концентрируются в узкие стабильные зоны там, где pH среды равняется pI сконцентрированного вещества. Поскольку значения pI являются практически индивидуальными характеристиками всех видов белков, изоэлектрическое фокусирование весьма эффективно для разделения белковых молекул.

Существуют различные методы создания градиентов pH для изоэлектрического фокусирования. Каждому из этих методов свойственны свои преимущества и недостатки.

Электродиффузионный метод создания градиентов pH , которому посвящена настоящая работа, исследовался мало; исторически сложилось мнение о его неперспективности. Тем не менее, в экспериментах С.Поллака¹ и в нашей работе [4] демонстрировалась возможность изоэлектрического фокусирования белков в градиентах pH , самоформирующихся за счёт электродиффузии ионов, и достаточная стабильность таких градиентов.

Глава 2. ЭЛЕКТРОДИФФУЗИОННЫЕ ГРАДИЕНТЫ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ В НЕПОДВИЖНОЙ СРЕДЕ

Электродиффузионные градиенты концентраций ионов могут создаваться в установке, общая принципиальная схема которой показана на рисунке 1. Градиенты концентраций ионов создаются за счёт различия концентраций соответствующих ионов на границах электрофоретической камеры. Значения концентраций ионов на границах электрофоретической камеры могут поддерживаться с помощью электродных камер, заполненных растворами электролита с заданными концентрациями ионов.

При поддержании постоянных концентраций ионов на границах камеры и постоянстве внешнего электрического поля система со временем придёт в стационарное состояние, в котором (при отсутствии конвекции и химических реакций в электрофоретической камере) распределение концентраций ионов и электрическое поле будут описываться системой, состоящей из

¹Pollack S. Isoelectric Focusing without Ampholyte // Biochemical and Biophysical Research Communications, 1979, V.87, № 4 — pp.1252–1255

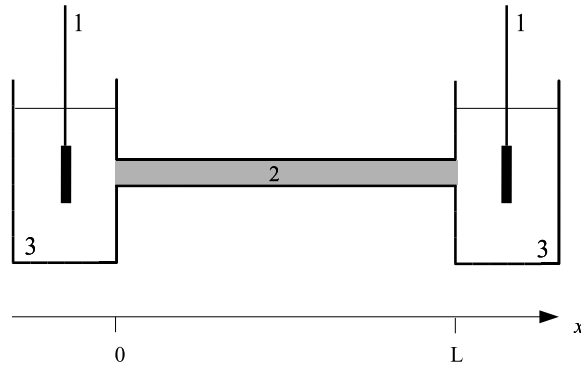


Рис. 1: Принципиальная схема электрофоретической установки.
1 — электроды, 2 — электрофоретическая камера, 3 — электродные камеры.

уравнений Нернста-Планка (n уравнений для n видов ионов в системе) и уравнения Пуассона:

$$\begin{aligned} J_i &= -RTu_i \frac{dc_i(x)}{dx} + z_i u_i F E(x) c_i(x), \\ \frac{dE(x)}{dx} &= \frac{F}{\varepsilon \varepsilon_0} \sum_i z_i c_i(x), \end{aligned} \quad (1)$$

где x — координата (изменяется от 0 до L , где L — длина электрофоретической камеры); c_i — концентрация ионов i -того вида; J_i — поток ионов i -того вида; E — напряжённость электрического поля; u_i — подвижность ионов i -того вида; z_i — зарядовое число ионов i -того вида; F — постоянная Фарадея; R — универсальная газовая постоянная; T — температура; ε — диэлектрическая проницаемость растворителя; ε_0 — электрическая постоянная.

Граничные условия — заданы все значения $c_i(0)$ и $c_i(L)$, а также $E(0)$ либо разность потенциалов между границами электрофоретической камеры

$$\varphi_L = - \int_0^L E(x) dx.$$

Величины J_i фактически являются константами интегрирования стационарных уравнений массопереноса для i -того вида ионов и определяются только граничными условиями для $c_i(x)$ и $E(x)$. Поэтому стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов, имеющих одинаковый заряд, тождественны и неразличимы.

В случаях, когда E возможно выразить как функцию только от координаты, распределение концентраций ионов будет выражаться формулой

$$c_i(x) = e^{\mathcal{F}_i(x)} \left(c_i(0) - \frac{J_i}{RTu_i} \int_0^x e^{-\mathcal{F}_i(x)} dx \right), \quad (2)$$

где $\mathcal{F}_i(x) \equiv \frac{z_i F}{RT} \int_0^x E(x) dx$, а константа $\frac{J_i}{RTu_i} = \frac{c_i(0)e^{\mathcal{F}_i(L)} - c_i(L)}{\int_0^L e^{-\mathcal{F}_i(x)} dx}$.

Ограничимся в дальнейших выкладках системами, в которых валентность всех ионов одинакова: $|z_i| = z \quad \forall i$.

В таких случаях система уравнений (1) сводится к трём уравнениям:

$$\begin{aligned} \frac{dc_+(x)}{dx} - \frac{zF}{RT} E(x) c_+(x) + I_+ &= 0, \\ \frac{dc_-(x)}{dx} + \frac{zF}{RT} E(x) c_-(x) + I_- &= 0, \\ \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{zF} \frac{dE(x)}{dx} &= (c_+(x) - c_-(x)); \end{aligned} \quad (3)$$

где $c_+(x)$ и $c_-(x)$ — суммы концентраций всех катионов и анионов соответственно, а I_+ и I_- — суммы всех констант $I_i = J_i/(RTu_i)$ для всех катионов и всех анионов.

