



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ДЕПАРТАМЕНТ ПО ХИМИЧНИ НАУКИ

КАТЕДРА „АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ”

инж. Анна Йорданова Маринова

**Поточно-инжекционни ензимни методи с амперометрична и
спектрофотометрична детекция за определяне на лактат и
глюкоза в биологични течности**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен “доктор”

по научна специалност 4.2 Химически науки (Аналитична химия)

Научни ръководители: доц. д-р инж. Андриана Риск Сурлева

доц. д-р Тинка Георгиева Колушева

Научно жури:

доц. д-р инж. Данчо Даналев – председател, рецензент

проф. дхн Васил Симеонов - рецензент

проф. дхн Марияна Митева

доц. д-р Албена Дечева-Чакърова

доц. д-р инж. Андриана Сурлева

София, 2017г.

Дисертационният труд е написан на 89 страници, съдържа 25 фигури и 13 таблици.

Цитирани са 135 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Аналитична химия”, състояло се на 05.12.2016г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 20.03.2017 от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

ВЪВЕДЕНИЕ

Разработването на биосензори за определяне на лактат и глюкоза е обект на засилен изследователски интерес през последните години във връзка с тяхното приложение за медицинска диагностика и при контрола на процеси и продукти в хранителната индустрия.

Повишените физиологични нива на лактат се свързват с голям брой нарушени функции на организма: органна недостатъчност, ракови малформации, лекарствени отравяния или сепсис. Нормалните физиологични концентрации на лактат са под 2 mmol/L, при концентрации над 4 mmol/L състоянието се диагностицира като остър сепсис, а над 7 – 8 mmol/L - има летален изход. Изполваните методи са на базата на биомаркери или рентгенологични изследвания. Тестът с биомаркери не се отличава с добра надеждност и изисква повтаряне на изследванията, което удължава времето за анализ. Рентгенологичното изследване е свързано с излагане на организма на рентгеново лъчение и висока цена на апаратурата. Изследователският интерес се насочва към разработване на методи за определяне на лактат като биомаркер за диагностика на хирургически усложнения, които да позволяват определяне на концентрациите на лактат директно от дренажната хирургическа тръба и оценка на състоянието в локализираните области от засегнатите анатомични органи. Биосензорите за лактат, съдържащи модифицирани ензимни модули, предлагат бърз отклик, възможност за непрекъснат анализ, достъпна апаратура, сравнително ниска цена и възможност за автоматизиране на анализа. Тези предимства се използват и при технологичния контрол на ферментационни процеси в хранителната промишленост, където автоматизираният аналитичен контрол и ниската цена на анализа са от особено значение при избора на метод. През последните години в хранителната промишленост се налагат строги изисквания към информацията за състава на продуктите, достъпна за консуматорите. Млечната индустрия предлага на пазара продукти, означени като „без лактоза“ или „с ниско съдържание на лактоза“. Количественото определяне на ниски съдържания на лактоза в млечни продукти изисква чувствителни и надеждни методи за определяне на лактат в сложни матрици.

Глюкозата е най-често определяният аналит. От една страна, контролът на диабета е пряко свързан с определянето на концентрациите на глюкоза в кръвни проби и милиони диабетици ежедневно следят нивата на глюкоза в организма си. От друга страна, определянето на съдържанието на глюкоза представлява интерес и за модерната хранителна индустрия, тъй като тя влияе върху вкуса, структурата и енергийните стойности на хранителните продукти. Ензимните биосензори предлагат бързо, лесно и нeskъпо определяне и са основа на съвременните изследвания върху разработване на методи и средства за непрекъснат контрол на концентрациите на глюкоза. Биосензорите за глюкоза представляват 85 % от биосензорите, предлагани на пазара за аналитични устройства. Въпреки широкото предлагане, непрекъснато се разработват нови сензори, методи и стратегии за определяне на глюкоза в търсене на възможности за непрекъснат автоматизиран анализ, ниска цена, стабилен отклик и продължителна функция.

Основните подходи за ензимно определяне на лактат и глюкоза са: (1) внасяне на свободен ензим в изследваната система и (2) имобилизиране на ензими. Първият подход се прилага сравнително рядко, поради увеличения разход на ензим. Вторият подход, позволява ензимите да се използват многократно, с което да се намали значително себестойността на анализа и да се влияе върху стабилността, продуктното инхибиране и специфичността на ензима. Независимо от начина на внасяне на ензима, ензимната активност трябва да бъде постоянна, така че да се осигури зависимост на сигнала само от концентрацията на анализа при постоянни експериментални условия.

Имобилизацията на ензими представлява фиксиране на ензима към подложка (матрица), различна от субстрата или от продуктите на реакцията. Като подложки се използват различни инертни полимери или неорганични материали. Използваните подложки трябва да отговарят на следните изисквания: инертност, физична устойчивост, възможност за регенерация, стабилност, способност да повишават ензимната специфичност и активност и да намаляват продуктното инхибиране, неспецифичната адсорбция или микробиологичните замърсявания.

Екологичният мониторинг, хранително-вкусовата индустрия и клиничният анализ провокират разработването на селективни устройства за биомолекулна детекция, наречени биосензори. Биосензорът е устройство, съставено от две неотделимо свързани части:

- биорецептор, който представлява имобилизиран чувствителен биологичен елемент (ензим, ДНК, антитяло) „разпознаващ“ анализа (ензимен субстрат, антиген, комплиментарна ДНК).
- преобразувател, който превръща (био)химичния сигнал, възникнал в резултат на взаимодействието на анализа с биорецептора, в електрически сигнал. Интензитетът на генерирания сигнал е право или обратно пропорционален на концентрацията на анализа.

Биосензорите с електрохимичен преобразувател и ензим като биорецептор (ензимни електроди) са едни от най-интензивно разработваните сензори поради селективния и бърз отклик към специфичен субстрат. Едни от основните предимства на амперометричните биосензори са: нисък откриваем минимум (10 pmol/L) и широк линеен концентрационен интервал от порядъка на 3 - 6 декади. При биосензорите специфичната активност на биомолекулата и материала на подложката, върху която е имобилизирана, определят аналитичните характеристики: време за отклик, работен концентрационен обхват и чувствителност. Обектите за анализ и определяне на лактат и глюкоза са сложни матрици и детекторните системи трябва да се характеризират с: висока чувствителност и селективност при директни измервания, обратим и непрекъснат аналитичен сигнал, възможно малка подготовка на пробата с цел измервания в естествена среда. За повишаване селективността на ензимните електроди е предложено модифициране на биосензорите, но тяхното получаване се усложнява и оскъпява. Все по-голямо значение в съвременните устройства за определяне на лактат и глюкоза имат: простотата, удобството и лесния за провеждане анализ, ниската цена на анализа и на апаратурата, лесната поддръжка, възможността за включване в

преносими портативни анализатори. Въпросът за разработване на методи с минимална или без подготовка на пробата остава открит. Съвременните биосензори за лактат и глюкоза предлагат редица предимства, ограничение за тяхното по-широко приложение е ниската стабилност и кратък работен живот. Създаването на дълготрайни сензори продължава да е обект на засилен изследователски интерес.

В биосензорите биомолекулата, подложката и детекторният компонент работят при еднакви условия и оптимизирането на експерименталните условия е въпрос на много компромиси. Едно съвременно решение е включването им в системи за поточно-инжекционен анализ. Техниката на поточно-инжекционния анализ дава възможност за: автоматизация, миниатюризация, лесно модифициране на системата, възможност за включване на полупропускливи мембрани за намаляване на преченията, работа в затворена система, възможност за мултикомпонентен анализ и намален разход на реактиви. Включването на биосензори в поточно-инжекционната система поставя изискване за стабилност на сензора, висока устойчивост към „измиване“ и геометрия подходяща за включване в проточната клетка. Поточно-инжекционните биореактори позволяват да се преодолеят основните ограничения на биосензорите: в поточно-инжекционните системи работните условия за детектора и биокомпонента могат да се оптимизират отделно. Възможно е да се конструира поточно-инжекционна система със заменяеми биореактори, които се избират в зависимост от анализа, могат да се включат паралелно различни биореактори и да се определят едновременно няколко анализа с един и същ детектор. Биореакторът може да се заменя, без да е необходимо да се сменя и детекторът, който е независим компонент на системата. Допълнително предимство е възможността за съчетаването на биореакторите с безсензорна детекция. В поточно-инжекционния анализ този тип детекция може да работи независимо от предхождащата я ензимна реакция и дори при условия, неподходящи за ензимната реакция. Недостатък на биореакторите е увеличената дисперсия на пробата, особено ако се използват микрореактори с пълнеж. От гледна точка на достъпността на аналитичната апаратура, изследванията за подобряване на поточните ензимни методи за определяне на лактат и глюкоза бележат напредък със създаването на поточно-инжекционни системи с ензимни биореактори, които позволяват да се заменя биомодулът, независимо от детекторния компонент. Това отваря нови възможности за разработване на гъвкави аналитични устройства, които лесно се модифицират според аналитичната задача. Продуктното инхибиране и незадоволителната стабилност на ензима продължават да са сериозно предизвикателство при разработването и приложението на ензимни методи за определяне на лактат и глюкоза.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е **разработване на поточно-инжекционни ензимни методи за определяне на лактат и глюкоза в биологични течности.**

В тази връзка са поставени следните задачи:

1. Конструирание на поточно-инжекционни системи за определяне на лактат и глюкоза
2. Разработване на ензимни биореактори с имобилизирана лактатоксидаза или глюкозооксидаза.
3. Разработване на поточно-инжекционен метод за определяне на лактат с амперометрична детекция.
4. Разработване на поточно-инжекционен метод за определяне на лактат със спектрофотометрична детекция.
5. Разработване на поточно-инжекционен метод за определяне на глюкоза със спектрофотометрична детекция.

