

(11) Patent numeris: **3750**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 27/327**

(21) Paraiškos numeris: **IP1761**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 06**

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

(45) Patent paskelbimo data: **1996 03 25**

(60) SU duomenys: **SU 4932509, 1991 04 29**

(72) Išradėjas:

Sigita Staškevičienė, LT

Narimantas Čėnas, LT

Juozas Kulys, LT

(73) Patent savininkas:

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

(54) Pavadinimas:

Fermentinio elektrodo, skirto L-laktatui nustatyti, sukūrimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas panaudojamas biologinių tirpalų analizei medicinoje, diagnostikos tikslams, mikrobiologinėje pramonėje. Gaminant fermentinį elektodą, citochromas b_2 adsorbuojamas ant suodžiais PM-75 modifikuoto stiklo anglies elektrodo paviršiaus. Prieš modifikaciją suodžiai oksiduojami azoto rūgštimi ir disperguojami acetono suspensijoje, kurioje yra 2-5 % suodžių. Išradimas užtikrina stiklo anglies elektrodo modifikacijos supaprastinimą; gaunamo fermentinio elektrodo darbinio potencialo sumažinimą, padidinantį jo selektyvumą; jautrumo padidinimą, leidžiantį naudoti smarkiai praskiestus biologinius tirpalus.

Išradimo sritis yra biochemija. Konkrečiai šis išradimas skirtas fermentinio elektrodo sukūrimo metodui, ir gali būti panaudotas enzimologijoje mokslo-tiriamiesiems darbams, taip pat medicinoje ar mikrobiologinėje pramonėje elektrocheminiam L-laktato nustatymui biologinėse terpėse, pvz. kraujyje, kitų terpių diagnostikoje.

Žinomas elektrodo, skirto L-laktato nustatymui, sukūrimo būdas, panaudojant citochromą b_2 / Иммобилизованные ферменты т.2. ст. 169-176 (1976) /. Naudojant šį būdą, fermentas imobilizuojamas gelyje, kuriuo padengiamas elektrodas, o į tiriamąjį tirpalą įvedamas redoks mediatorius, pernešantis elektronus nuo fermento aktyvaus centro į elektrodą. Šio būdo trūkumas - tirpus mediatoriaus poreikis. Paprastai mediatorinę funkciją atlieka toksiniai chinono junginiai, pvz. benzochinonas. Todėl tokių elektrodų negalima panaudoti analizėms *in vivo*, taip pat mikrobiologiniuose reaktoriuose ir masinei biologinių terpių analizei.

Žinomas fermentinis elektrodas sudarytas iš stiklo anglies darbinio paviršiaus, padengto citochromu b_2 ir laktatdehidrogenaze, ir uždengto dializine membrana / TSRS a.l. Nr.1242803 /. Šio elektrodo trūkumas - papildomo fermento naudojimas. Be to laktatui nustatyti taip pat reikalingas tirpus mediatorius.

Žinomas fermentinio elektrodo L-laktatui nustatyti citochromo b_2 pagrindu sukūrimo būdas - paremtas fermento adsorbcija ant srovei laidžios matricos, sudarytos iš organinių katjonų (metilintų fenazino darinių, akridino, chinolino, piridino darinių) ir 7,7,8,8-tetraciano-p-chinodimetano anijon-radikalo kompleksų /TSRS a. l. Nr. 894534 /. Šio elektrodo panaudojimas analizei nereikalauja tirpus mediatoriaus buvimo tiriamajame tirpale. Žinomo metodo trūkumas – proceso sudėtingumas, reikalaujantis papildomai sintezuoti kompleksus ir jų komponentus, pvz., tetraciano-p-chinodimetano radikalą.

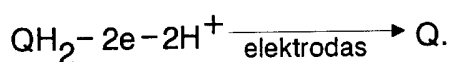
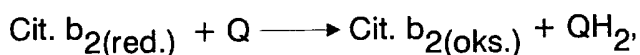
Išradimo tikslas - proceso supaprastinimas.

Išradimo esmė - elektrodo sukūrimas, adsorbuojant citochromą b_2 ant modifikuoto stiklo anglies elektrodo paviršiaus. Elektrodas modifikuojamas suodžiais PM-75, kurie naudojami kaip dažas spaustuvėse arba užpildas gumos pramonėje. Prieš modifikaciją suodžiai oksiduojami azoto rūgštimi ir ultragarsu disperguojami fluoroplastinio lako tirpale acetone. Suspensijoje, panaudojamoje modifikacijai, yra 2-5 % fluoroplastinio lako ir 12-20 % suodžių.

