

ІННОВАЦІЙНИЙ ПРОЕКТ

ЛАБОРАТОРНА СИСТЕМА КОНТРОЛЮ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ



КЕРІВНИКИ ПРОЕКТУ

Д-р хім. наук, професор хімічного факультету ДНУ ім. О.Гончара
Циганок Людмила Павлівна, вул. Наукова, 13, тел. 68-61-69

Д-р.хім. наук, завідувач кафедри фізичної та неорганічної хімії ДНУ ім. О.Гончара Вишнікін
Андрій Борисович, вул. Наукова, 13, тел. 36-18-64, e-mail vishnikin@hotmail.com

Існуючі проблеми при визначенні ензимів

Недоліки існуючих методик:

- ▶ Реакції проходять у кислому середовищі, що сприяє гідролізу лабільних фосфорвмісних сполук;
- ▶ Реакції відбуваються у присутності великих концентрацій молібдат-іонів, бісмут-іонів, які є каталізаторами гідролізу фосфорвмісних сполук;
- ▶ Невелика швидкість реакцій, іноді для прискорення використовують нагрівання;
- ▶ Недостатня чутливість.

Існуючий стандартний метод визначення ензимів з використанням малахітового зеленого

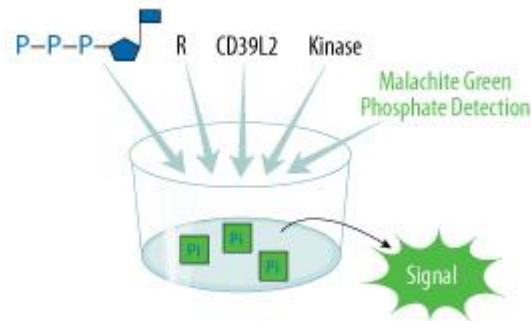
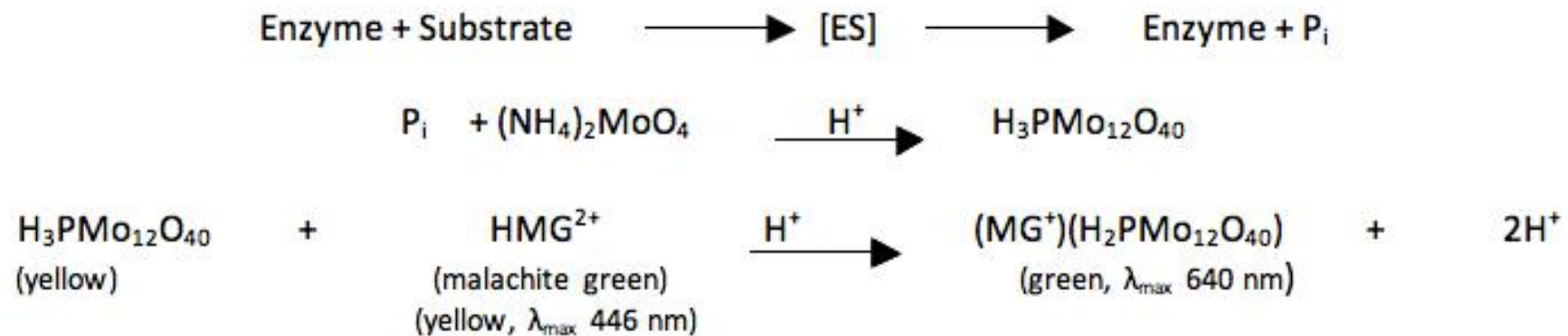
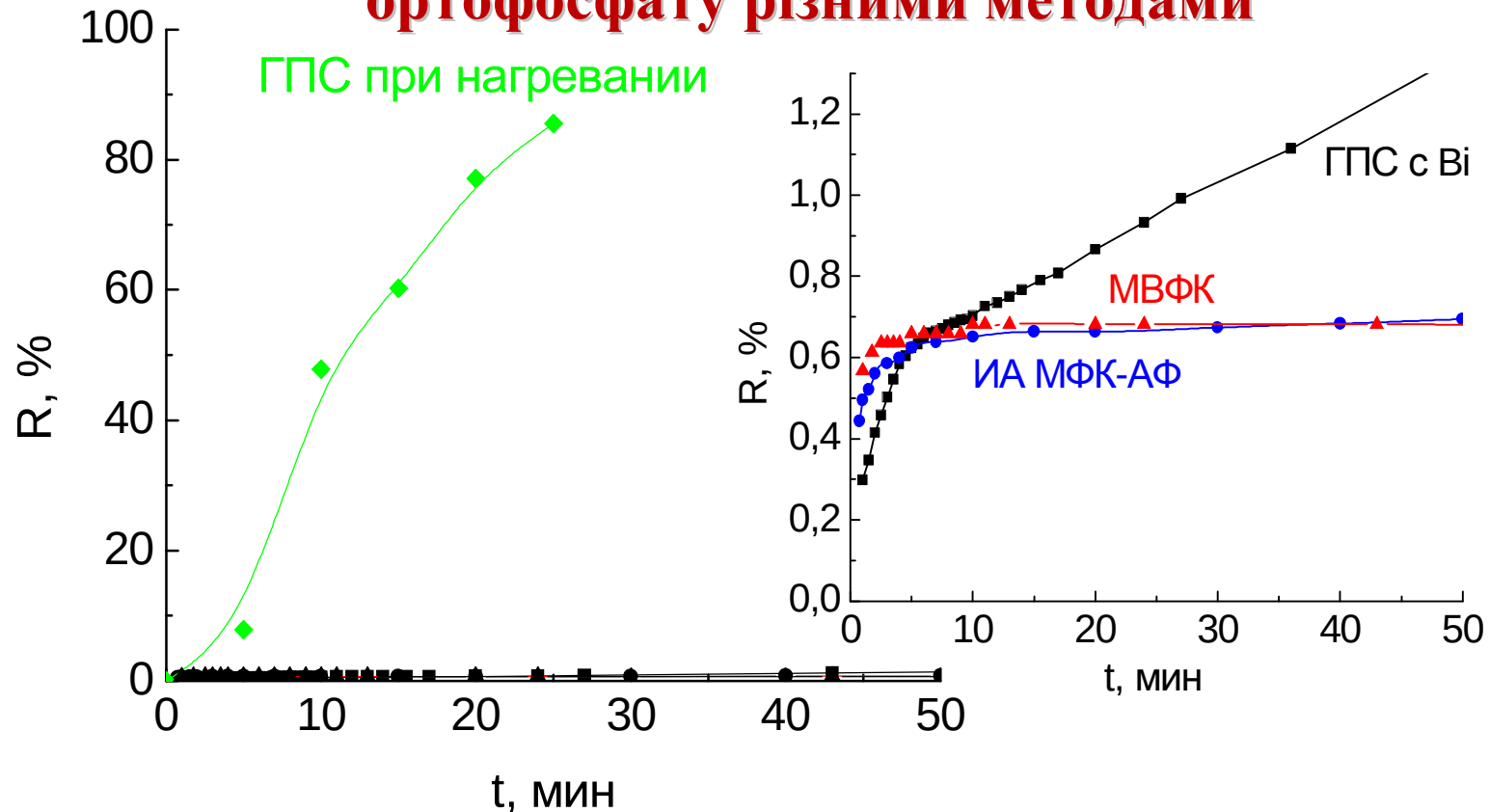