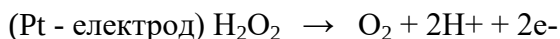
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

I. ПОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОНЕН ЕНЗИМЕН МЕТОД С АМПЕРОМЕТРИЧНА ДЕТЕКЦИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛАКТАТ

Ензимът лактатоксидаза (ЛОД), както и другите оксидазни ензими, включени в амперометрични биосензорни устройства, използват молекулен кислород, като естествен електронен акцептор и произвеждат водороден пероксид като продукт на ензимната реакция:



Полученият водороден пероксид се окислява на работния платинов електрод по реакцията:



Предимство на амперометричната детекция в сравнение със спектрофотометричната е по-широкият линеен обхват, отпада и нуждата от оптически чисти проби. Основни проблеми са:

- *Ниска селективност на амперометричния детектор към H_2O_2*

Измерването на концентрацията на водороден пероксид изисква висококаталитична електродна повърхност (Pt) и потенциал от +0,7 V (спрямо Ag/AgCl), при който и други електроактивни вещества: цистеин, аскорбат и урат се окисляват на работния електрод. Така предимството на специфичното действие на ензима ЛОД се влошава от по-ниската специфичност на посредника (H_2O_2). За преодоляване на този проблем се използват различни полупропускливи мембрани,

които пропускат само H_2O_2 или модифицирани амперометрични електроди, покрити с полимерен филм, съдържащ ензим. От една страна, кръвният серум и ферментационните течности, които са обект на анализ в тази работа, съдържат редица ниско и високомолекулни електроактивни вещества: аскорбинова киселина, пикочна киселина (или нейни соли урати), цистеин, различни плазмени белтъци и други. Някои автори предлагат лактатоксидазни биосензори на основата на различни полимерни носители, полупропускливи мембрани или композити с повишена електрокаталитична активност, които показват подобрена селективност. Описаните методи са валидирани в кръвен серум, вино, бира, мляко спрямо спектрофотометричен метод и получените резултати статистически съвпадат в рамките на доверителните интервали. Относителната грешка, обаче, при определяне на лактат варира в широки граници от 2 - 13% в реални проби.

Резултатите от анализа на лактат с амперометрична детекция се влошават и от присъствието на електроактивни метални йони поради неселективния сигнал на амперометричния детектор.

- Химическо пречене от матрични компоненти

Някои от нискомолекулните електроактивни компоненти на биологичните течности участват в окислително-редукционни реакции с H_2O_2 . Най-силно влияние има аскорбиновата киселина, която се окислява по реакцията:



и води до намаляване на количеството на продукта на ензимната реакция. В резултат определянето на лактат в матрици, съдържащи аскорбинова киселина, е обременено със системна отрицателна грешка.

- Ензимно пречене от ензима каталаза (пероксидаза), който окислява H_2O_2

В сложните биологични матрици се съдържа ензима каталаза (пероксидаза), който окислява H_2O_2 и намалява количеството на продукта на главната ензимна реакция.

- Продуктно инхибиране на ензима от високи концентрации H_2O_2

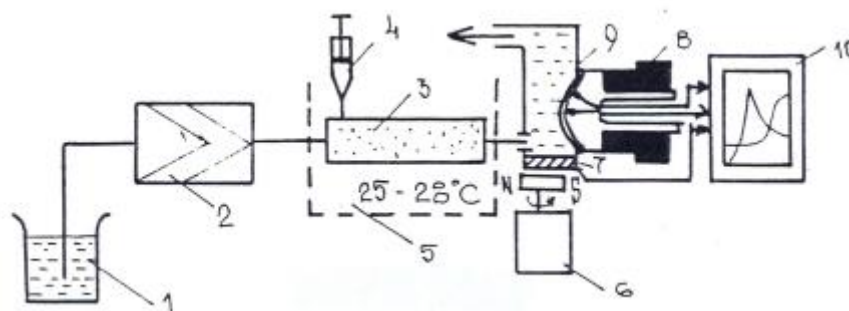
Друг недостатък, който съпътства използването на оксидазни ензими за аналитични цели е продуктното инхибиране на ензима от високи концентрации H_2O_2 .

1. Решения за подобряване на селективността на метода

За преодоляване на изброените проблеми и повишаване на селективността и точността на метода в настоящата работа са предложени конструктивен и химически подход.

Конструктивният подход е основан на разработване на амперометрична детекторна клетка с модифицирана полупропусклива ензимна мембрана, представена на Фигура 1. Мембраната, от една страна, играе ролята на подложка за имобилизирания върху зеолита ензим, а от друга ограничава достъпа на електроактивни пречещи компоненти до електродната повърхност. Многослойната

мембрана е съставена от: микрофилтър, през чийто пори могат да преминават само молекули с малки размери (лактат, газове, водороден пероксид, вода и др.), слой от полистирен, съдържащ имобилизиран върху зеолит ензим и целулозно-ацетатен слой. Общата дебелина на мембраната е 60 - 70 μm . Порите на микрофилтъра не допускат контакт между високомолекулните електроактивни матрични компоненти на изследваните биологични течности и работния електрод на амперометричния детектор. Целулозно-ацетатният слой допълнително повишава селективността на мембраната.

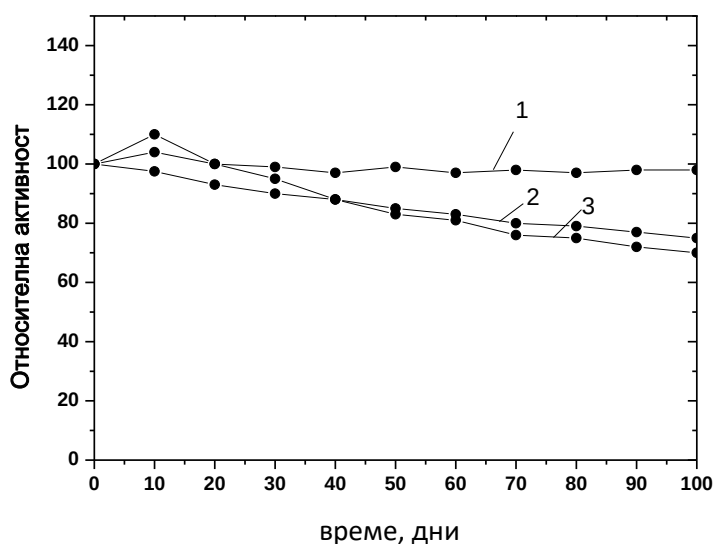


Фигура 1. Блок-схема на поточно-инжекционна система за определяне на лактат: 1 – буферен разтвор; 2 – перисталтична помпа; 3 – ензимен биореактор с имобилизирана лактатоксидаза; 4 – инжектор; 5 – термостат; 6 – магнитна бъркалка; 7 – спомагателен (плосък платинов електрод); 8 – детекторна клетка с жичен платинов работен електрод и сребро-сребърнохлориден сравнителен електрод; 9 – ензимна мембрана; 10 – регистриращо устройство.

Химическият подход е основан на маскиране и инхибиране на пречещи матрични компоненти. За целта към потока-носител (0,01 mol/L калиевофосфатен буфер с $\text{pH} = 7,14$) се добавят: (а) 0,1 mmol/L ЕДТА за маскиране на някои метали, съдържащи се в анализирани обекти, и (б) натриев азид за блокиране на действието на ензима каталаза (пероксидаза). Изполвано е калибриране с наподобяване на матрицата. Към стандартните разтвори на лактат се добавят средните физиологични концентрации на електроактивните компоненти: аскорбинова киселина (0,1 mmol), урат (0,4 mmol) и цистеин (0,08 mmol). По този начин аналитичният сигнал за лактат в стандартните разтвори и в изследваните проби се повлиява приблизително по един и същ начин от тяхното присъствие. Проведени са серия експерименти за определяне на лактат с поток-носител, съдържащ : а) фосфатен буфер; б) фосфатен буфер и ЕДТА и в) фосфатен буфер, ЕДТА и натриев азид. Всеки експеримент се провежда с две серии стандартни разтвори на лактат с и без наподобяване на матрицата. Резултатите показват, че съчетанието на поток-носител със състав: фосфатен буфер с натриев азид и ЕДТА, и калибровъчни разтвори на лактат с добавени урат, аскорбинова киселина и цистеин води до подобряване на точността на метода за определяне на лактат: относителната грешка намалява до 2 - 3%.

