

(11) Patento numeris: **3621**

(51) Int.Cl.⁵: **G01N 27/27**

(21) Paraiškos numeris: **IP1744**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 12 27**

(72) Išradėjas:

Valdas-Stanislovas Laurinavičius, LT

Bogumila Kurtinaitienė, LT

Algimantas Jonuška, LT

(73) Patento savininkas:

Biochemijos institutas, Mokslininkų g. 12, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Prietaisas ir būdas disacharidų koncentracijos nustatymui

(57) Referatas:

Siūlomas išradimas priskiriamas medžiagų analizės ir tyrimo sričiai, kurių metu nustatomi elektrocheminiai parametrai, būtent, įrenginiui ir būdai, skirtiems disacharidų koncentracijos biologiniuose skysčiuose ir maisto produktuose nustatymui.

Išradimo tikslas - disacharidų koncentracijos nustatymo tikslumo pagerinimas, pasiekiamas elektrocheminėje gardelėje be disacharidinio elektrodo, panaudojant papildomą gliukozės elektrodą, o elektroninis blokas papildytas kompleksinio signalo apdirbimo ir komutacijos blokais.

Išradimas priskiriamas medžiagų tyrimui ir analizei, nustatant elektrocheminius parametrus, būtent, būdams ir analitiniams įrenginiams, skirtiems disacharidų koncentracijos nustatymui ir gali būti naudojamas biologijos ir maisto pramonės produktų analizei.

Šiuo metu disacharidų nustatymas labai svarbus įvairiose biologijos pramonės srityje, analizuojant biologinių substratų sudėtį. Pavyzdžiui, laktozės nustatymas pieno produktuose yra reikšmingas pieno kokybės kontrolės rodiklis. Ypatingą reikšmę jis įgauna gaminant pieno mišinius vaikams ir laktozės gamyboje iš atliekų. Visais šiais atvejais gliukozės priemaiša apsunkina laktozės nustatymą ir sumažina atliekamų analizių tikslumą /Тепель А., Химия и физика молока. -М.: Пищевая промышленность, 1979/.

Mikrobiologiškai hidrolizuojant medieną tarp šalutinių produktų gaunama celiuliozė /Биохимия, 1984, т. 49, № 7, с. 1110-1120/. Celiuliozės nustatymas tarp medienos hidrolizės produktų - svarbus technologijos rodiklis, tačiau jo nustatymą ir čia apsunkina gliukozė.

Žinomas elektrocheminis sacharozės koncentracijos nustatymo būdas vandens tirpaluose, esant gliukozės ir/arba fruktozės priemaišai /Paraiška Nr. 3224461 Vokietijos patentui/. Išradimas pagrįstas tuo, kad nustatant sacharozės koncentraciją vandeninis jos tirpalas inventuojamas, po to šarminėje terpėje elektrochemiškai oksiduojamas, esant 650 mV (500-800 mV intervale) potencialui Ag/AgCl palyginimo elektrodo atžvilgiu. Oksidacijos srovė palyginama su pradinio sacharozės tirpalo elektrocheminės oksidacijos srove.

Šio būdo trūkumas - blogas selektyvumas gliukozės atžvilgiu, nes minėtame 500-800 mV potencialo intervale oksiduojasi daug kitų biologinėse terpėse dažnai su-

tinkamų junginių: askorbininė rūgštis, purino-piridininės bazės, biogeniniai aminai ir kt. /-Биоамперометрия. Вильнюс, 1986, с. 9/.

- 5 Žinomi fermentiniai metodai ir prietaisai, kuriuos naudojant pagerėja analizės selektyvumas.

Žinomas būdas skirtas laktozės nustatymui ir prietaisas jo realizavimui /Lactose analysis specification sheet
10 YSI Model-27. -Yellow Springs Instrument Company 1984/, kuriame panaudotas elektrocheminis daviklis, susidedantis iš platininio anodo, padengto atskiriančia, fermentine ir makroporine membranomis, ir palyginimo elektrodo. Fermentinėje membranoje imobilizuota galaktozooksidazė paverčia laktozę į atitinkamą dialdehidą
15 ir vandenilio peroksidą, kuris daviklio paviršiuje oksiduojasi iki deguonies ir generuoja anodinę srovę. Daviklio srovės priklausomybė nuo laktozės koncentracijos - hiperbolinė. Mažesnei 1 mM laktozės koncentracijai šią priklausomybę galima laikyti tiesine.
20

Metodo trūkumai - siauras galutinio produkto koncentracijos nustatymo diapazonas ir blogas selektyvumas laktozės atžvilgiu, nes fermentinėje membranoje naudo-
25 jama galaktoooksidazė katalizuoja ir kitų substratais esančių angliavandenių (D-talozės, galaktozės, melibiozės, rafinozės ir t.t.) oksidaciją /-Anal. Chem., v. 49, Nr. 6, 1977/.