Обозначим $c(x) \equiv c_+(x) + c_-(x) = \sum_{i=1}^n c_i(x)$. Заменой

$$r = \frac{x}{L}; \quad s_+(r) = \frac{c_+(x)}{c(0)}; \quad s_-(r) = \frac{c_-(x)}{c(0)}; \quad y(r) = \frac{zFL}{RT} E(x);$$

$$j_+ = \frac{I_+ L}{c(0)}; \quad j_- = \frac{I_- L}{c(0)}; \quad \mu^2 = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 RT}{z^2 F^2 L^2 c(0)}.$$

уравнения (3) преобразуются к безразмерному виду:

$$\frac{ds_+(r)}{dr} - s_+(r)y(r) + j_+ = 0, \quad (4a)$$

$$\frac{ds_-(r)}{dr} + s_-(r)y(r) + j_- = 0, \quad (4b)$$

$$\mu^2 \frac{dy(r)}{dr} = s_+(r) - s_-(r). \quad (4c)$$

Из уравнений (4) следует:

$$\mu^2 \frac{d^2 y(r)}{dr^2} - \frac{\mu^2}{2} y^3(r) + j \cdot y(r) \cdot r + b \cdot y(r) + j' = 0, \quad (5)$$

где $b \equiv \frac{\mu^2}{2}y^2(0) - 1$; $j = j_+ + j_- \equiv \frac{\mu^2}{2}(y^2(1) - y^2(0)) - (s_+(1) + s_-(1)) + 1$;
 $j' = j_+ - j_- \equiv -\mu^2 \frac{d^2y(r)}{dr^2} \Big|_{r=0} + y(0)$. Таким образом y и, следовательно,
 E выражаются в виде функций только от координаты. Подстановкой
 $\tilde{y} = \frac{1}{2} \sqrt[3]{\frac{\mu^2}{j}} y$, $\tilde{r} = -\sqrt[3]{\frac{\mu^4 jr + b}{j \mu^2}}$, $\alpha = -\frac{j'}{2j}$ уравнение (5) приводится к
виду:

$$\frac{d^2\tilde{y}(\tilde{r})}{d\tilde{r}^2} = 2\tilde{y}^3(\tilde{r}) + \tilde{y}(\tilde{r}) \cdot \tilde{r} + \alpha. \quad (6)$$

Это — второе уравнение Пенлеве. Решение его выражается соответствующими трансцендентными функциями Пенлеве. Функция $E(x)$ выражается через них.

Однако, приближённое, а в ряде случаев и точное решение системы (4) может быть получено значительно более простым способом, чем с использованием трансцендентных функций Пенлеве.

Важным свойством уравнений (4) является то, что множитель μ^2 чрезвычайно мал. Так, например, для водного раствора одновалентных ионов суммарной концентрацией $c(0) = 10^{-4}$ моль/л в камере длиной 0,1 м при температуре 300 К $\mu^2 = 1,9 \cdot 10^{-13}$. В то же время порядок других входящих в уравнения (4) величин применительно к условиям, в которых проводится электрофорез, можно оценивать как близкий к единице.

Исключение составляет случай постоянства электрического поля или концентраций ионов по всей длине камеры, но в этом случае из уравнений (4) сразу следует точное аналитическое решение, для рассмотрения которого величина константы μ^2 не важна.

В случаях, когда в электрофоретической камере точно соблюдается электронейтральность, $E(x) = E(0) = const$ и

$$c_i(x) = \frac{c_i(0) - c_i(L)}{1 - \exp\left(\frac{z_i F E}{RT} L\right)} \exp\left(\frac{z_i F E}{RT} x\right) + \frac{c_i(L) - c_i(0) \exp\left(\frac{z_i F E}{RT} L\right)}{1 - \exp\left(\frac{z_i F E}{RT} L\right)}; \quad (7)$$

в то же время, $c_+(x) = c_-(x) = const = c_+(0) = c_+(L) = c_-(0) = c_-(L)$.

Необходимым и достаточным условием строгой электронейтральности является равенство краевых условий для суммы концентраций анионов и суммы концентраций катионов

$$c_+(0) = c_+(L) = c_-(0) = c_-(L). \quad (8)$$

Градиенты концентраций ионов в электронейтральной системе можно получать, используя комбинации более чем двух видов ионов в системе. На рис. 2 и 3 показаны стационарные распределения концентраций ионов и градиент рН в электронейтральной трёхионной системе.