2. Подобряване на ефективността и удължаване на работната способност на ензимния реактор

Друг недостатък, който съпътства използването на оксидазни ензими за аналитични цели, е продуктното инхибиране на ензима от високи концентрации H_2O_2 . В предложената система за поточно-инжекционен анализ (Фигура 1), този проблем е решен чрез използване на комбинация от ензимен биореактор и ензимна мембрана на амперометричния сензор. В разработения биореактор се имобилизира по-малко количество ензим, който катализира окислението на около 60 - 65% от съдържащия се в биологичните течности лактат. Количеството на получения в резултат на това окисляване H_2O_2 не е достатъчно, за да инактивира значително имобилизирания в биореактора ензим. Неокисленият в биореактора лактат се пренася с потока-носител до детекторната клетка, където се извършва допълнителното му окисление в ензимната мембрана. За изследване на относителната ефективност на ензимния поточно-инжекционен модул с биореактор и електродна мембрана са сравнени силата на тока в амперометричната клетка в началото на работния живот на ензимните поточно-инжекционни компоненти (биореактор и мембрана) със сигналите, получавани през определен работен период. Ефективността на ензимния биореактор и ензимната мембрана и степента на тяхното продуктно инхибиране са оценени чрез относителната активност. Относителната активност се изчислява като процентно отношение на чувствителността на работния електрод в даден момент към чувствителността, получена при първото измерване. Изследвана е ефективността на поточно-инжекционна система с биореактор, поточно-инжекционна система с ензимна електродна мембрана и поточно-инжекционна система с биореактор и ензимна мембрана. Резултатите са представени на Фигура 2.



Фигура 2. Относителна активност на имобилизираната в ензимния биореактор и ензимната мембрана лактатоксидаза (ЛОД): (1) комбинация от ЛОД мембранен електрод и ЛОД биореактор; (2) само ЛОД биореактор; (3) само ЛОД мембранен електрод

От фигурата се вижда, че има съществена разлика в относителната активност на имобилизирания ензим, когато в поточно-инжекционната система са включени само ензимен биореактор или само ензимна мембрана. За период от 100 дни се наблюдава намаляване на относителната активност на ензимния биореактор с около 25 % и на ензимната мембрана – с около 20 %, дължащо се главно на продуктно инхибиране на имобилизирания ензим. Комбинацията от поточно-инжекционен ензимен биореактор и ензимна електродна мембрана запазва ефективността си и не е подложена на продуктно инхибиране в продължение на 100 работни часа при анализ на повече от 400 проби от биологични ферментационни течности. Понижаването на относителната активност за изследвания период е само 2 %. Относителната активност на комбинирания ензимен поточно-инжекционен модул с биореактор и ензимна мембрана е изследвана в продължение на 18 месеца. Резултатите показват понижаване на активността с около 5 %. Предложеният конструктивен подход значително увеличава работния живот на ензимните модули. В сравнение, описаните в литературата ензимни електроди се характеризират с дълготрайност от 20-30 дни. Удължена дълготрайност до 3 месеца се съобщава за ензимен електрод с ковалентно имобилизирана ЛОД върху платинови наночастици върху въглероден електрод.

Допълнително предимство на предложения поточно-инжекционен ензимен модул с биореактор и електродна мембрана е възможността да се работи с по-голяма скорост на потока-носител (2 mL/min). По-високата скорост на потока, от една страна повишава производителността на анализа, а от друга намалява степента на продуктно инхибиране на имобилизираната в биореактора ЛОД, поради по-краткото време за контакт между ензима и продукта на ензимната реакция H_2O_2 .

3. Аналитични характеристики на метода

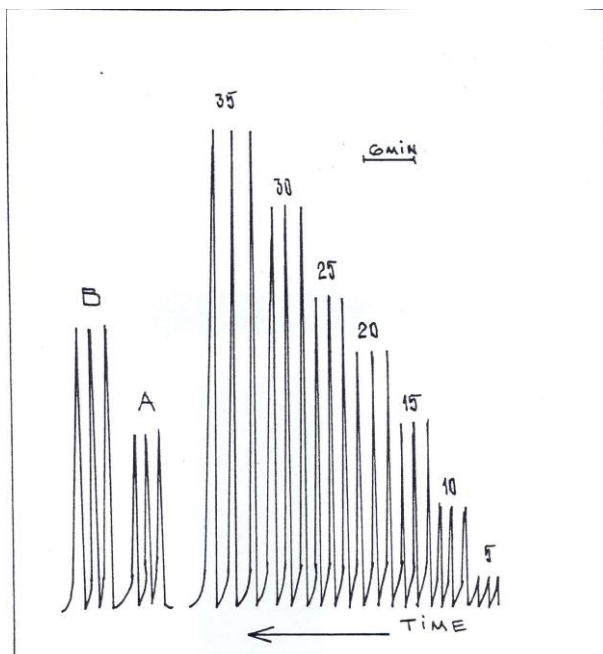
- Линеен работен обхват

Калибровъчната функция е линейна в концентрационния интервал $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-2}$ mol/L лактат ($y=86400x+19$; $r=0.9999$, $n=5$) с чувствителност 86,4 $\mu\text{A.L/mol}$ (при обем на инжектираната проба 50 μL). За калибриране са използвани стандартни разтвори на лактат с добавени средни физиологични количества: аскорбинова киселина (0,1 mmol), урат (0,4 mmol) и цистеин (0,08 mmol). Определяемият минимум (LOD) е $2,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L, границата на количествено определяне (LOQ) е $6,8 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

- Възпроизводимост на аналитичния сигнал

Възпроизводимостта на поточно-инжекционния сигнал в трите изследвани поточно-инжекционни системи, съдържащи (1) ензимен биореактор; (2) ензимен електрод и (3) ензимен модул с биореактор и електродна мембрана е изследвана чрез трикратно инжектиране на стандартни разтвори на лактат с различна концентрация и на два контролни серума. Резултатите са представени на Фигура 3 и Таблица 1. Повторяемостта на аналитичните сигнали в поточно-инжекционната система с ензимен модул е по-добра в сравнение с поточно-инжекционната система с един ензимен компонент. Относителното стандартно отклонение при инжектиране на стандартни

разтвори на лактат е между 0,8 и 2 % в зависимост от концентрацията на лактата в стандартните разтвори, а при анализ на кръвен серум е по-малко от 3 % (Фигура 3).



Фигура 3. Поточно-инжекционни пикове, получени при трикратно инжектиране на стандартни лактатни разтвори в концентрационен интервал $5 - 35 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ и два контролни серума (A, B)

Таблица 1

Прецизност на калибрационните резултати за няколко стандартни разтвора на лактат (N=10)

Концентрация на лактата ($\cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$)	5	10	15	20
ПИА-система, включваща ензимен биореактор и ензимна мембрана				
Средна височина на пика (nA)	450	881	1322	1743
S (nA)	9,4	10,0	15,2	13,8
S _r (%)	2,1	1,1	1,2	0,8
ПИА-система, включваща само ензимен биореактор				
Средна височина на пика (nA)	280	485	678	869
S (nA)	5,2	8,6	10,4	12,3
S _r (%)	1,9	1,8	1,5	1,4
ПИА-система, включваща само ензимна мембрана				
Средна височина на пика (nA)	220	426	636	827
S (nA)	3,4	6,7	8,2	9,2
S _r (%)	1,6	1,6	1,3	1,1

4. Приложение на метода

Поточно-инжекционният метод с ензимен модул от биореактор и електродна мембрана на амперометричния детектор е приложен за определяне на лактат в кръвен серум и ферментационни течности от млечнокисела ферментация. Резултатите са представени в Таблицы 2 и 3. Анализирани са 12 проби от три типа серуми (Таблица 2) и по три проби от ферментационните течности, съдържащи лактат, получен в резултат на действието на различни микроорганизми (Таблица 3). Предложеният ензимен поточно-инжекционен метод се характеризира с добра прецизност при определяне на лактат и в двата типа обекти : S_r е по-малко от 3 % при анализ на кръвен серум (Таблица 2) и по-малко от 3,5 % при анализ на ферментационни течности (Таблица 3). За оценка на точността на предложения поточно-инжекционен метод пробите са анализирани чрез спектрофотометричен метод на Триндер. Относителната грешка за съдържанието на лактат в реални проби, изчислена спрямо резултатите от стандартния спектрофотометричен метод, варира от 1,0 до 3,2 %.

Резултатите за концентрациите на лактат в кръвен серум и ферментационни течности, получени по двата метода, са сравнени чрез t-тест при статистическа вероятност 95%. F-тестът показва, че стандартните отклонения на двете серии резултати са статистически неотличими с вероятност 95%. t-тестът показва, че средните стойности за концентрациите на лактат в проби от серум и ферментационни течности, получени по двата метода, статистически са неотличими с вероятност 95%. Изключение са резултатите за проби №3 (Таблицы 2 и 3), за които t-тестът показва, че двете средни стойности за концентрациите са статистически отличими с вероятност 95%.