30 Žinomas fermentinis gliukozės elektrodas ir analizės būdas, skirtas gliukozės, sacharozės ir laktozės nustatymui švairiuose ir realiuose mikrobiologiniuose tirpaluose /-ЖАНХ, т. 36, 1980, вып. 6, с. 1168-1173/. Fermentinį elektrodą sudaro platininis anodas ir Ag/AgCl
35 palyginimo elektrodas. Anodas padengtas trimis membranomis: triacetatceliuliozine, fermentine (imobilizuotas fermentas - gliukozooksidazė) ir makroporine lavsanine.

Iš pradžių tiriamoje terpėje nustatoma gliukozės koncentracija, po to 0,5-10,7 min. 70°C temperatūroje atliekama rūgštinė sacharozės hidrolizė ir poliario-grafiškai nustatomas susidariusios gliukozės kiekis.

5 Disacharidų koncentracija nustatoma pagal kalibracinę grafiką, sudarytą hidrolizuoiant žinomas cukrų koncentracijas.

10 Metodo trūkumas yra tas, kad, nežiūrint gero membranose selektyvumo, elektrodas reaguoja į daugelį realiuose biologiniuose tirpaluose esančių medžiagų, todėl reikia iš anksto nustatyti liekamosios srovės dydį.

15 Prototipu pasirinktas - ekspres-analizatorius elektrocheminiam laktozės nustatymui ir analizės būdas, naudojant šį prietaisą /Куртинайтене Б.С., Лауринавичюс В.А. "Экспресс анализатор для определения лактозы". -Молочная и мясная промышленность. 1990, No 5, с. 30-32; А.с. СССР № 1502995, кл. GOIN 27/30, 1987/. Įrenginio schema

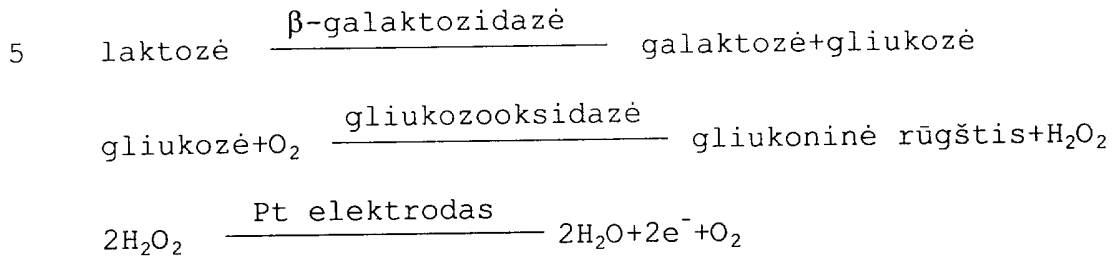
20 pateikta fig. 1. Įrenginį sudaro laktozės daviklis 1, kurį sudaro elektrocheminė 1 cm³ tūrio gardelė 2 ir į jos sienelę įmontuotas laktozės elektrodas 3. Gardelėje yra kiaurymė 4 tiriamojo tirpalo įvedimui. Tam naudojamas pipetinis dozatorius 5. Tirpalą gardelėje maišo magnetinė maišyklė 10, kurią suka pritvirtintas prie

25 elektrinio variklio ašies 12 besisukantis magnetas 11. Elektrocheminę gardelę praplauna persistaltinis siurblys 18. Tam buferinis tirpalas 15 vamzdeliu 17 tiekiamas į gardelę ir išsiurbiamas vamzdeliu 19 į naudoto skysčio surinkimo talpą 16. Siurblią valdo blokas 14 maitinamas šaltinio 13.

30

35 Daviklio signalas patenka į keitiklį, matuojamą srovę paverčiantį jai proporcinga įtampa 9, į jautrumo derinimo įrenginį 8 ir per analoginį-skaitmeninį keitiklį 7 - į skaitmeninį tablo 6.

Laktozės nustatymo būdas grindžiamas daviklio fermentinėje membranoje vykstančiu katalitiniu laktozės skilimu:



10

Oksiduojant H_2O_2 ant Pt elektrodo atsirandanti elektrodo anodinė srovė tam tikrame laktozės koncentracijų intervale tiesiai proporcinga laktozės koncentracijai (žiūr. fig. 3).

15

Analizės būdo ir prietaiso jo realizavimui trūkumas - blogas selektyvumas laktozės atžvilgiu, mažinantis laktozės nustatymo tikslumą, esant gliukozės priemaišai.

20

Išradimo tikslas - pagerinti disacharidų nustatymo būdo selektyvumą angliavandenilių mišiniuose.