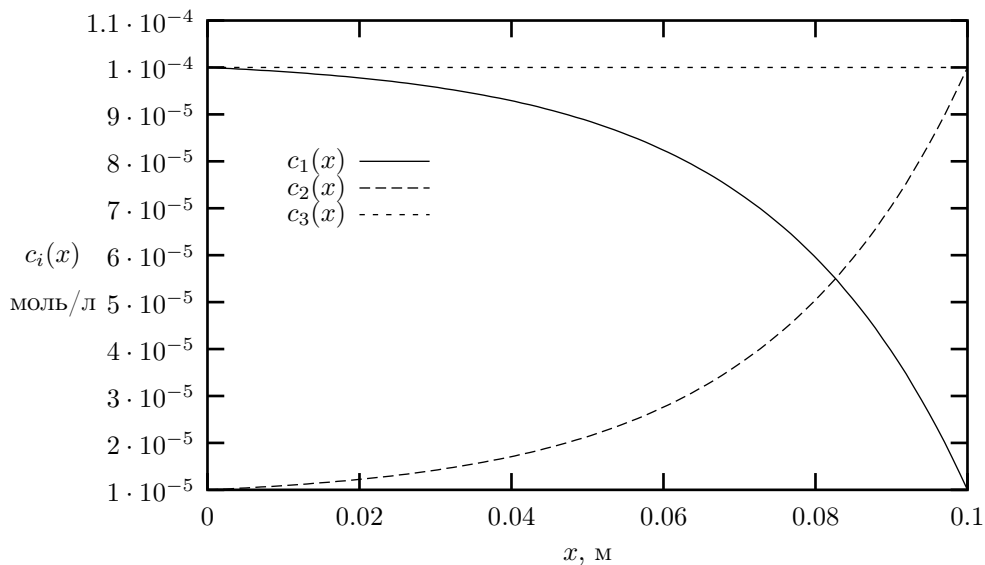


Рис. 2: Распределение концентраций ионов при $E = 1 \text{ В/м}$ в электронейтральной системе из трёх видов ионов, где $c_1 - [\text{H}^+]$, c_2 — произвольный катион, c_3 — произвольный анион.

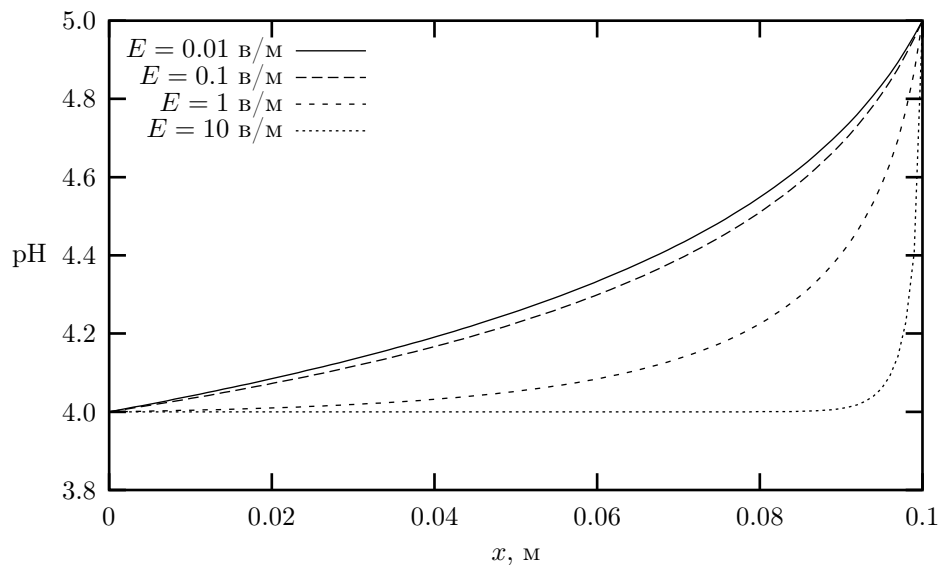


Рис. 3: Градиент рН в электронейтральной системе из трёх видов ионов при различных значениях напряжённости электрического поля E , В/м. 1. $E = 0,01$; 2. $E = 0,1$; 3. $E = 1$; 4. $E = 10$.

Пользуясь малостью множителя μ^2 , можно получить приближённое решение уравнений (4). Система уравнений (4) является сингулярно возмущённой. Согласно теории асимптотических разложений сингулярно возмущённых дифференциальных уравнений, решение задачи Коши и краевых задач для таких уравнений можно искать в виде разложения в ряд по степеням μ (малого множителя при производной). Теория асимптотических разложений для краевых задач такого класса, как, в частности, уравнения (4) с заданными значениями $s_+(0)$, $s_-(0)$, $s_+(1)$, $s_-(1)$, изложена в статье А.Б. Васильевой².

По методу асимптотических разложений было найдено приближённое решение уравнений (4) в нулевом приближении (т.е. с точностью до членов порядка μ^1). В качестве граничных условий были использованы значения, соответствующие концентрациям ионов в растворах, которыми заполняются электродные камеры:

$$s_+(0) = s_-(0) = 1/2; \quad s_+(1) = s_-(1) = s(1)/2. \quad (9)$$

Найденное приближённое решение представляет собой:

$$\bar{s}_+(r) = \bar{s}_-(r) = \frac{1}{2} - \frac{1 - s(1)}{2}r, \quad (10a)$$

$$\bar{y}(r) = \frac{y(0)}{2\bar{s}_+(r)} = \frac{y(0)}{1 - (1 - s(1))r}. \quad (10b)$$

Или, в размерном виде:

$$\bar{c}_+(x) = \bar{c}_-(x) = \frac{c(0)}{2} - \frac{c(0) - c(L)}{2L}x, \quad (11a)$$

$$\bar{E}(x) = \frac{E(0)c(0)}{2\bar{c}_+(x)} = \frac{E(0)}{1 - \frac{c(0) - c(L)}{c(0)L}x}. \quad (11b)$$

Для системы из двух видов ионов формулы (11) дают сразу решение. Если видов ионов больше, можно использовать формулу (2), подставив в неё $\bar{E}(x)$ из (11b). Тогда (при $c(0) \neq c(L)$) получим:

$$\bar{c}_i(x) = c_i(0) (1 - Ax)^{-z_i \frac{FE(0)}{RTA}} + P_i \left((1 - Ax) - (1 - Ax)^{-z_i \frac{FE(0)}{RTA}} \right), \quad (12)$$

$$\text{где } A \equiv \frac{c(0) - c(L)}{c(0)L}, \quad P_i \equiv \bar{c}_i(0) \frac{(1 - AL)^{-z_i \frac{FE(0)}{RTA}} - \frac{c_i(L)}{c_i(0)}}{(1 - AL)^{-z_i \frac{FE(0)}{RTA}} - \frac{c(L)}{c(0)}}.$$