Таблица 2

Резултати от определяне на концентрация на лактат в кръвен серум чрез поточно-инжекционен метод (ПИА метод) с ензимен модул и амперометрична детекция и чрез стандартен спектрофотометричен метод

№	вид на пробата	Брой измервания	Ензимен ПИА метод		Спектрофотометричен метод
			$C_{\text{лактат}}, \text{mmol/L}$	$S_r \%$	$C_{\text{лактат}}, \text{mmol/L}$
1	Серотрол 25Н	6	$2,50 \pm 0,01$	0,4	$2,50 \pm 0,10$
3	Серотрол Н	6	$2,34 \pm 0,07$	3,0	$2,35 \pm 0,10$
4	Серотрол Н	7	$2,28 \pm 0,06$	2,6	$2,45 \pm 0,08$
5	Серотрол Н	5	$2,45 \pm 0,24$	1,6	$2,35 \pm 0,11$
6	Серотрол Н	6	$2,53 \pm 0,05$	1,9	$2,50 \pm 0,10$
7	Серотрол Н	5	$2,47 \pm 0,06$	2,4	$2,50 \pm 0,10$
8	Човешки серум	7	$4,50 \pm 0,06$	1,3	$4,45 \pm 0,10$
9	Човешки серум	6	$3,15 \pm 0,08$	2,5	$3,20 \pm 0,11$
10	Човешки серум	6	$4,58 \pm 0,12$	2,8	$4,57 \pm 0,10$
11	Човешки серум	6	$4,50 \pm 0,13$	2,9	$4,55 \pm 0,12$
12	Човешки серум	6	$2,50 \pm 0,06$	2,4	$2,48 \pm 0,11$

Таблица 3

Резултати от определяне на концентрацията на лактат във ферментационни течности от млечнокисела ферментация чрез разработения ензимен поточно-инжекционен метод с амперометрична детекция и стандартен спектрофотометричен метод

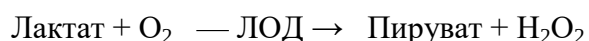
№	Продукт (вид микро- организъм)	Брой измерв ания	Ензимен ПИА-метод		Спектрофото метричен метод
			С _{лактат} , mmol/L	S _r , %	С _{лактат} , mmol/L
1	Lactobacillus Delbrucki	6	6,11 ± 0,21	3,4	6,00 ± 0,11
2	Lactobacillus Delbrucki	6	8,95 ± 0,25	2,8	9,20 ± 0,12
3	Lactobacillus Delbrucki	5	8,78 ± 0,03	0,3	9,12 ± 0,10
4	Streptococcus Lactis	6	9,96 ± 0,11	1,1	10,00 ± 0,20
5	Streptococcus Lactis	5	9,78 ± 0,12	1,2	9,85 ± 0,22
6	Streptococcus Lactis	5	9,85 ± 0,24	2,4	9,80 ± 0,30
7	Streptococcus Lactis	6	10,08 ± 0,20	2,0	9,98 ± 0,20
8	Lactobacterium Pentoaceticum	6	10,12 ± 0,20	2,0	10,02 ± 0,40
9	Lactobacterium Pentoaceticum	7	12,22 ± 0,21	1,7	12,25 ± 0,36
10	Lactobacterium Pentoaceticum	6	10,14 ± 0,15	2,0	10,00 ± 0,20
11	Lactobacterium Pentoaceticum	5	11,40 ± 0,12	1,1	11,42 ± 0,12

II. ЕНЗИМЕН СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН ПОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОНЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛАКТАТ И ГЛЮКОЗА

Разработването на ензимен спектрофотометричен метод за определяне на глюкоза и лактат е основано на:

а) ензимно катализирано окисление на глюкоза и лактат с образуване на H_2O_2

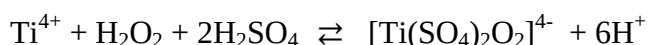
Под действие на ензимите глюкозооксидаза (ГОД) и лактатооксидаза (ЛОД) протича аеробно окисление на глюкоза и лактат, съответно, по реакциите:



За реализирането им в поточно-инжекционни условия е необходимо да се разработят два типа колонни поточно-инжекционни биореактори с различни имобилизирани ензими: глюкозооксидаза и лактатооксидаза. По литературни данни и от предишни изследвания са избрани оптималните условия за протичане на ензимните реакции: 0,01 mol/L калиевофосфатен буфер с pH = 5,8 (окисление на глюкоза в присъствие на ГОД) и с pH = 6,8 (окисление на лактат в присъствие на ЛОД).

б) определяне на количеството генериран H_2O_2

За спектрофотометрично определяне на образувания в резултат на ензимна реакция H_2O_2 е избран метода, при който H_2O_2 се определя под формата на комплекс с титан (IV). Титан (IV) взаимодейства с водороден пероксид в кисела среда, като образува комплексно съединение с жълто - оранжев цвят с максимална абсорбция при $\lambda=400$ nm. Образуваният комплекс не е много стабилен: $\beta \sim 10^{4.5}$. Комплексообразувателната реакция протича по-пълно в 7% сярна сярна киселина. В тази среда Ti(IV) реагира с водороден пероксид като образува аниона на титанилсярната киселина:



1. Изследване на комплексообразувателната реакция в стационарни условия

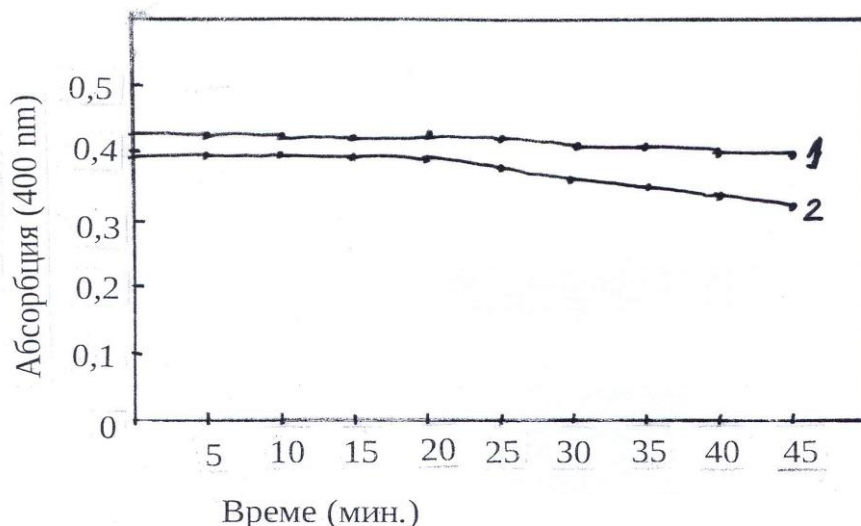
Максималната абсорбция на комплексния йон $[Ti(SO_4)_2O_2]^{4-}$ се наблюдава при 400 nm, а определената моларна абсорбируемост е $\epsilon = 7 \cdot 10^2$ L/mol.cm.

а) влияние на pH на средата

Изучено е влиянието на pH в интервала от 0,5 до 6,0 върху абсорбцията на комплекса. Резултатите показват, че абсорбцията на комплекса $[Ti(SO_4)_2O_2]^{4-}$ не зависи от киселинността на средата в границите от pH = 0,5 до pH = 5,0. За намаляване на влиянието на фосфатните йони, присъстващи както в биологичните течности, така и в буфера, играещ ролята на поток-носител, всички изследвания са проведени при pH = 1,0.

б) стабилност на комплекса $[\text{Ti}(\text{SO}_4)_2\text{O}_2]^{4-}$

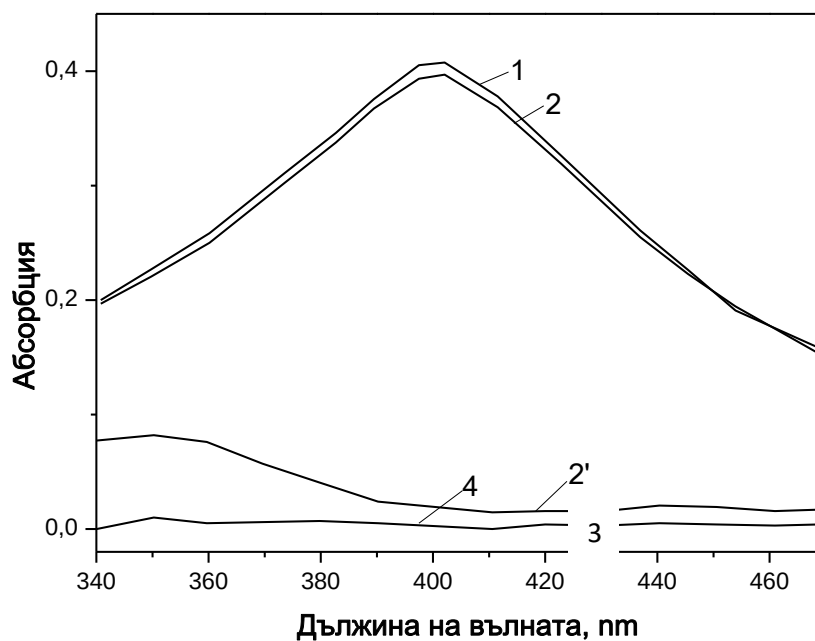
Проследена е стабилността на комплексното съединение с времето. Комплексът е стабилен до 20 мин. след образуването му, след което се наблюдава, макар и незначително, понижаване на абсорбцията при λ_{max} (Фигура 4).