25

Tikslas pasiektas sukuriant įrenginį (fig. 2), kuriame panaudotas disacharidų daviklis 1, susidedantis iš 1 mltr tūrio elektrocheminės gardelės 2, kurios sienelėje, skirtingai nuo prototipo, įmontuoti du davikliai: disacharidų 3 ir gliukozės 20. Detaliau tai parodyta daviklio pjūvyje A-A (2a pav.). Gardelės dugne įmontuotas bendras abiems (gliukozės ir disacharidų) elektrodams pagalbinis elektrodas 21. Bendras taip pat yra ir Ag/AgCl palyginimo elektrodas, esantis viename iš elektrodų (brėžinyje neparodytas). Gardelėje yra kiaurymė 4 mėginio įvedimui pipetiniu dozatoriumi 5. Tiriamąjį skystį maišo magnetinė maišyklė 10, kurią suka pritvirtintas prie variklio ašies 12 magnetas 11. Elektrocheminę gardelę praplauna peristaltinis siurblys 18. Tuo tikslu buferinis tirpalas 15 vamzdeliu

35

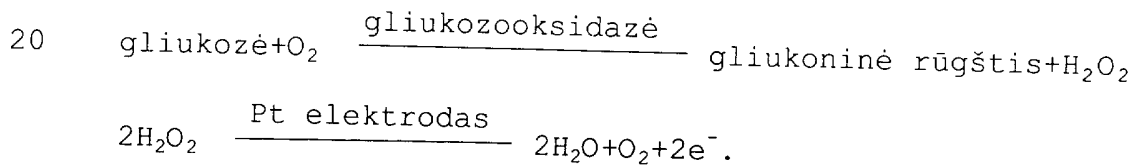
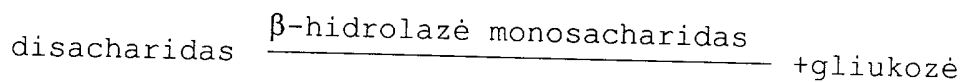
tiekiamas į gardelę ir išsiurbiamas vamzdeliu 19 į naudoto skysčio surinktuva 16. Siurbli komutuoja valdymo blokas 14 maitinamas šaltinio 13.

5 Keitiklis 22 gliukozės elektrodo srovės signalą verčia proporcingu įtampos signalu, kuris patenka į jautrumo derinimo įrenginį 23 ir per komutatorių 24 ir analoginį-skaitmeninį keitiklį 7 į skaitmeninį tablo 6.

10 Disacharidų elektrodo srovės signalą keitiklis 9 verčia jam proporcinga įtampa. Abiejų elektrodų signalai patenka į kompleksinio apdirbimo bloką 25, jautrumo derinimo įrenginį 8 ir per komutatorių 24 ir analoginį-skaitmeninį keitiklį 7 - į skaitmeninį tablo 6.

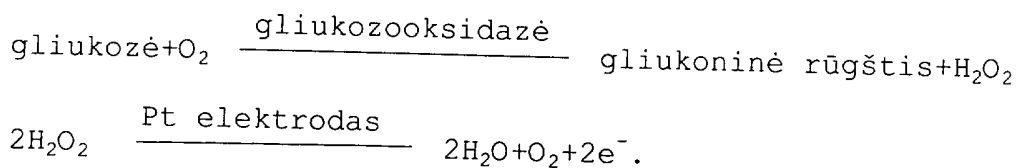
15

Ant disacharidų elektrodo vyksta šie procesai:



Ant gliukozės elektrodo atitinkamai vyksta:

25



30 Išradime pateikiamas disacharidų nustatymo būdas realizuojamas naudojant aprašytą įrenginį. Disacharidų koncentracijos nustatymo selektyvumas pasiekiamas dėl to, kad įvedamas papildomas elektrodas substrate esančios gliukozės koncentracijos nustatymui, o taip pat naudojamas kompleksinis signalų apdirbimo blokas, kuriame iš suminio disacharidų elektrodo signalo atimamas sunormuotas pagal elektrodų jautrumų gliukozei santykį

35

gliukozės elektrodo signalas. Disacharidų nustatymo būdo bei įrenginio jo realizavimui veikimą iliustruoja 1-5 pavyzdžiai.

- 5 **1 pavyzdys.** Laktozės nustatymas buferiniuose tirpaluose su gliukozės ir laktozės mišiniu.

10 Nustatant siūlomu įrenginiu pirmiausia surenkamas daviklis. Laktozei ir gliukozei jautrūs elektrodai gaminami pagal metodiką. Sumontuojama matavimo gardelė (fig. 2a). Praplovimo sistema ir gardelė užpildoma 0,01 M pH 6,5 fosfatinio buferiu, į kuri įeina ir 0,1 M KCl /-Биоамперометрия. Вильнюс, 1986, с. 9/.