²Васильева А.Б. Условно устойчивые сингулярно возмущённые системы с особенностями в граничных условиях // Дифференциальные уравнения, 1975, т. XI, № 2 — С. 227–238

Если граничные условия для i -того вида ионов таковы, что $\frac{c_i(L)}{c_i(0)} = \frac{c(L)}{c(0)}$, то распределение концентрации его (12) становится линейным:

$$\bar{c}_i(x) = \bar{c}_i(0) \frac{c(0) - c(L)}{c(0)L} x \quad (13)$$

Решение (11) получено также и без использования метода асимптотических разложений: выражая s_+ , s_- и y из (4) и пренебрегая при этом членами с μ^2 . Тем самым использовалось применяемое в электрохимии предположение приближённой электронейтральности. Более строгое математически решение краевой задачи (4, 9) подтверждает адекватность этого предположения и позволяет оценить точность решения (11).

Глава 3. ЭЛЕКТРОДИФФУЗИОННЫЕ ГРАДИЕНТЫ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ В ДВИЖУЩЕЙСЯ СРЕДЕ

Рассматриваются стационарные электродиффузионные градиенты в движущейся среде. Рассмотрение предназначено для оценки влияния конвекции на форму стационарных электродиффузионных распределений концентраций ионов. Кроме того, оно может представлять интерес с точки зрения создания возможных модификаций метода изоэлектрического фокусирования.

Электрофоретическая установка аналогична описанной выше и показанной на рис. 1. Течение жидкости (с постоянной скоростью v) через электрофоретическую камеру может существовать за счёт разных факторов, таких как электроосмос в ней или разность давлений в электродных камерах. При поддержании постоянных концентраций ионов на границах электрофоретической камеры, постоянстве скорости потока жидкости через неё и внешнего электрического поля система со временем придёт в стационарное состояние.

Стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов в среде, движущейся с постоянной скоростью v , будут описываться уравнениями:

$$J_i = -RTu_i \frac{dc_i(x)}{dx} + z_i u_i F E(x) c_i(x) + v c_i(x), \quad (14a)$$

$$\frac{dE(x)}{dx} = \frac{F}{\varepsilon \varepsilon_0} \sum_i z_i c_i(x). \quad (14b)$$

В случаях, когда E возможно выразить как функцию только от координаты, распределение концентраций ионов будет выражаться формулой

$$c_i(x) = e^{\mathcal{F}_i(x)} \left(c_i(0) - \frac{J_i}{RTu_i} \int_0^x e^{-\mathcal{F}(x)} dx \right), \quad (15)$$

где $\mathcal{F}_i(x) \equiv \frac{z_i F}{RT} \int_0^x E(x) dx + \frac{vx}{RTu_i}$; $\frac{J_i}{RTu_i} = \frac{c_i(0)e^{\mathcal{F}_i(L)} - c_i(L)}{\int_0^L e^{-\mathcal{F}_i(x)} dx}$.

Снова ограничимся рассмотрением только тех систем, в которых валентности всех ионов одинаковы: $|z_i| = z \quad \forall i$. В этих случаях система (14) сводится к трём уравнениям:

$$\begin{aligned} \frac{dc_+(x)}{dx} - \frac{zF}{RT} E(x)c_+(x) - \frac{vW_+}{RT} c_+(x) + I_+ &= 0, \\ \frac{dc_-(x)}{dx} + \frac{zF}{RT} E(x)c_-(x) - \frac{vW_-}{RT} c_-(x) + I_- &= 0, \\ \frac{\varepsilon\varepsilon_0}{zF} \frac{dE(x)}{dx} &= (c_+(x) - c_-(x)). \end{aligned} \quad (16)$$

Здесь $c_+(x) \equiv \sum_{\kappa} c_{\kappa}(x)$; $c_-(x) \equiv \sum_{\alpha} c_{\alpha}(x)$; $W_+ \equiv \sum_{\kappa} \frac{1}{u_{\kappa}}$; $W_- \equiv \sum_{\alpha} \frac{1}{u_{\alpha}}$; $I_+ \equiv \sum_{\kappa} \frac{J_{\kappa}}{RTu_{\kappa}}$; $I_- \equiv \sum_{\alpha} \frac{J_{\alpha}}{RTu_{\alpha}}$; в этих обозначениях индексом « κ » нумеруются виды катионов, а индексом « α » нумеруются виды анионов.

Обозначим: $c(x) = c_+(x) + c_-(x) = \sum_{i=1}^n c_i(x)$. Заменой

$$r = \frac{x}{L}; \quad s_+(r) = \frac{c_+(x)}{c(0)}; \quad s_-(r) = \frac{c_-(x)}{c(0)}; \quad y(r) = \frac{zFL}{RT} E(x);$$

$$j_+ = \frac{I_+L}{c(0)}; \quad j_- = \frac{I_-L}{c(0)}; \quad w_+ = \frac{vLW_+}{RT}; \quad w_- = \frac{vLW_-}{RT}; \quad \mu^2 = \frac{\varepsilon\varepsilon_0RT}{z^2F^2L^2c(0)}$$