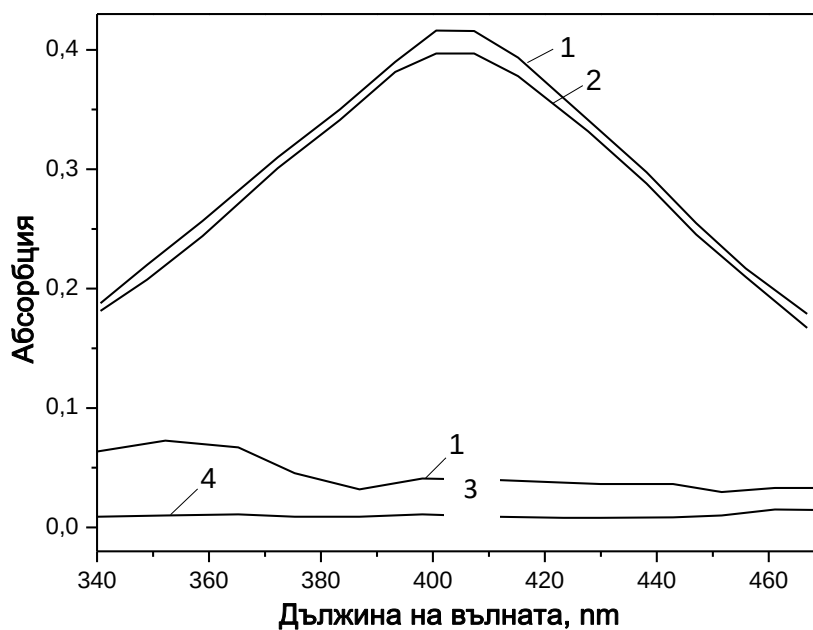
Фигура 4. Стабилност на комплекса $\text{Ti(IV)}\text{-H}_2\text{O}_2$ при различни концентрации на H_2O_2 : (1) $5,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ и (2) $5,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$

в) влияние на пречещи компоненти

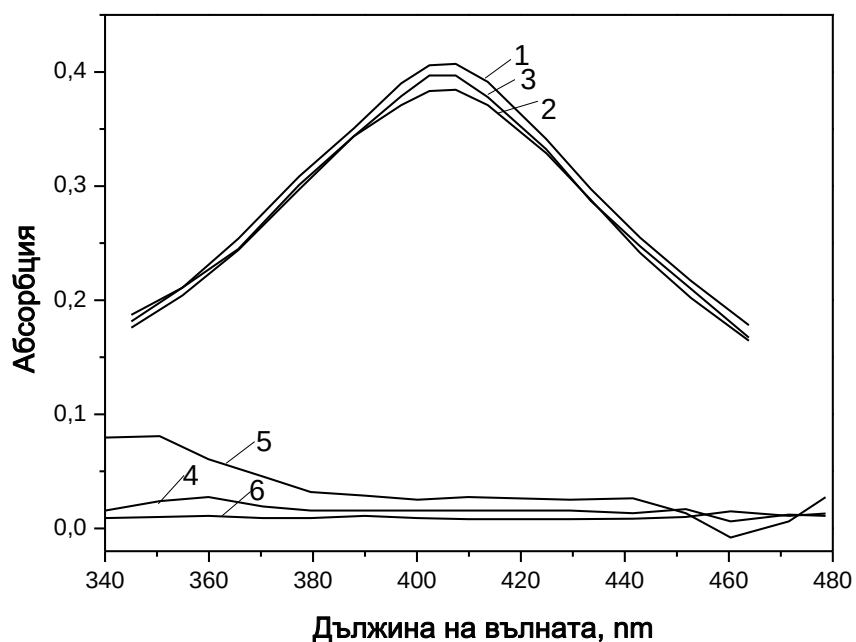
Пречещото действие на редица вещества, повечето от които естествено присъстват в биологичните течности, беше изследвано чрез добавянето им към моделни разтвори на водороден пероксид и измерване на абсорбцията. Получените резултати са представени на Фигури 5-9. Сравнени са абсорбционните спектри на разтвори, съдържащи: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{пречещ компонент}$; (3) $\text{Ti(IV)} + \text{пречещ компонент}$; (4) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{пречещ компонент}$. Наблюдава се слабо понижение на абсорбцията на комплекса $[\text{Ti}(\text{SO}_4)_2\text{O}_2]^{4-}$ при 400 nm. Както се вижда от спектрите, представени с криви 3 на Фигури 5-9, протича химична реакция между Ti(IV) и цитрат, цистеин, аскорбинова киселина или NaF. Продуктите на реакцията, обаче, абсорбират фотони под 387 nm и абсорбцията при $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ се понижава с 1-1,5 %. Следователно, при изследваните концентрации на Ti(IV) и H_2O_2 (в съотношение 1:1) цитрат, цистеин, аскорбинова киселина и NaF влияят незначително върху абсорбцията на комплекса.



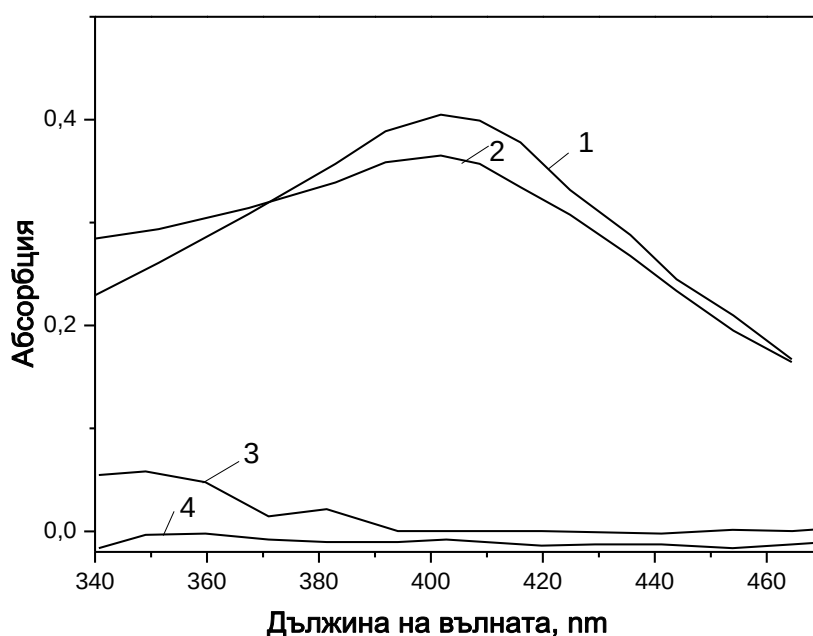
Фигура 5. Абсорбционни спектри на: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цитрат; (3) $\text{Ti(IV)} + 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цитрат; (4) $\text{H}_2\text{O}_2 + 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цитрат; Концентрацията на Ti(IV) е $6,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Концентрацията на H_2O_2 е $5,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.



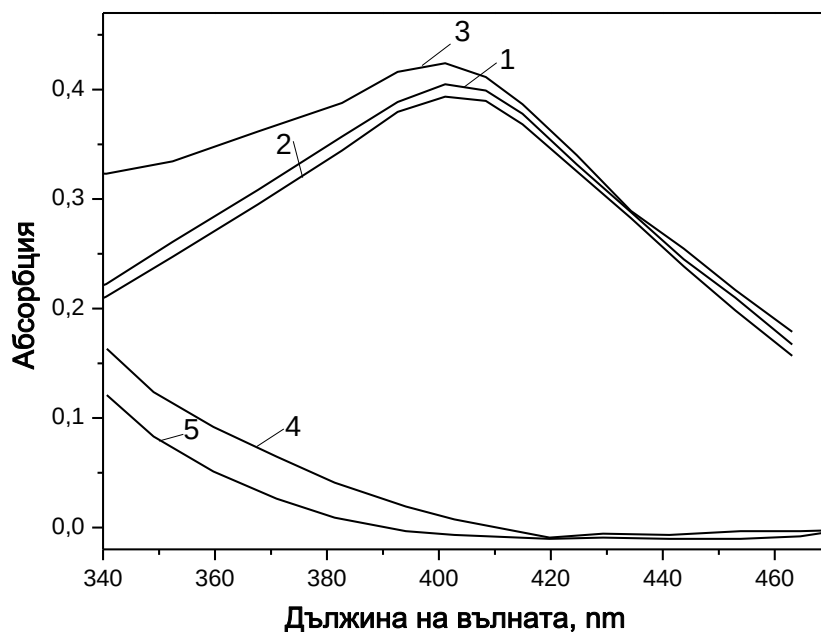
Фигура 6. Абсорбционни спектри на: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цистеин; (3) $\text{Ti(IV)} + 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цистеин; (4) $\text{H}_2\text{O}_2 + 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ цистеин. Концентрацията на Ti(IV) е $6,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Концентрацията на H_2O_2 е $5,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.