Рис. 1. Гідроліз пірофосфату в умовах визначення ортофосфату різними методами

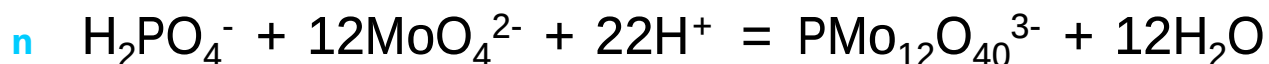


Висновок: при аналізі на вміст ортофосфату зразків, які містять поліфосфати:

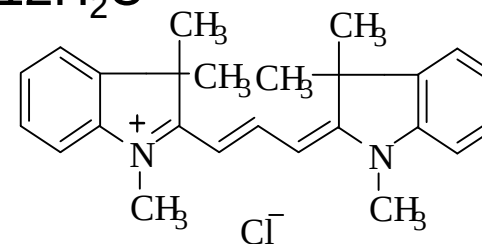
1. методики, які ґрунтуються на утворенні ГПС при нагріванні, приводять до підвищених неправильних результатів;
2. методика, яка ґрунтується на утворенні потрійної ГПС з Ві, може дати трохи підвищений результат;
3. методики, які ґрунтуються на утворенні МВФК і ІА МФК-АФ, дають правильні результати

- Інноваційний проект належить до аналітичної хімії і може бути використаний для визначення активності ензимів, які здатні прискорювати реакції гідролізу фосфорвмісних субстратів. Визначення активності ензимів ґрунтується на спектрофотометричному визначенні фосфату після ензиматичного гідролізу фосфатвмісного субстрату, причому у якості аналітичної форми для визначення фосфату застосовують іонний асоціат 12-молібдофосфорного гетерополіаніону з поліметиновим барвником, чутливість методики покращується до 0,2 U/л час інкубування знижують до 20 хв, а час, необхідний для утворення забарвленої речовини до 1 хв.