- 15 **Reagentų paruošimas.** Tokiame pačiame buferiniame tirpale ruošiami ir matavimo tirpalai - 2-30 mM laktozės tirpalai (pagal tikslus laktozės svėrimus) su įvairiomis (nuo 0 iki 30 mM) gliukozės priemaišomis, taip pat 10 mM gliukozės tirpalas ir 10 mM laktozės tirpalas, skirti įrenginio kalibravimui.

25 **Įrenginio kalibravimas.** Kalibravimui į gardelę įvedama 0,05 mltr 10 mM laktozės kalibravimo tirpalo. Jautrumo derinimo įrenginiu (2a pav. 8 pvz.) skaitmeniniame tablo nustatomas parodymas "10,0". Peristaltinis siurblys išplauna gardelę (18 pvz. 2) buferiniu tirpalu. Skaitmeniniame tablo nustatoma nulinė reikšmė ir įvedama 0,05 mltr gliukozės kalibravimo tirpalo dozė. Kompleksinio signalo apdirbimo bloke iškompensuojami gliukozės ir laktozės daviklių signalai. Praplaunama gardelė.

35 **Matavimas.** Analizuojamo laktozės arba laktozės ir gliukozės mišinio mėgininio 0,05 mltr dozė dozatoriumi įvedama į gardelę. Skaitmeninio tablo parodymas atitinka laktozės koncentraciją mėginyje išreikštą mM. Po praplovimo įvedamas naujas mėginys.

Laktozės koncentracijos matavimo rezultatai pateikti 1 lentelėje.

- Rezultatai rodo, kad pateikto įrenginio parodymai tiesiškai priklauso nuo laktozės koncentracijos tiek nesant gliukozės (1 skiltis), tiek su 2-30 mM gliukozės priemaiša (2-5 skiltys). Esant mėginio tūriui 0,05 mltr tiesinės priklausomybės diapazonas siekia 2-30 mM laktozės. Šiame diapazone santykinė standartinė matavimo paklaida neviršija 8%. Iki 30 mM gliukozės priemaiša laktozės tirpaluose įrenginio parodymams įtakos neturi. Didesnės koncentracijos gliukozės priemaišos įrenginio parodymus keičia daugiau nei 10% (6 skiltis).
- Matome, kad siūlomą įrenginiu laktozės koncentraciją galima nustatyti, esant gliukozės priemaišai ir be papildomo mėginio apdirbimo.

- Nustatymas naudojant prototipą.** Tam, kad parodyti siūlomo įrenginio pranašumą prieš prototipą pagal /Куртиняйтенс Б.С., Лауринавичюс В.А. "Экспресс анализатор для определения лактозы". -Молочная и мясная промышленность. 1990, № 5, с. 30-32/ metodiką, atlikti laktozės ir gliukozės mišinių buferiniame tirpale matavimai, o jų rezultatai pateikti fig. 3.

- Įrenginio kalibravimas ir matavimas atlikti pagal anksčiau aprašytą metodiką. Iš 3 pav. matome, kad prototipo parodymai tiesiškai laktozės koncentracijoms iki 30 mM (fig. 3 1 kreivė). Pridedant 2, 10, 20 ir 30 mM gliukozės priemaišų prietaiso parodymai keičiasi priklausomai nuo pastarosios koncentracijos (2-5 kreivės). Šiuo atveju laktozės daviklio srovę sukuria tiek esanti tirpale, tiek susidaranti membranoje gliukozė. Šių signalų atskyrimas neatliekamas, todėl gliukozės priemaiša žymiai iškraipo laktozės matavimo rezultatus.

2 pavyzdys. Laktozės nustatymas mišiniuose su gliukoze.

Įrenginys surenkamas ir kalibruojamas taip, kaip apra-
šyta 1 pavyzdyje. Mikroorganizmų kultivavimo maitinimo
5 terpė buferiniu tirpalu pH 6,5 praskiedžiama 2 kartus,
pieno mišiniai paruošiami pagal receptą (1,3 g į
100 mltr vandens) ir praskiedžiami buferiniu santykiu
1:10. Rezultatai pateikti 2 lentelėje.

10 Duomenys parodo, kad gautos laktozės koncentracijos
reikšmės skiriasi nuo nurodytų receptūroje ne daugiau
kaip 3,3%.

3 pavyzdys. Laktozės nustatymas piene su gliukozės
15 priemaiša.

Karvės pienas praskiedžiamas buferiniu tirpalu 10 kar-
tų. Į pieną pridedama 2-30 mM gliukozės ir 2-30 mM
laktozės ir įrenginiu nustatoma laktozės koncentracija.
20 Rezultatai pateikti 3 lentelėje.

Matome, kad pradinė laktozės koncentracija piene sudaro
10 mM ir analizatoriaus parodymai nekinta didinant
gliukozės koncentraciją. Didinant laktozės koncent-
25 raciją piene įrenginio parodymai tolygiai didėja,
tačiau tiesinė parodymų priklausomybė nuo augančios
laktozės koncentracijos ir augančių prietaiso parodymų
išlieka tik iki suminės laktozės koncentracijos ti-
riamam tirpale, ne daugiau 30 mM.