система уравнений (16) преобразуется в:

$$\frac{ds_+(r)}{dr} - s_+(r)y(r) - w_+s_+(r) + j_+ = 0, \quad (17a)$$

$$\frac{ds_-(r)}{dr} + s_-(r)y(r) - w_-s_-(r) + j_- = 0, \quad (17b)$$

$$\mu^2 \frac{dy(r)}{dr} = s_+(r) - s_-(r). \quad (17c)$$

Здесь μ^2 — по-прежнему тот же самый, что и в случае неподвижной среды, малый множитель. Его малость снова может быть использована для получения приближённого решения:

$$\bar{s}_+(r) = \bar{s}_-(r) = \frac{s_+(0) - s_+(1)}{1 - e^{(w_++w_-)/2}} e^{\frac{w_++w_-}{2}r} + \frac{s_+(1) - s_+(0)e^{(w_++w_-)/2}}{1 - e^{(w_++w_-)/2}} \quad (18)$$

$$\bar{y}(r) = \frac{(1 - e^{(w_++w_-)/2})(y(0) + \frac{w_+-w_-}{2}s_+(0))}{(s_+(0) - s_+(1))e^{\frac{w_++w_-}{2}r} + s_+(1) - s_+(0)e^{(w_++w_-)/2}} - \frac{w_+ - w_-}{2} \quad (19)$$

В размерных переменных формулам (18) и (19) соответствуют:

$$\bar{c}_+(x) = \bar{c}_-(x) = \frac{c_+(0) - c_+(L)}{1 - e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vL}} e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vx} + \frac{c_+(L) - c_+(0)e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vL}}{1 - e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vL}} \quad (20)$$

$$\bar{E}(x) = \frac{(1 - e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vL})(E(0) + \frac{W_+ - W_-}{zF}v)c_+(0)}{(c_+(0) - c_+(L))e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vx} + c_+(L) - c_+(0)e^{\frac{W_+ + W_-}{2RT}vL}} - \frac{W_+ - W_-}{2zF}v. \quad (21)$$

Для систем из двух видов ионов формулы (20) и (21) дают сразу решение. Если видов ионов в системе больше, распределение концентраций ионов можно рассчитывать по формуле (15), подставив в неё $\bar{E}(x)$ из (11b).

На рисунках 4, 5 и 6 приведены распределения концентраций ионов, форма градиента рН и $E(x)$ в неподвижной и движущейся среде, рассчитанные для двухионной системы (раствора HCl). В расчётах полагалось $E(0) = 38,1$ В/м (то есть, значение $E(0)$, которому в неподвижной среде соответствует разность потенциалов между границами электрофоретической камеры $\varphi_L = -10$ В).

Видно, что даже небольшие скорости течения среды существенно влияют на форму распределения стационарных электродиффузионных концентраций ионов.

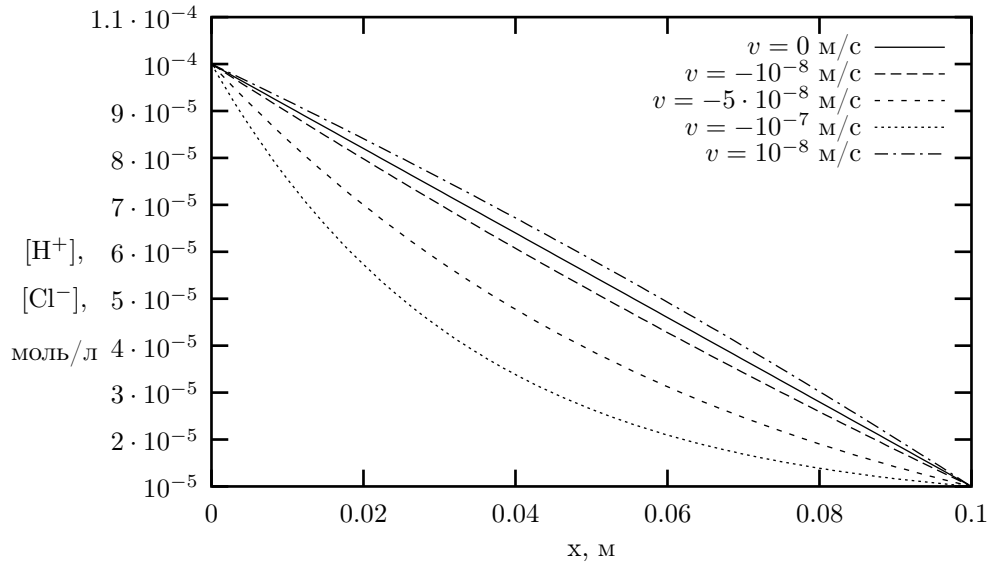


Рис. 4: Стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов в электрофоретической камере в неподвижной и в движущейся со скоростью v среде (Распределения концентраций H^+ и Cl^- приближённо совпадают)