Фигура 7. Абсорбционни спектри на: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ аскорбинова киселина; (3) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ аскорбинова киселина; (5) $\text{Ti(IV)} + 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ аскорбинова киселина; (6) $\text{H}_2\text{O}_2 + 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ аскорбинова киселина; (6) $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ аскорбинова киселина. Концентрацията на Ti(IV) е $6,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Концентрацията на H_2O_2 е $5,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.



Фигура 8. Абсорбционни спектри на: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L NaF}$; (3) $\text{Ti(IV)} + 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L NaF}$; (4) $\text{H}_2\text{O}_2 + 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L NaF}$. Концентрацията на Ti(IV) е $6,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Концентрацията на H_2O_2 е $5,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.



Фигура 9. Абсорбционни спектри: (1) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2$; (2) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 5.10^{-5} \text{ mol/L Fe(NO}_3)_2$; (3) $\text{Ti(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 + 1.10^{-4} \text{ mol/L Fe(NO}_3)_2$; (4) $\text{Ti(IV)} + 1.10^{-4} \text{ mol/L Fe(NO}_3)_2$; (5) $\text{H}_2\text{O}_2 + 1.10^{-4} \text{ mol/L Fe(NO}_3)_2$. Концентрацията на Ti(IV) е $6.05.10^{-4} \text{ mol/L}$. Концентрацията на H_2O_2 е $5.88.10^{-4} \text{ mol/L}$.

На Фигура 9 са представени абсорбционните спектри на $[\text{Ti}(\text{SO}_4)_2\text{O}_2]^{4-}$ комплекс в присъствие на Fe^{3+} . При сравнение на криви 1 и 3 се забелязва нарастване на абсорбцията на комплекса в присъствие на $\text{Fe(NO}_3)_2$. Абсорбционните спектри (фигура 9, криви 4 и 5) показват, че протичат странични реакции както между Ti(IV) и $\text{Fe(NO}_3)_2$, така и между H_2O_2 и $\text{Fe(NO}_3)_2$. Продуктите на реакциите слабо абсорбират фотони при 400 nm и увеличението на абсорбцията при изследваните концентрации е около 3 %.

Изследвано е влиянието на отношението на количеството на реактива Ti(IV) и количеството на H_2O_2 върху абсорбцията на комплекса $[\text{Ti}(\text{SO}_4)_2\text{O}_2]^{4-}$ в присъствие на пречещи компоненти. Към стандартни разтвори, съдържащи H_2O_2 с концентрация 6.10^{-4} mol/L и Ti(IV) 4.10^{-3} mol/L , са добавени: NaF , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , KCl , MgCl_2 , аскорбинова киселина, лимонена киселина, $\text{Fe(NO}_3)_2$, $\text{Cu(NO}_3)_2$, пикочна киселина, цистеин, пируват в различни концентрации. Влиянието на пречещите компоненти е оценено чрез аналитичния добив за H_2O_2 . В Таблица 4 са представени резултатите за аналитичния добив при излишък на реактива Ti(IV) и на пречещите компоненти спрямо съдържанието на H_2O_2 в моделните разтвори. Представените резултати показват, че при 6,5-кратен излишък на Ti(IV) спрямо концентрацията на H_2O_2 влиянието на пречещи компоненти се намалява и аналитичният добив е между 98 и 101 %. За по-нататъшните изследвания по разработване на поточно-инжекционен метод е избрана концентрация на Ti(IV) 4.10^{-3} mol/L .

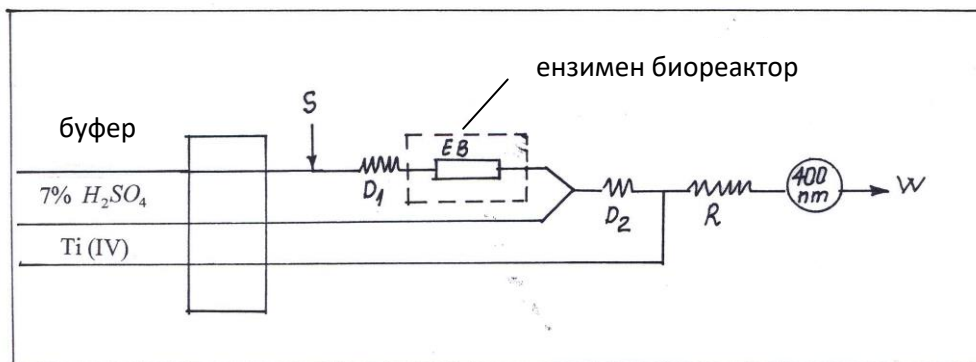
Таблица 4

Аналитичен добив в присъствие на някои пречещи компоненти. Концентрацията на H_2O_2 в изследваните моделни разтвори е $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, концентрацията на Ti(IV) е $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$

Компонент	Концентрация mol/L	Аналитичен добив, H_2O_2 %
NaF	$6 \cdot 10^{-3}$	96,2
	$2,7 \cdot 10^{-3}$	97,4
Na_2HPO_4	$2 \cdot 10^{-1}$	96,5
	$1 \cdot 10^{-2}$	98,0
K_2HPO_4	$1 \cdot 10^{-1}$	96,8
	$1 \cdot 10^{-2}$	98,1
KCl	$1 \cdot 10^{-1}$	98,2
	$1,2 \cdot 10^{-2}$	99,3
MgCl_2	$1 \cdot 10^{-2}$	99,5
аскорбинова киселина	$1,4 \cdot 10^{-4}$	97,1
	$5,6 \cdot 10^{-5}$	99,8
лимонена киселина	$3,2 \cdot 10^{-2}$	88,2
	$3,2 \cdot 10^{-3}$	98,7
$\text{Fe(NO}_3)_2$	$1 \cdot 10^{-3}$	104,0
	$1,4 \cdot 10^{-4}$	101,9
	$5 \cdot 10^{-5}$	101,5
$\text{Cu(NO}_3)_2$	$1 \cdot 10^{-4}$	99,7
	$1 \cdot 10^{-5}$	99,9
пикочна киселина	$1,1 \cdot 10^{-3}$	99,2
цистеин	$2,1 \cdot 10^{-2}$	89,2
	$4 \cdot 10^{-3}$	98,9
пируват	$1 \cdot 10^{-3}$	99,2

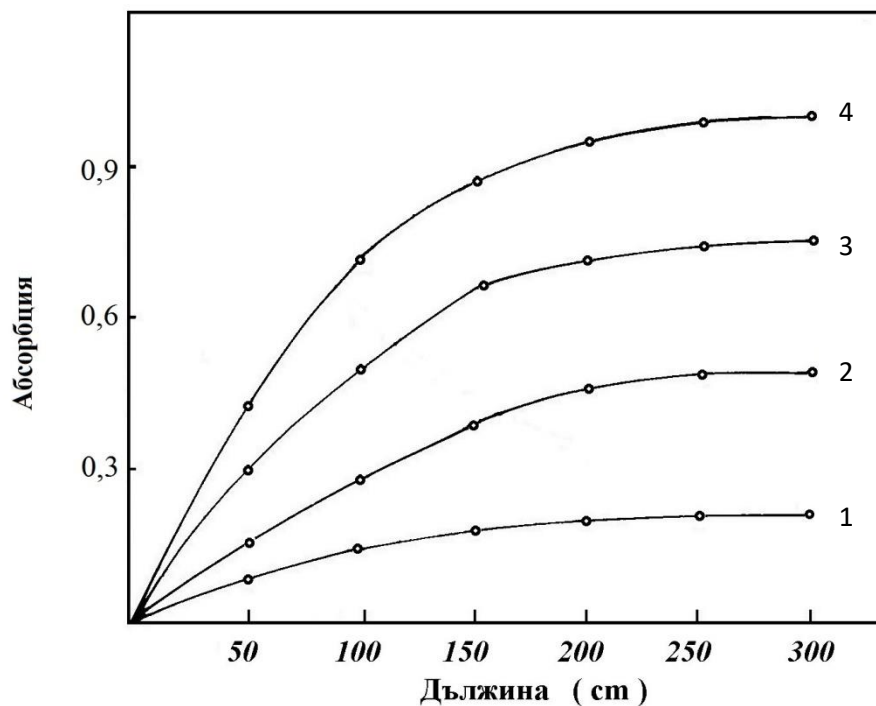
2. Конструиране на поточно-инжекционната система

Реакцията на ензимно окисление на анализа и реакцията между образувания H_2O_2 и фотометричния реактив протичат в среда с различна киселинност и различен химичен състав, това налага конструиране на многоканална поточно-инжекционна система. В настоящата работа е конструирана три канална система (Фигура 10):