30

4 pavyzdys. Celobiozės nustatymas mišiniuose su gliu-
koze.

Elektrocheminis celobiozės elektrodas ruošiamas pagal
35 /Биохимия, 1984, т. 49, № 7, с. 1110-1120/ metodiką, bet
vietoj galaktozidazės dedama 300 E/ml celobiozės. Įren-
giniu nustatomos celobiozės koncentracijos buferiniuose

tirpaluose su įvairiomis gliukozės koncentracijomis. Rezultatai pateikti 4 lentelėje.

5 Iš 4 lentelės duomenų matyti, kad įrenginio parodymai tiesiškai priklauso nuo celobiozės koncentracijos iki 25 mM. Iki 25 mM gliukozės priedas prietaiso parodymams įtakos neturi. Pagrindinė santykinė parodymų paklaida neviršija 8%. Gliukozės koncentraciją padidinus iki 30 mM sumažėja mažų (2-5 mM) ir didelių (25-30 mM) celobiozės koncentracijų nustatymo tikslumas.

5 pavyzdys. Sacharozės nustatymas buferiniuose tirpaluose su gliukozės priemaiša.

15 Elektrocheminis sacharozės elektrodas ruošiamas pagal /Куртинайтене Б.С., Лауринавичюс В.А. "Экспресс анализатор для определения лактозы". -Молочная и мясная промышленность. 1990, № 5, с. 30-32/ metodiką, fermentinė membrana gaminama iš 0,01 M fosfatinio buferinio tirpalo pH 7,2, 20 kuriame yra 5% albumino, 300 E/ml gliukozooksidazės, 350 E/ml invertazės ir 500 E/ml mutarotazės, prie 0,1 mltr tirpalo pridedant 0,006 mltr 5% gliutaro aldehido tirpalo.

25 Į įrenginį įstatomi sacharozinis ir gliukozinis elektrodai ir nustatomos sacharozės koncentracijos buferiniuose tirpaluose (pH 7,2) pridedant gliukozės.

30 Matavimo rezultatai pateikti 5 lentelėje. Tiesinis sacharozės nustatymo intervalas ir teisingi įrenginio parodymai išlieka 2-30 mM sacharozės koncentracijoms pridedant 2 mM gliukozės. Pridedant 5+20 mM gliukozės parodymai skiriasi nuo užduotųjų mažiau nei 9% 5-30 mM sacharozės koncentracijų intervale. Esant didelėms 35 gliukozės koncentracijoms (virš 25 mM) parodymai skiriasi virš 65%.

1 lentelė

Laktozės koncentracijos matavimas buferiniuose tirpaluose esant gliukozei

5

Koncentracija tirpale, mM	Išradime siūlomo prietaiso parodymai (laktozės koncentracija, mM)					
gliukozė laktozė	0	2	10	20	30	35
2	1,9	2,1	2,1	2,1	2,2	3,2
5	4,8	4,6	5,1	5,4	5,5	5,6
10	10,0	10,8	9,6	10,2	10,9	11,0
20	21,1	21,0	19,9	21,5	21,1	19,2
30	28,6	28,5	30,3	31,1	28,9	26,7

2 lentelė

Laktozės koncentracijos nustatymas mišiniuose, turinčiuose gliukozę

10

Pavyzdžio Nr.	Matavimo terpė	Pagrindiniai komponentai	Koncentracija praskiestuose tirpaluose			
			laktozės, mM		gliukozės, mM	
			pagal receptą	nustatyta*	pagal receptą	nustatyta*
1.	Pieno-rūgštinių bakterijų (MRS) kultyvavimo terpė	Pentonas, laktozė, gliukozė, neorganinės druskos	16,60	17,00	30,30	29,00
2.	Pieno mišinys "CNOW" (Prancūzija)	Sausas pienas, laktozė, vitaminai, augaliniai aliejai	19,75	19,60	-	0,60
3.	Adaptuotas mišinys "Similak" (Danija)	"-"	20,40	18,70	-	0,58

* vidutinė aritmetinė reikšmė iš trijų paralelinių nustatymų.