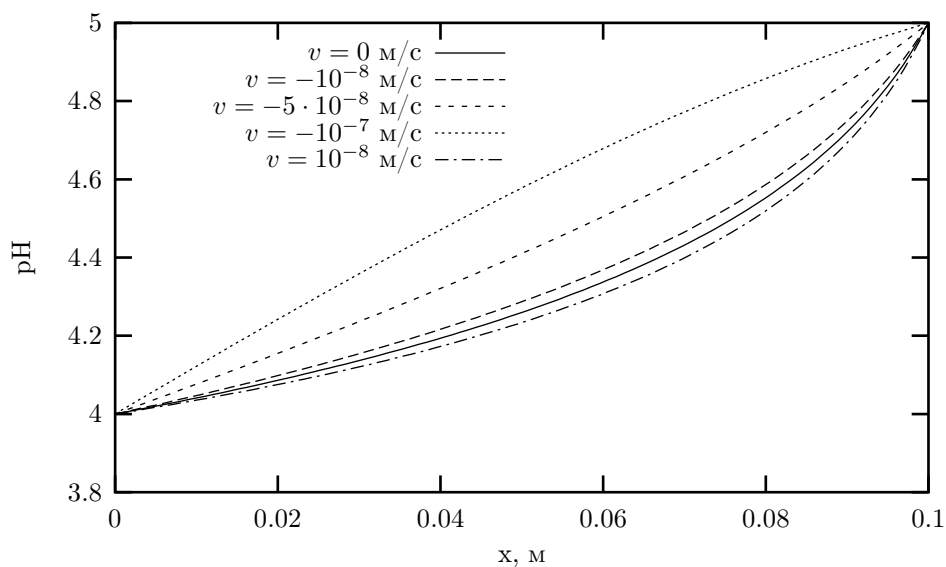


Рис. 5: Форма электродиффузионного градиента рН в электрофоретической камере в неподвижной и в движущейся со скоростью v среде

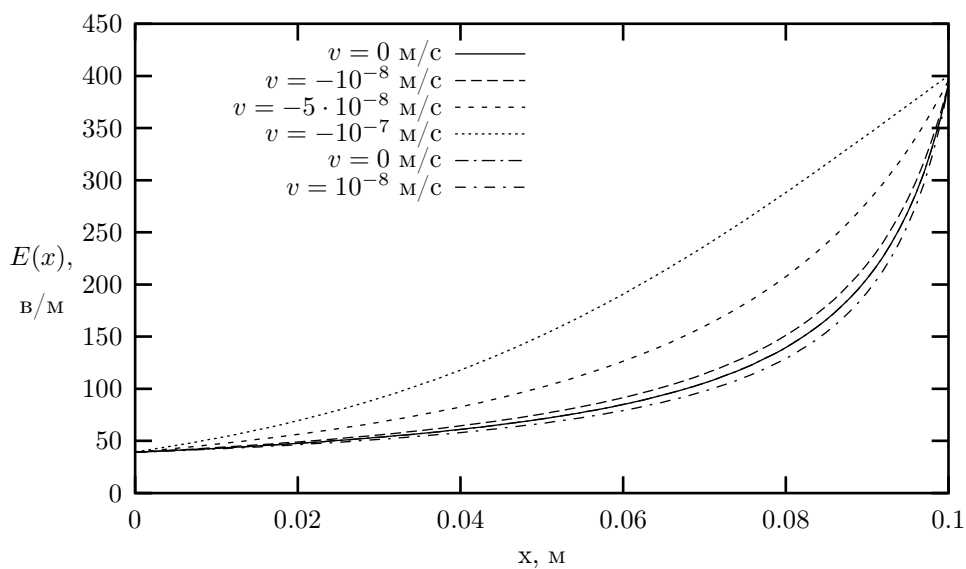
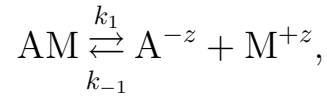


Рис. 6: Напряжённость электрического поля в электрофоретической камере в неподвижной и в движущейся со скоростью v среде

Предлагается метод *неизоэлектрического фокусирования* слабых электролитов. Фокусирование осуществляется электрофорезом в среде, движущейся относительно неподвижного градиента концентрации рабочих ионов³ в электрофоретической камере.

В общем случае будем рассматривать некоторый слабый электролит, диссоциирующий по формуле



где k_{-1} и k_1 — константы скоростей прямой и обратной реакции соответственно; z положительно или отрицательно в зависимости от химической природы рассматриваемого вещества.

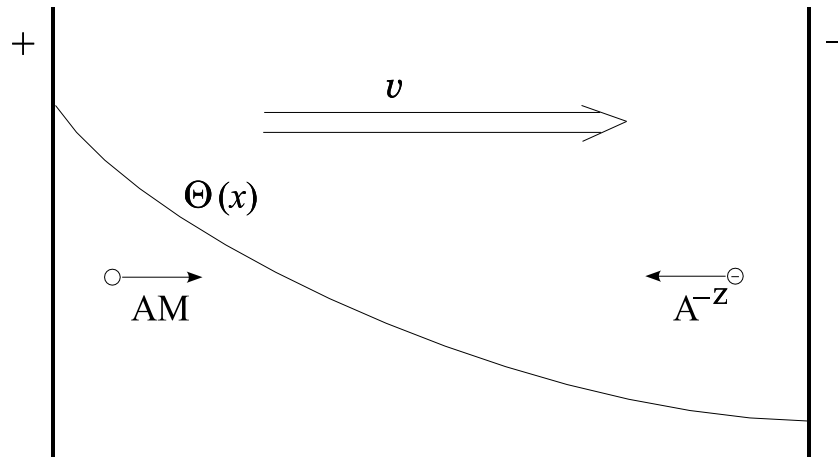


Рис. 7: Принцип неизоэлектрического фокусирования.

v — скорость потока жидкости; $\Theta(x)$ — зависимость концентрации рабочих ионов M^{+z} от координаты; AM — фокусируемое вещество в форме молекул; A^{-z} — фокусируемое вещество в форме ионов.