Fermentinio elektrodo veikimo mechanizmas aiškinamas redukuoto citochromo b_2 elektrooksidacija modifikuoto elektrodo paviršiuje. L-laktatas redukuoja citochromą b_2 .



Oksiduojant suodžius azoto rūgštimi, jų paviršiuje atsiranda elektroaktyvios chinono grupės (Q), katalizuojančios citochromo b_2 elektrooksidaciją:



Pagal šį išradimą suodžiai PM-75 prieš modifikaciją 5 paras laikomi 55 % azoto rūgštyje kambario temperatūroje. Po to jie perplaunami vandeniui iki neutralios reakcijos (pH 7,0) ir išdžiovinami. Paruoštų suodžių ir fluoroplastinio lako tirpalo acetone mišinys disperguojamas ultragarsu (44 kHz) 0,5-1 val. Stiklo anglies elektrodas pamerkiamas į gautą suodžių suspensiją 3-5 sek., po to išdžiovinamas, perplaunamas distiliuotu vandeniui ir buferiniu tirpalu. Ant suodžiais modifikuoto elektrodo darbinės plokštumos užpilama 10 mkl citochromo b_2 tirpalo. Darbinė plokštuma padengiama kaprono tinkleliu ir dializine membrana, kurie po to pritvirtinami guminiu žiedu. Elektrodas pamerkiamas į 0,1 M K-fosfat-citratinį buferinį tirpalą (pH 7,0), prijungiamas prie poliarografo (darbinis potencialas – -0,2V pagal Ag/AgCl). Į elektrodo gardelę įvedamas tiriamasis skystis, registruojama stacionarios oksidacinės srovės priklausomybė nuo L-laktato koncentracijos.

1 Pavyzdys. L-laktato koncentracijos vandeniniame tirpale nustatymas

Elektrodas paruošiamas pagal aukščiau pateiktą metodiką. Disperguojant suodžius ultragarsu imama suspensija acetone, turinti 2-5% fluoroplastinio lako ir 12-20% suodžių. Nustatoma srovės prie $-0,2\text{V}$ pagal Ag/AgCl palyginamąjį elektrodą priklausomybė nuo L-laktato koncentracijos.

1 Lentelė

L- laktato koncentracija , mM	0,1	0,2	0,3	0,5	0,8	1,0
Srovė elektrodo , mkA	0,55	1,25	1,80	3,13	4,5	5,0

Pagal 1 lentelės duomenis, srovė tiesiškai priklauso nuo L-laktato koncentracijos iki 0,5 mM (Fig. 1).

Naudojant šiuo būdu pagamintą elektrodą, L-laktatas elektrooksiduojamas prie pakankamai žemo potencialo, todėl askorbino rūgštis (elektroaktyvus biologinių skysčių komponentas) signalui įtakos neturi. Iš fig. 1 matyti, kad elektrodas yra pakankamai jautrus ($5,3 \text{ mkA/mM}$ L-laktato), tai leidžia analizei naudoti labiau praskiestus biologinius tirpalus. Padidinus suodžių arba lako koncentraciją virš nurodytos viršutinės ribos, sulėtėja elektrocheminiai paviršinių suodžių grupių virsmai. Sumažinus komponentų koncentraciją žemiau žemutinės nurodytos ribos, sumažėja elektrodo stabilumas.

Pagal 1 pavyzdį nustatoma, kad askorbino rūgšties elektrooksidacija prasideda nuo potencialo $-0,1 \text{ V}$ pagal Ag/AgCl, dėl to jos buvimas netrukdo L-laktato nustatymui prie $0,2 \text{ V}$.

2 Pavyzdys. Elektrodo stabilumo tyrimas

Elektrodas paruošiamas pagal aukščiau pateiktą metodiką. 12 parų laikotarpyje periodiškai matuojama elektros srovė (potencialas $-0,2$ V pagal Ag/AgCl) laktato koncentracija – $0,1-0,3$ mM. Duomenys pateikti 2 lentelėje.

2 Lentelė

Paros	1	2	3	4	5	8	10	11	12
Santykinė srovė, %	100	100	100	100	90	70	60	55	50

Matome, kad elektrodas išlaiko darbingumą ne mažiau 12 parų. Jų metu atlikta ne mažiau kaip 40 matavimų. Elektrodo praplovimas ir matavimas tęsiamas ne daugiau kaip 4 min.