3 lentelė

Pridėtos laktozės nustatymas piene esant gliukozei

Koncentracija pridėtos laktozės, mM	Išradime siūlomo prietaiso parodymai, mM				
	Gliukozės koncentracija, mM				
	2	5	10	20	30
0	10,0	8,6	9,6	10,3	9,8
2	11,7	11,9	12,0	11,8	12,1
5	14,5	13,5	15,0	14,8	14,9
10	19,9	19,8	18,7	20,1	20,2
20	29,9	28,9	30,0	30,6	31,5
30	35,7	35,8	38,0	41,5	43,6

5

4 lentelė

Celiobiozės nustatymas buferiniuose tirpaluose esant gliukozei

10

Celiobiozės koncentracija, mM	Išradime siūlomo prietaiso parodymai, mM						
	0	2	5	10	20	25	30
2	2,1	2,1	2,1	2,15	2,1	2,3	3,3
5	4,9	5,1	5,1	5,0	5,2	5,4	7,5
10	9,7	9,8	9,8	9,9	10,0	9,9	10,4
20	19,6	19,9	19,1	20,1	19,8	18,8	19,1
25	25,4	23,6	23,4	23,8	23,8	23,7	23,4
30	28,6	27,4	27,4	25,3	25,3	25,3	25,3

5 lentelė

Sacharozės nustatymas buferiniuose tirpaluose esant gliukozei

5

Sacharozės koncentracija, mM	Prietaiso parodymai, mM					
	Gliukozės koncentracija, mM					
	0	2	5	10	20	25
2	2,0	2,1	2,2	3,2	3,2	3,3
5	5,0	5,2	4,7	4,8	5,3	5,5
10	10,0	9,6	9,6	10,0	10,3	10,1
15	15,3	14,6	14,6	15,3	14,9	14,5
20	18,9	18,6	18,5	19,9	18,9	16,5
30	30,2	29,9	28,8	27,8	27,1	26,7

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Prietaisas disacharidų nustatymui, sudarytas iš de-
tektuojančio fermentinio elektrodo, esančio elektro-
5 cheminėje gardelėje ir susidedančio iš vandenilio pe-
roksido poliarografinio daviklio, turinčio platinos
anodą, sidabro chlorido palyginimo elektrodą ir
pagalbinį elektrodą bei fermentinę membraną; elekt-
roninio bloko, skirto fermentinio elektrodo valdymui ir
10 signalo apdirbimui; siurblio, skirto gardelės praplo-
vimui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
elektrocheminė gardelė papildyta fermentiniu, gliukozei
jautriu davikliu, o disacharidams jautriame fermen-
tiniame elektrode panaudota keičiama, specifinė kiek-
15 vienam disacharidui membrana, o elektrocheminis blokas
papildytas kompleksinio signalų apdirbimo ir komuta-
cijos bloku.

2. Būdas disacharidų koncentracijos nustatymui biologi-
20 niuose substratuose, susidedantis iš katalitinio disa-
charidų skilimo elektrocheminio daviklio fermentinėje
membranoje, susidarant monosacharidui ir gliukozei,
tolimesnio gliukozės fermentinio skaldymo iki dialde-
hido ir vandenilio peroksido, anodinės srovės regene-
25 ravimo, oksiduojantis susidariusiam vandenilio peroksi-
dui iki deguonies, b e s i s k i r i a n t i s tuo,
kad įveda papildomą fermentinį daviklį, skirtą gliu-
kozės koncentracijai, esančiai biologiniame substrate,
nustatyti, sudarytą iš fermentinės membranos ir van-
30 denilio peroksido poliarografinio daviklio, turinčio
platinos anodą, ir toliau gliukozės elektrodo signalą
atima iš suminio disacharidinio elektrodo signalo,
naudojant kompleksinį signalų apdirbimo ir komutacinį
blokus.