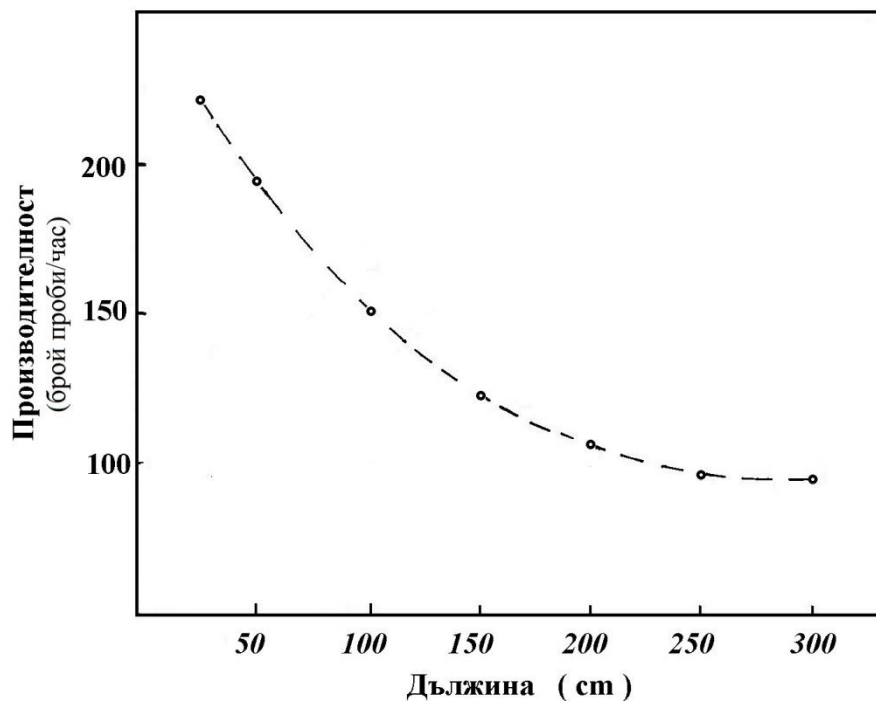


Фигура 10. Многоканална ПИС за спектрофотометрично определяне на водороден пероксид, на лактат и на глюкоза след ензимна реакция

Потокът-носител е калиевофосфатен буфер (0,01 mol/L) с $pH = 5,8$ при определяне на глюкоза и с $pH = 6,8$ при определяне на лактат. За намаляване на преченията в реални проби и блокиране на действието на ензима каталаза (пероксидаза) към потока-носител се добавя натриев азид. Резултатите, получени чрез метода с амперометричен детекция, показаха, че това е ефективен начин за преодоляване на пречения от този тип. В този поток е включен ензимния биореактор. За създаване на подходяща киселинност в поточната система е включен втори поток от 7% H_2SO_4 , който се смесва с потока-носител след ензимния реактор. Подкисляването на потока продължава в реакционна намотка (D_2). Третият поток е разтвор на $Ti(IV)$ с концентрация $4 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Комплексообразователната реакция протича в реакционна намотка (R) и образувания $[Ti(SO_4)_2O_2]^{4-}$ постъпва в проточната спектрофотометрична клетка. Изследвана е зависимостта на абсорбцията на комплекса от дължината на реакционната намотка (R). Резултатите са представени на Фигура 11. Абсорбцията нараства с увеличаване на дължината на реакционната намотка до 150 cm. Понататъшното увеличаване на реакционната намотка влияе много по-слабо върху стойността на абсорбцията, тъй като на предимствата на по-дългото реакционно време се противопоставя ефектът на разреждане в резултат на дисперсия на зоната на пробата. С увеличаване на дължината на реакционната намотка се понижава и производителността на анализа (Фигура 12). В настоящата работа е използвана реакционна намотка с дължина 150 cm.



Фигура 11. Влияние на дължината на реакционната намотка върху интензитета на абсорбцията на $[\text{Ti}(\text{SO}_4)_2\text{O}_2]^{4-}$ при $\lambda_{\text{max}} = 400\text{nm}$ и концентрация на H_2O_2 : (1) $2,9 \cdot 10^{-4}$; (2) $5,8 \cdot 10^{-3}$; (3) $1,2 \cdot 10^{-3}$; (4) $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$



Фигура 12. Влияние на дължината на реакционната намотка върху производителността на анализа

3. Аналитични характеристики на метода за определяне на лактат и глюкоза

- Работна концентрационна област

Линейната динамична област на спектрофотометричния метод е определена чрез директно инжектиране в поточно-инжекционната система на стандартни разтвори на водороден пероксид, на глюкоза и на лактат. Резултатите са представени в Таблица 5. В таблицата е представена и прецизността на поточно-инжекционните сигнали за изследвания концентрационен интервал.

Таблица 5

Линейна концентрационна област и прецизност на поточно-инжекционните сигнали за H_2O_2 , лактат и глюкоза, определени чрез спектрофотометричен поточно-инжекционен метод с ензимни биореактори

аналит	линейна концентрационна област, mol/L	прецизност на ПИ сигнали, Sr, %
H_2O_2	$1,0 \cdot 10^{-4} \div 3,0 \cdot 10^{-3}$	2,0
лактат	$2,2 \cdot 10^{-4} \div 2,8 \cdot 10^{-3}$	2,4
глюкоза	$2,2 \cdot 10^{-4} \div 1,6 \cdot 10^{-3}$	2,5

- Производителност на анализа

При така описаните условия (pH=0,8-1,0 и температура 20 °C) скоростта на анализа е 120 проби/час, когато се определя директно водороден пероксид и 90–100 проби/час при анализ на водороден пероксид, получен след ензимното окисление на глюкоза и лактат.

- Селективност и точност

Пречещото действие на редица вещества, повечето от които естествено присъстват в серума и други биологични течности, е изследвано чрез добавянето им към моделни разтвори на глюкоза или лактат и измерване на абсорбцията при $\lambda_{\max}=400$ nm. Точността на разработения ензимен спектрофотометричен метод е оценена чрез аналитичния добив в присъствие на матрични компоненти. Резултатите са представени в Таблица 6. В таблицата са представени и коефициентите на селективност, дефинирани като $K_{A/I}$ и изчислени при най-високата концентрация на пречещия йон:

$$K_{A/I} = \frac{k_I}{k_A} = \frac{S_I/C_I}{S_A/C_A}, \text{ където: } S_I - \text{аналитичния сигнал на анализа в присъствие на}$$

пречещия йон; C_I - концентрация на пречещия йон; S_A – аналитичен сигнал в отсъствие на пречещ йон; C_A – концентрация на анализа. Стойности на $K_{A/I}$ по-големи от 1 показват, че методът е по-селективен към пречещия йон, отколкото към анализа.

Таблица 6

Аналитичен добив в присъствие на някои пречещи компоненти. Концентрация на глюкоза и лактат в изследваните моделни разтвори е $6 \cdot 10^{-4}$ mol/L

Компонент	Концентрация mol/L	Аналитичен добив, глюкоза %	Аналитичен добив, лактат %	K _{A/L}
NaF	$6 \cdot 10^{-3}$ $3 \cdot 10^{-3}$	96,4 97,2	96,1 97,0	0,096
Na ₂ HPO ₄	0,2 0,02	96,3 98,2	96,6 98,4	0,003
K ₂ HPO ₄	0,1 0,01	96,9 98,3	96,5 98,1	0,006
KCl	0,1 0,01	98,0 99,2	98,3 99,0	0,006
MgCl ₂	0,01	98,9	99,2	0,003
Аскорбинова киселина	$1 \cdot 10^{-4}$ $0,6 \cdot 10^{-4}$	97,2 99,7	97,4 99,9	5,88
Лимонена киселина	$3 \cdot 10^{-2}$ $0,3 \cdot 10^{-2}$	88,0 98,8	88,5 99,1	0,018
Fe(NO ₃) ₂	$10 \cdot 10^{-4}$ $1 \cdot 10^{-4}$ $0,5 \cdot 10^{-4}$	103,8 101,6 101,2	104,2 101,5 101,0	0,62
Cu(NO ₃) ₂	$1 \cdot 10^{-4}$ $0,1 \cdot 10^{-4}$	99,0 99,2	99,5 99,7	5,94
Пикочна киселина	$1 \cdot 10^{-3}$	99,3	99,0	0,0005
Цистеин	$2 \cdot 10^{-2}$ $0,4 \cdot 10^{-2}$	89,4 99,0	89,1 98,8	0,03
Пируват	$1 \cdot 10^{-3}$	99,1	99,4	0,59

Изменението на аналитичния добив при всички изследвани пречещи компоненти е в границите от -10 % до +4%. Забележимо пречене се наблюдава при около 100-кратен излишък на цистеин и лимонена киселина. При анализ на реални проби обаче, не се очаква влияние върху точността на анализа, тъй като концентрацията на изследваните пречещи вещества неколккратно превишава тяхното естествено съдържание в серума и други биологични обекти.

При директно определяне на H₂O₂ разработеният спектрофотометричен метод показва аналитични характеристики съпоставими с цитираните в литературата (Таблица 7): широк концентрационен интервал, малък обем на пробата, добра прецизност на сигнала. Разработеният метод се отличава с по-висока скорост на анализа, което вероятно се дължи на по-високата скорост на потока-носител (2 mL/min).