3 Pavyzdys. L-laktato koncentracijos biologiniuose tirpaluose nustatymas

Elektrodas paruošiamas pagal aukščiau pateiktą metodiką. L-laktato koncentracija nustatoma kraujo plazmoje ir kultūrinėje galvijų leukozės viruso auginimo terpėje pagal 1 pavyzdį. Lygiagrečiai L-laktato koncentracija nustatoma spektrofotometrinio būdu pagal fericianido redukciją, katalizuojamą citochromo b_2 . Įvedant plazmos ar kultūrinio skysčio pavyzdžius į elektrocheminę ar spektrofotometrinę gardelę, jie praskiedžiami 10-40 kartų. Gauti duomenys pateikiami 3 lentelėje.

3 Lentelė

Tiriamasis tirpalas ir nustatymo būdas	L-laktato koncentracija, mM			
Kraujo plazma:				
a) spektrofotometriškai	0,125	0,185	0,43	0,53
b) pagal išradimą	0,10	0,16	0,39	0,485
Kultūrinis skystis:				
a) spektrofotometriškai	0,06	0,065	0,19	0,285
b) pagal išradimą	0,06	0,06	0,16	0,26

Kaip matome iš 3 lentelės duomenų, L-laktato koncentracijos, nustatytos spektrofotometriškai ir naudojant fermentinį elektrodą, praktiškai sutampa. Nustatymo laikas - ne didesnis kaip 4 min. Taigi, gautas elektrodas gali būti panaudotas L-laktato nustatymui biologinėse terpėse.

Kitas siūlomo būdo pranašumas - stiklo anglies elektrodo modifikacijos supaprastinimas.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Fermentinio elektrodo, skirto L-laktatui nustatyti, sukūrimo būdas naudojant citochromo b_2 adsorbciją laidininko sluoksnyje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad elektrodą modifikuoja suodžiais, oksiduotais azoto rūgštyje, o suodžius prieš elektrodo modifikaciją disperguoja acetono suspensijoje, turinčioje 2-5% fluoroplastinio lako ir 12-20⁰% suodžių.

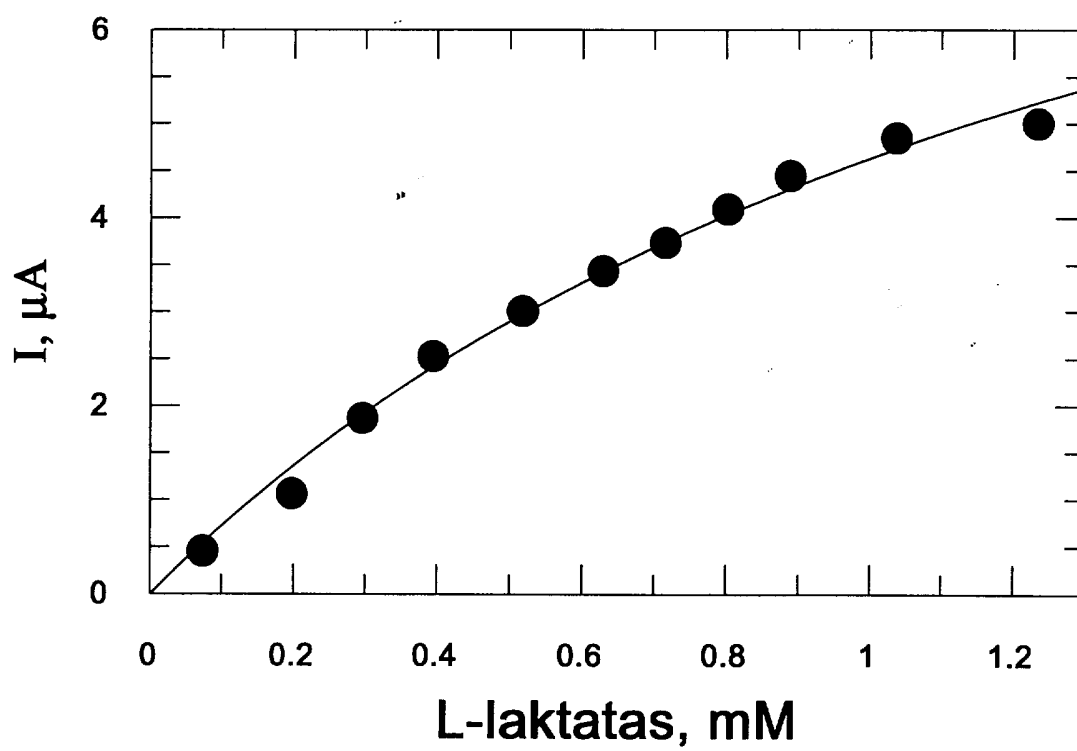


Fig. 1