В электрофоретической камере создаётся поток жидкости, неподвижный градиент концентрации рабочих ионов M^{+z} , и электрическое поле, направленные согласно схеме (рис. 7). В области низкой концентрации M^{+z} , частицы фокусируемого слабого электролита AM будут преимущественно диссоциированы. Ионы A^{-z} будут двигаться под действием электрического

³ионов, образующиеся при диссоциации фокусируемых веществ (например, при фокусировании кислот это будут протоны)

поля против потока жидкости, пока не попадут в область высокой концентрации ионов M^{+z} , где будут рекомбинировать, образуя снова молекулы АМ. В области высокой концентрации ионов M^{+z} частицы фокусируемого вещества будут находиться преимущественно в форме молекул АМ, которые будут двигаться с потоком жидкости, пока не достигнут области низкой концентрации рабочих ионов, где продиссоциируют и в виде ионов A^{-z} станут двигаться в противоположном направлении.

В точке градиента концентрации рабочих ионов, где все составляющие массопереноса фокусируемого вещества (электромиграция, перенос потоком среды и диффузия) взаимно компенсируют друг друга, будет происходить фокусирование. Точки фокусирования слабых электролитов, различающихся своими константами диссоциации K_d , будут различаться, что означает возможность разделения веществ по признаку различия их K_d при неизоэлектрическом фокусировании.

Массоперенос нейтральных и заряженных частиц АМ и A^{-z} будет описываться, соответственно, уравнениями:

$$\frac{\partial c_0(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial J_0(x, t)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 c_0(x, t)}{\partial x^2} - v \frac{\partial c_0(x, t)}{\partial x} + k_{-1} \Theta(x) c_-(x, t) - k_1 c_0(x, t), \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_-(x, t)}{\partial t} &= -\frac{\partial J_-(x, t)}{\partial t} = \\ &= D_- \frac{\partial^2 c_-(x, t)}{\partial x^2} + z u_- F \frac{\partial}{\partial x} (E(x, t) c_-(x, t)) - \\ &- v \frac{\partial c_-(x, t)}{\partial x} - k_{-1} \Theta(x) c_-(x, t) + k_1 c_0(x, t), \end{aligned} \quad (23)$$

где c_0 — концентрация АМ; c_- — концентрация A^{-z} ; J_0 — поток АМ; J_- — поток A^{-z} ; E — напряжённость электрического поля; Θ — распределение концентрации ионов M^{+z} ; D_0 — коэффициент диффузии АМ; D_- — коэффициент диффузии A^{-z} ; u_- — подвижность A^{-z} ; v — скорость течения жидкости в камере.

Установление химического равновесия происходит очень быстро по сравнению с скоростью электродиффузионных процессов и конвекции. Поэтому уравнения (22) и (23) можно упростить, пользуясь соотношением c_- , c_0 и Θ для химического равновесия:

$$K_d = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\Theta(x) c_-(x, t)}{c_0(x, t)}. \quad (24)$$

Фокусирование означает достижение стационарного распределения концентраций, при котором $J_0 + J_- = 0$. Тогда, с учётом формулы (24) из

уравнений (22) и (23) следует:

$$\frac{dc_-(x)}{dx} = c_-(x) \frac{-\frac{D_0}{K_d} \frac{d\Theta(x)}{dx} - zu_- FE(x) + v \frac{\Theta(x)}{K_d} + v}{\frac{D_0\Theta(x)}{K_d} + D_-};$$

$$c_0(x) = \Theta(x)c_-(x)/K_d.$$

Отсюда распределение сфокусированного вещества выразится формулой:

$$c(x) = c(0) \frac{1 + \frac{D_0}{D_-} \frac{\Theta(0)}{K_d}}{1 + \frac{\Theta(0)}{K_d}} \cdot \frac{1 + \frac{\Theta(x)}{K_d}}{1 + \frac{D_0}{D_-} \frac{\Theta(x)}{K_d}} \times$$

$$\times \exp \left(\int_0^x \frac{\left(1 + \frac{\Theta(x)}{K_d}\right) \frac{v}{D_-} - \frac{zF}{RT} E(x)}{1 + \frac{D_0}{D_-} \frac{\Theta(x)}{K_d}} dx \right). \quad (25)$$

Показано, что необходимым и достаточным условием максимума (25), т.е. фокусирования вещества, будут следующие соотношения скорости v , параметров среды ($E(x)$, $\Theta(x)$) в точке фокусирования x_* и констант, характеризующих фокусируемое вещество (K_d , D_- , D_0):

$$v = \frac{zu_- FK_d E_*}{K_d + \Theta_*} + \frac{\Theta'_* K_d (D_0 - D_-)}{(K_d + \Theta_*)^2}$$

$$\frac{\Theta''_* K_d (D_0 - D_-)}{K_d + \Theta_*} - \frac{\Theta'^2_* K_d (D_0 - D_-)}{(K_d + \Theta_*)^2} + \frac{\Theta'_*}{K_d} < \frac{zFu_- E'_*}{v}$$

Здесь значения функций $E(x)$, $\Theta(x)$, и их производных в точке фокусирования x_* обозначены как E_* , Θ_* , Θ'_* , Θ''_* , E'_* .

Если $E(x)$ и $\Theta(x)$ линейны либо вблизи точки фокусирования могут быть аппроксимированы линейными функциями $E(x) = E_1 x + E_0$, $\Theta(x) = \Theta_1 x + \Theta_0$, то распределение концентрации сфокусированного вещества будет выражаться представлять собой:

$$c(x) = c_-(0) \left(1 + \frac{\Theta_1 x + \Theta_0}{K_d}\right) \left(\frac{|P_4 + P_3 x|}{P_4}\right)^{(P_4 P_1 - P_2 P_3)/P_3^2}$$

где $P_1 \equiv zu_- FE_1 - \frac{v\Theta_1}{K_d}$; $P_2 \equiv zu_- FE_0 - \frac{D_0\Theta_1}{K_d} - v(1 + \Theta_0)$; $P_3 \equiv \frac{D_0\Theta_1}{K_d}$;
 $P_4 \equiv \frac{D_0\Theta_0}{K_d} + D_-$.