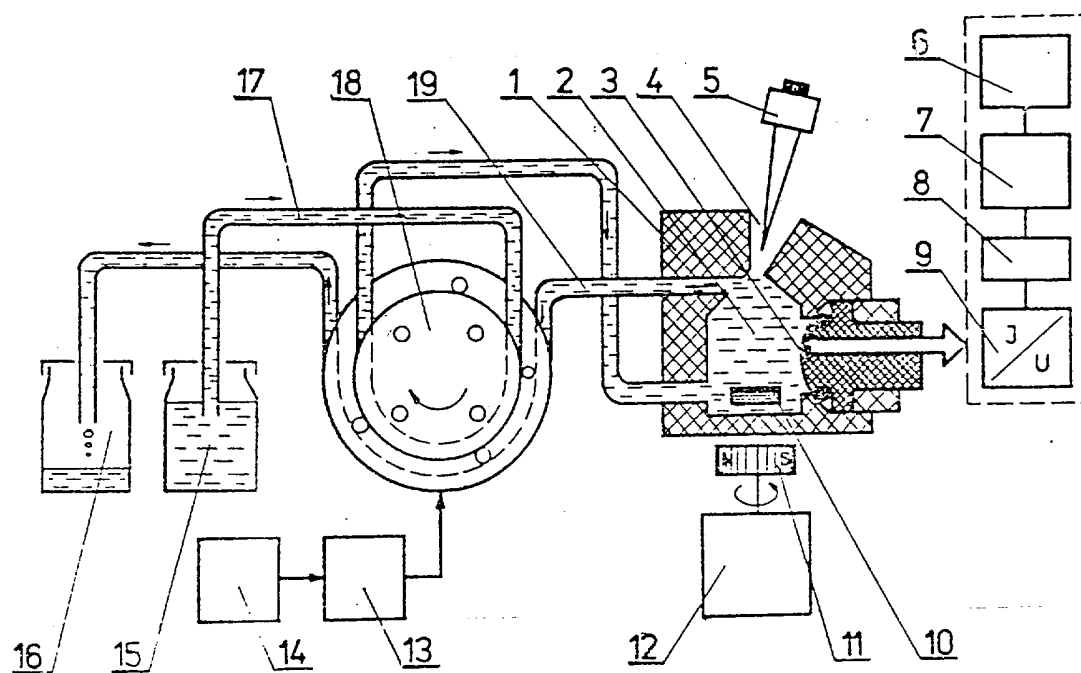


Fig. 1

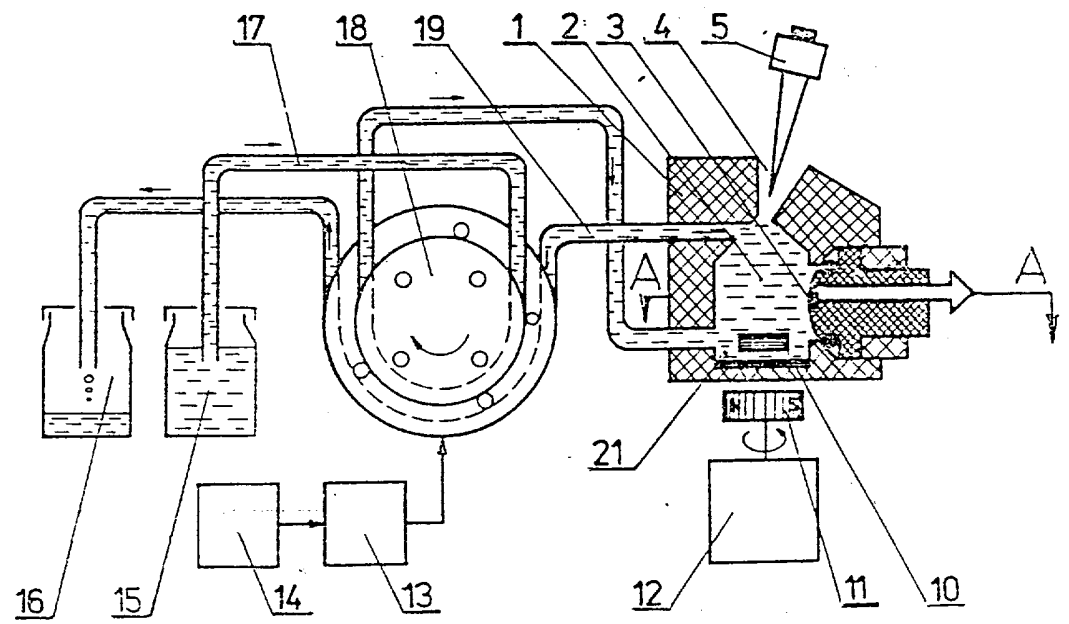


Fig. 2.