Таблица 7

Аналитични характеристики на поточно-инжекционни методи за определяне на H_2O_2 със спектрофотометрична детекция

метод	линеен обхват (μM)	$V_{\text{проба}}$, μL	определ яем миниму м (μM)	прецизност $S_r(\%)$	скорост на анализа (проби/час)	литература
окисление на йодид	45–610	100	28	1,9 (n=15)	26	[1]
образуване на Ti(IV)OSO_4 - H_2O_2 комплекс	100–4500	100	80	1,0	40	[1]
образуване на Ti(IV)OSO_4 - ксиленолоранж	50–500	100	30	1,5	22	[1]
окисление на TMB	9–130	100	3,0	1,0	23	[1]
окисление на PSA/4-AAP	30–615	100	22	1,0	26	[1]
образуване на Ti(IV)OSO_4 - H_2O_2 комплекс	4–60		1	-	-	[2]
окисление на $\text{Fe}^{2+} + \text{SCN}^-$	20-80	410	-	2,0 (n=10)	-	[3]
образуване на Ti(IV)OSO_4 - H_2O_2 комплекс	100-3000	100	82	2,0 (n=12)	120	този метод

TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

PSA – фенол-4-сулфонова киселина

4-AAP - 4-аминоантипирин

4. Приложение на метода

В Таблицы 8 и 9 са представени резултатите, получени при анализ на глюкоза и лактат в различни биологични обекти – контролен серум, човешки серум и ферментационни течности чрез разработения ензимен спектрофотометричен поточно-инжекционен метод. Получените резултати са сравнени с резултатите от поточно-инжекционния метод с амперометрична детекция.

Резултатите показват, че предложеният метод се характеризира с добра точност и прецизност. Относителното стандартно отклонение е по-малко от 2,5 %. Резултатите за концентрациите на лактат в серум и ферментационни течности, получени по двата метода, са сравнени чрез t-тест при статистическа вероятност 95%. F-тестът показва, че стандартните отклонения на двете серии резултати са статистически неотличими с вероятност 95%. t-тестът показва, че средните стойности за концентрациите на лактат в

проби от серум и ферментационни течности, получени по двата метода, са статистически неотличими с вероятност 95%.

Таблица 8

Резултати от определяне на глюкоза в различни биологични обекти, получени чрез поточно-инжекционни ензимни методи със спектрофотометрична и амперометрична детекция (n=6, P=95%)

	спектрофотометричен метод		амперометричен метод	
проба	$C_{\text{глюкоза}},$ $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$	$S_r, \%$	$C_{\text{глюкоза}},$ $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$	$S_r, \%$
контролен серум (Serotrol H)	$2,46 \pm 0,06$	2,43	$2,39 \pm 0,05$	2,09
човешки серум	$2,44 \pm 0,05$	2,05	$2,46 \pm 0,04$	1,81
	$C_{\text{глюкоза}},$ mol/L		$C_{\text{глюкоза}},$ mol/L	
ферментационни течности (Streptococcus Lactis)	$46,2 \pm 0,9$	2,04	$46,0 \pm 0,8$	1,81

Таблица 9

Резултати от определяне на лактат в различни биологични обекти, получени чрез поточно-инжекционни ензимни методи със спектрофотометрична и амперометрична детекция (n=6, P=95%)

	спектрофотометричен метод		амперометричен метод	
проба	$C_{\text{лактат}},$ $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$	$S_r, \%$	$C_{\text{лактат}},$ $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$	$S_r, \%$
контролен серум (Serotrol H)	$2,75 \pm 0,07$	2,42	$2,79 \pm 0,06$	1,99
човешки серум	$3,52 \pm 0,09$	2,52	$3,49 \pm 0,07$	1,91
	$C_{\text{лактат}},$ mol/L		$C_{\text{лактат}},$ mol/L	
ферментационни течности (Streptococcus Lactis)	$109,6 \pm 2,6$	2,33	$109,9 \pm 2,6$	2,42

ИЗВОДИ

1. Конструирана е поточно-инжекционна система с ензимен модул с биореактор и ензимна мембрана на амперометричния детектор, в които последователно се окисляват около 60 % от лактата в биореактора и 40 % в ензимната мембрана на електрода. По този начин се намалява продуктното инхибиране на ензима и се увеличава стабилността на ензимния модул – 98 % запазена активност за 100 работни часа.
2. Разработен е поточно-инжекционен метод с амперометрична детекция за определяне на лактат в биологични течности без предварително разделяне с подобрена селективност и ефективност на ензимния електрод.
3. Разработеният поточно-инжекционен метод с амперометрична детекция за определяне на лактат се характеризира добра точност ($\delta C < 3,2 \%$), прецизност ($S_r < 3,5 \%$) и висока скорост на анализа (35 проби/час).
3. Поточно-инжекционният метод е приложен за определяне на лактат в биологични течности. Получените резултати в реални проби съвпадат с резултатите от стандартния спектрофотометричен метод.
4. Конструирана е триканална поточно-инжекционна система с биореактор за ензимно окисление на лактат или глюкоза и с модул за химична реакция с фотометричен реактив за спектрофотометрична детекция на генерирания след ензимната реакция H_2O_2 . Получените резултати показват, че определянето на водороден пероксид под формата на комплекс с $Ti(IV)$ може успешно да се адаптира за поточно - инжекционен анализ със спектрофотометрична детекция.
5. Разработен е ензимен спектрофотометричен поточно-инжекционен метод за определяне на лактат и глюкоза, който се характеризира с добра точност и прецизност (2-3 %), висока скорост на анализа 90-120 проби на час и добра селективност (аналитичен добив в присъствие на пречещи компоненти 90-104%).
6. Разработеният метод и конструираната поточно-инжекционна система могат да бъдат лесно адаптирани за определяне и на други субстрати след ензимно генериране на водороден пероксид чрез имобилизиране на подходящ ензим в предложения биореактор.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Създадена е оригинална поточно-инжекционна система за определяне на лактат в биологични обекти с комбинация от ензимен биореактор и ензимна мембрана на амперометричния сензор, в които е имобилизиран ензимът лактатоксидаза. Чрез оптимизиране на състава на потока-носител и включване на някои нискомолекулни електроактивни матрични компоненти в стандартните калибрационни разтвори е постигнато повишаване на точността на анализа.
2. Разработен е оригинален поточно-инжекционен метод със спектрофотометрична детекция за определяне на лактат и глюкоза след ензимното им окисление в колонни биореактори и спектрофотометрична детекция на образувания водороден пероксид.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. J. Ribeiro, M. Segundo, S. Reis, J. Lima, Spectrophotometric FIA methods for determination of hydrogen peroxide: Application to evaluation of scavenging capacity, *Talanta* 79 (2009) 1169–1176
2. A.M. Almuaibed, A. Townshend, Flow spectrophotometric method for determination of hydrogen peroxide using a cation exchanger for preconcentration, *Anal. Chim. Acta* 295 (1994) 159-163
3. I.Z. AL-Zamil, M.A. Abdalla, T.S. AL-Khulaiwi, Flow injection analysis of some oxidants using spectrophotometric detection, *Arabian Journal of Chemistry* 8 (2015) 599–608

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

ПУБЛИКАЦИИ

1. T. Kolusheva, A. Marinova, "A flow-injection system for analysis of lactate in biological fluids by means of immobilized lactate oxidase", Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, XXXV (2000) 17-26
2. T. Kolucheva, A. Marinova, N. Kolushev, "Spectrophotometric flow-injection analysis of hydrogen peroxide with titanium (IV) and its application to the determination of glucose and lactate using immobilized glucose oxidase and lactate oxidase", Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, XXXVIII (2003) 947-954
3. A. Surleva, A. Marinova, Vl. Ivanova, R. Gradinaru, St. Georgieva, Enzyme based methods for lactate determination, Journal of Chemical Technology and Metallurgy (2016) под печат

ЦИТАТ

Статия 1 е цитирана в:

1. S. Kumar, A. Kumar. Recent Advances in Lactate Estimation and Lactate Sensors for Diagnosis of Diseases, Sensors & Transducers Journal, 96 (9) (2008) 18.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Т. Колушева, А. Маринова, „Поточно-инжекционна система за анализ на лактат в биологични течности чрез използване на имобилизирана лактатоксидаза“, Научна сесия посветена на 75 год. от основаването на катедрата по Аналитична химия в СУ „Св. Кл. Охридски“, 27 май 1999, София.
2. Т. Колушева, А. Маринова, Н. Колушев, „Спектрофотометричен поточно-инжекционен анализ на водороден пероксид с титан (IV) и неговото приложение за определяне на глюкоза и лактат чрез използване на имобилизирана глюкозооксидаза и лактатоксидаза“, Юбилейна научна конференция с международно участие 50 год. ХТМУ, София, 4-5 юни 2003.
3. T. Kolusheva, A. Marinova, „Influence of inorganic supports and multifunctional reagents on the analytical characteristics of immobilized enzymes“, Anniversary scientific conference with international participation, 60 years UCTM, June 4-5, 2013.