Выводы

1. На основе системы уравнений Нернста-Планка и Пуассона исследованы стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов, не взаимодействующих друг с другом химически, в неподвижной среде. Найдены точные либо приближённые решения уравнений Нернста-Планка и Пуассона для значительной части случаев, интересных с точки зрения использования электродиффузионных распределений концентраций ионов для создания градиентов рН для изоэлектрического фокусирования и некоторых его модификаций.
2. Показано, что в неподвижной среде стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов, имеющих одинаковый заряд, тождественны и неразличимы.
3. Сформулированы необходимые и достаточные условия точной электронной нейтральности электродиффузионных распределений концентраций ионов в неподвижной среде. При этих условиях уравнения Нернста-Планка и Пуассона имеют точное аналитическое решение, позволяющее рассчитывать распределения концентраций ионов (градиент рН) и позволяющее сделать вывод о применимости такого градиента рН для изоэлектрического фокусирования.
4. Для случая равенства валентностей всех ионов в системе, найдено приближённое решение уравнений Нернста-Планка и Пуассона для неподвижной среды. Ему соответствует приближённое соблюдение электронной нейтральности в электрофоретической камере. Для этого приближённого решения показано, что при определённых граничных условиях (которые сформулированы), распределение концентраций ионов линейно, не зависит от электрического поля и свойств самих ионов, определяется только граничными условиями для их концентраций. При иных граничных условиях распределение концентраций ионов выражается нелинейной зависимостью, которая тоже приближённо найдена.
5. На основе системы уравнений Нернста-Планка (с конвекционным членом) и уравнения Пуассона исследованы стационарные электродиффузионные распределения концентраций ионов в движущейся среде (в потоке жидкости). Для случая равенства валентностей всех ионов в системе найдено приближённое решение этих уравнений, пользуясь которым можно рассчитывать распределения концентраций ионов и электрическое поле в электрофоретической камере с потоком жидкости через неё. Показано, что даже небольшие скорости течения жидкости в электрофоретической камере существенно влияют на форму стационарного электродиффузионного распределе-

ния концентраций ионов в ней.

6. На основе уравнений массопереноса слабого электролита в среде с потоком жидкости и неподвижным градиентом концентрации рабочих ионов построена и исследована математическая модель электрофокусирования слабого электролита. Построенная модель позволяет предложить метод неизоэлектрического фокусирования — электрофорез в среде, движущейся относительно градиента концентрации рабочих ионов, позволяющий осуществлять конденсирование частиц слабых электролитов с разделением их по признаку различия констант диссоциации K_d .
7. Сформулированы необходимые и достаточные условия фокусирования слабого электролита, как связь между константами, характеризующими фокусируемое вещество и параметрами среды в точке фокусирования. Получены приближённые формулы, описывающие распределение концентрации сфокусированного вещества.

Публикации по теме диссертации

1. Волик В.Ю., Межевикин В.В., Почекутов А.А. Электрофокусирование слабых электролитов в движущейся среде / Материалы III Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2000». — Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2000. — С. 43–44
2. Волик В.Ю., Межевикин В.В., Почекутов А.А. Самоформирующиеся в подвижной среде градиенты концентраций ионов для электрофокусирования слабых электролитов / Материалы III Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2000». — Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2000. — С. 45–46
3. Межевикин В.В., Почекутов А.А. Электродиффузионные градиенты рН для изоэлектрического фокусирования / Материалы III Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2000». — Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2000. — С. 154–155
4. Межевикин В.В., Почекутов А.А., Рузанова Л.Н. Электродиффузионные градиенты рН для изоэлектрического фокусирования белков // Доклады РАН, 2001, т.377, № 3 — С. 406–407
5. Межевикин В.В., Почекутов А.А. Электрофокусирование слабых электролитов, не являющихся цвиттер-ионами, в потоке / Материалы VI Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2003». — Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2003. — С.126–127

6. Межевикин В.В., Волик В.Ю., Почекутов А.А. Электрофокусирование слабых электролитов в движущейся среде // Доклады РАН, 2001, т.377, № 4 — С. 556–558
7. Межевикин В.В., Волик В.Ю., Почекутов А.А. Самоформирующиеся в потоке электродиффузионные градиенты концентраций ионов для электрофокусирования слабых электролитов // Доклады РАН, 2003, т.388, № 2 — С. 262–264
8. Почекутов А.А. Электродиффузионные градиенты концентраций ионов для изоэлектрического фокусирования / Материалы XXXVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Физика, ч.2. — Новосибирск: НГУ, 2000. — С. 23–24
9. Почекутов А.А. Электрофокусирование в подвижной среде / Материалы XXXVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Физика, ч.2. — Новосибирск: НГУ, 2000. — С. 24–25
10. Почекутов А.А., Межевикин В.В. Электродиффузионные градиенты концентраций ионов, приближенное решение / Материалы IV Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2001». — Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2001. — С. 122–123
11. Почекутов А.А., Межевикин В.В. Исследование формы электродиффузионных градиентов концентраций ионов, не взаимодействующих химически / Материалы VI Всероссийского семинара «Моделирование неравновесных систем — 2003». — Красноярск: ИВМ СО РАН, 2003. — С. 135–136