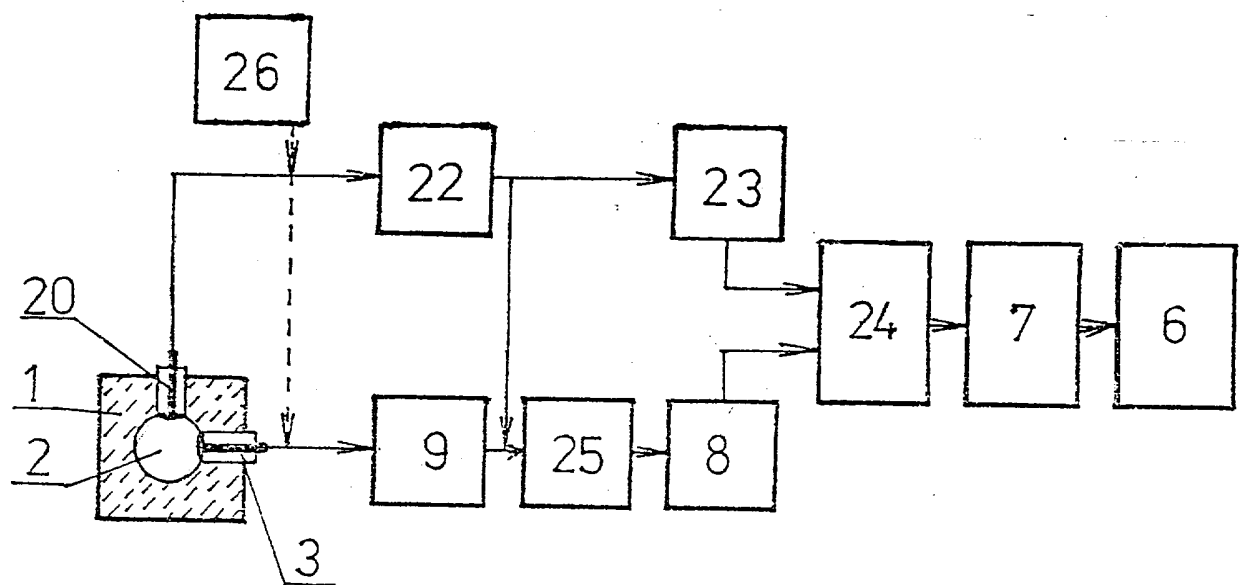


Fig. 2a

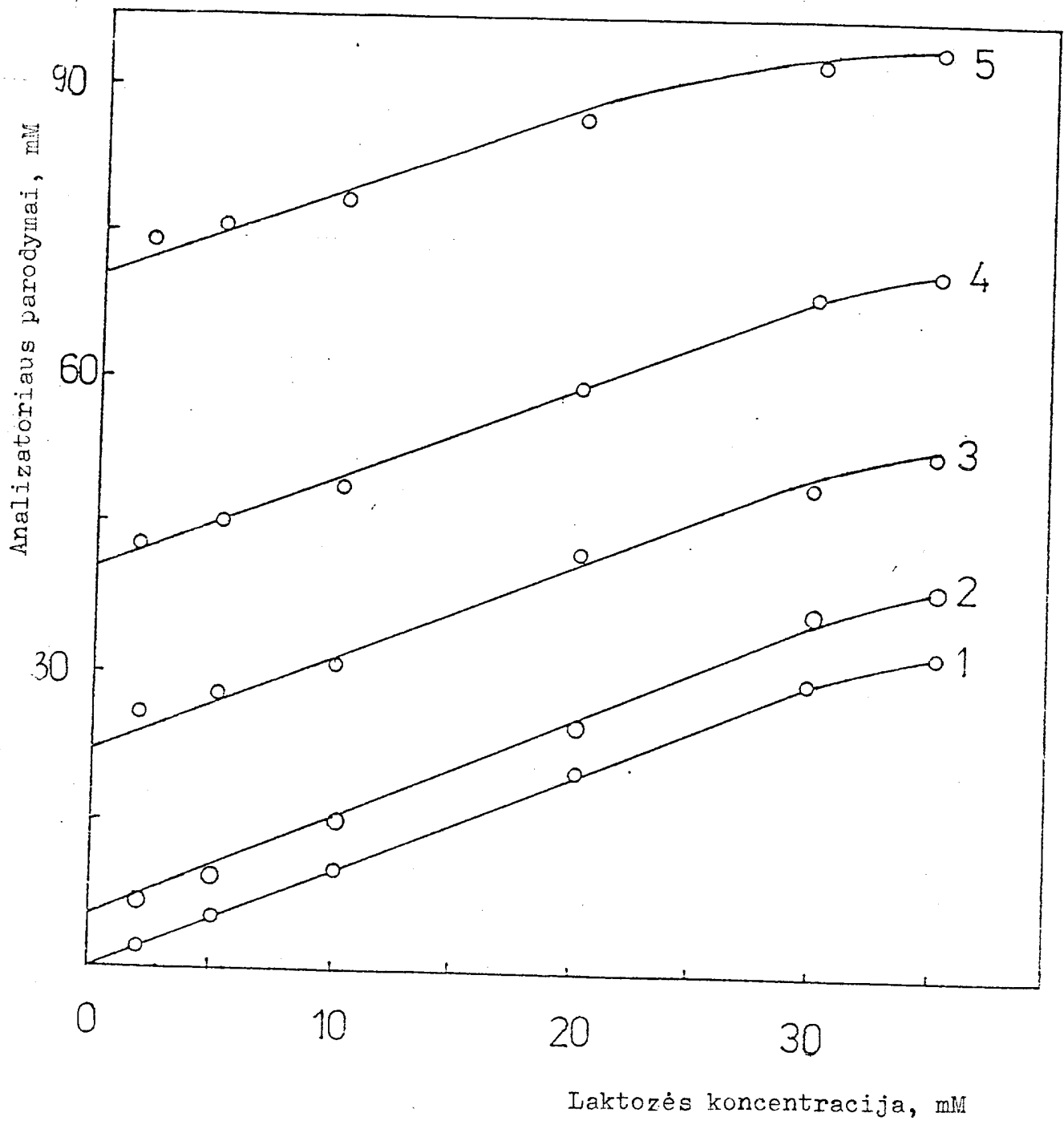


Fig. 3