- Визначення ортофосфату**



- где R^+ катіон барвника астрафлоксина



Структури поліметинових барвників

6

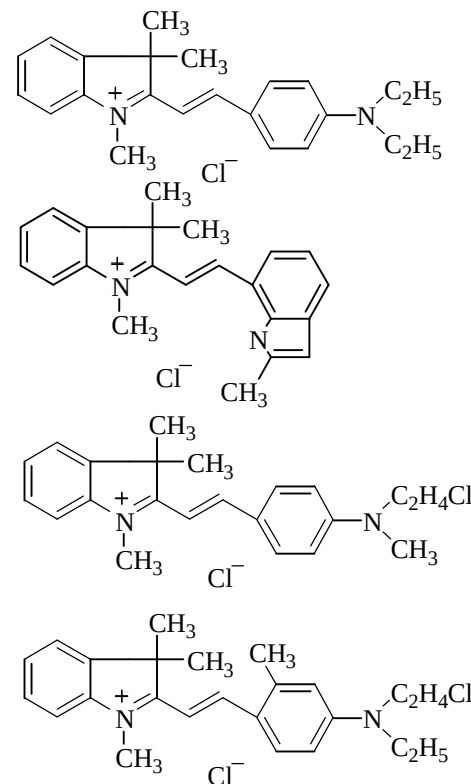
Стирилові

Астразоновий фіолетовий

Астразоновий жовтий

Астразоновий рожевий

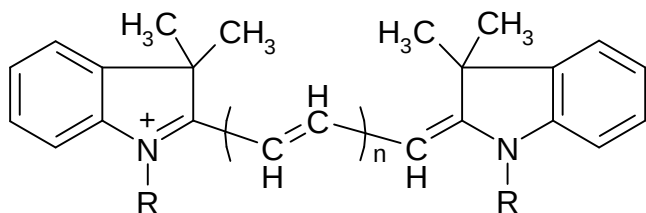
Астразоновий червоний



Карбоціанінові

Астрафлоксин FF

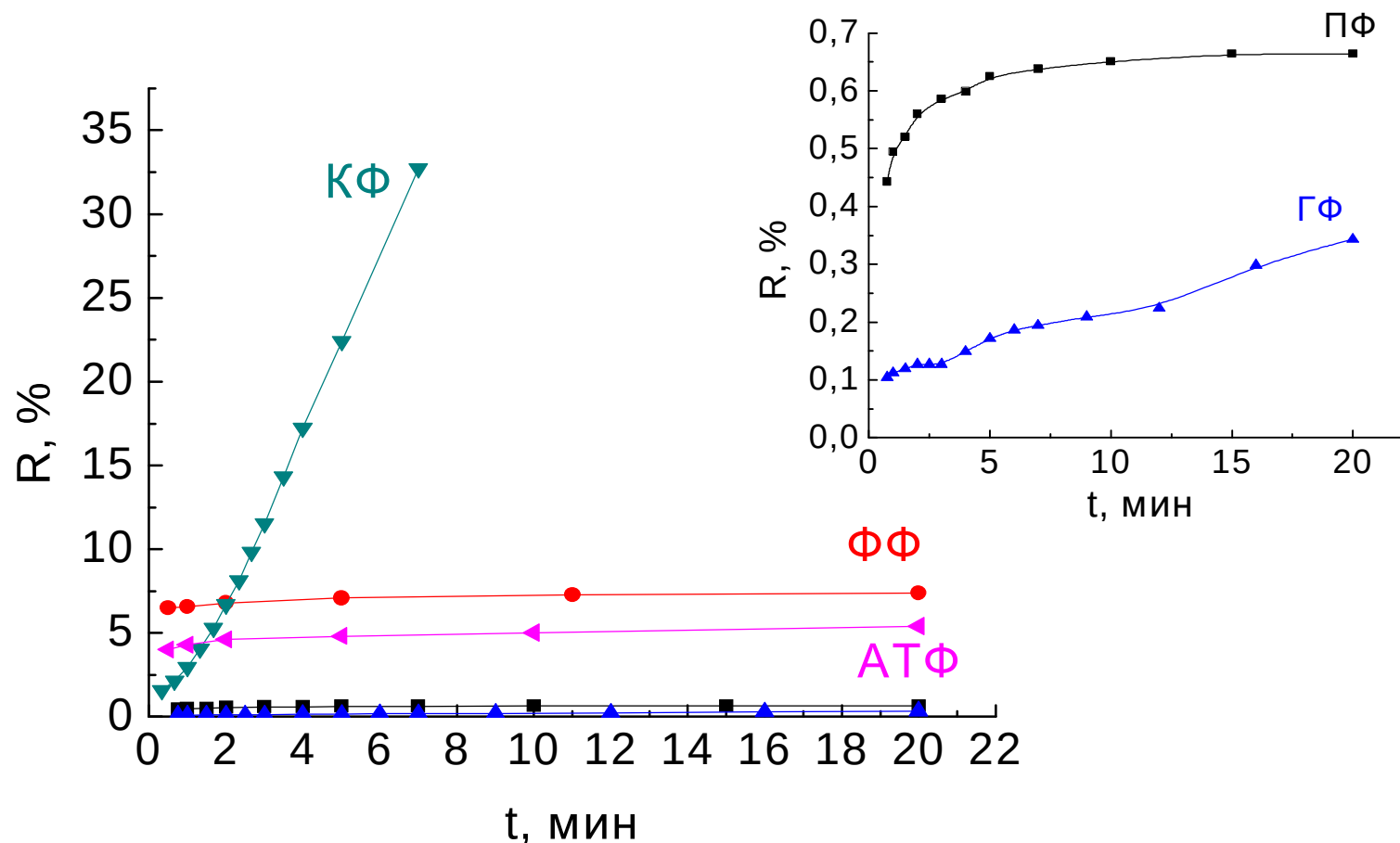
Диіндодикарбоціанін



R = CH₃; n = 1

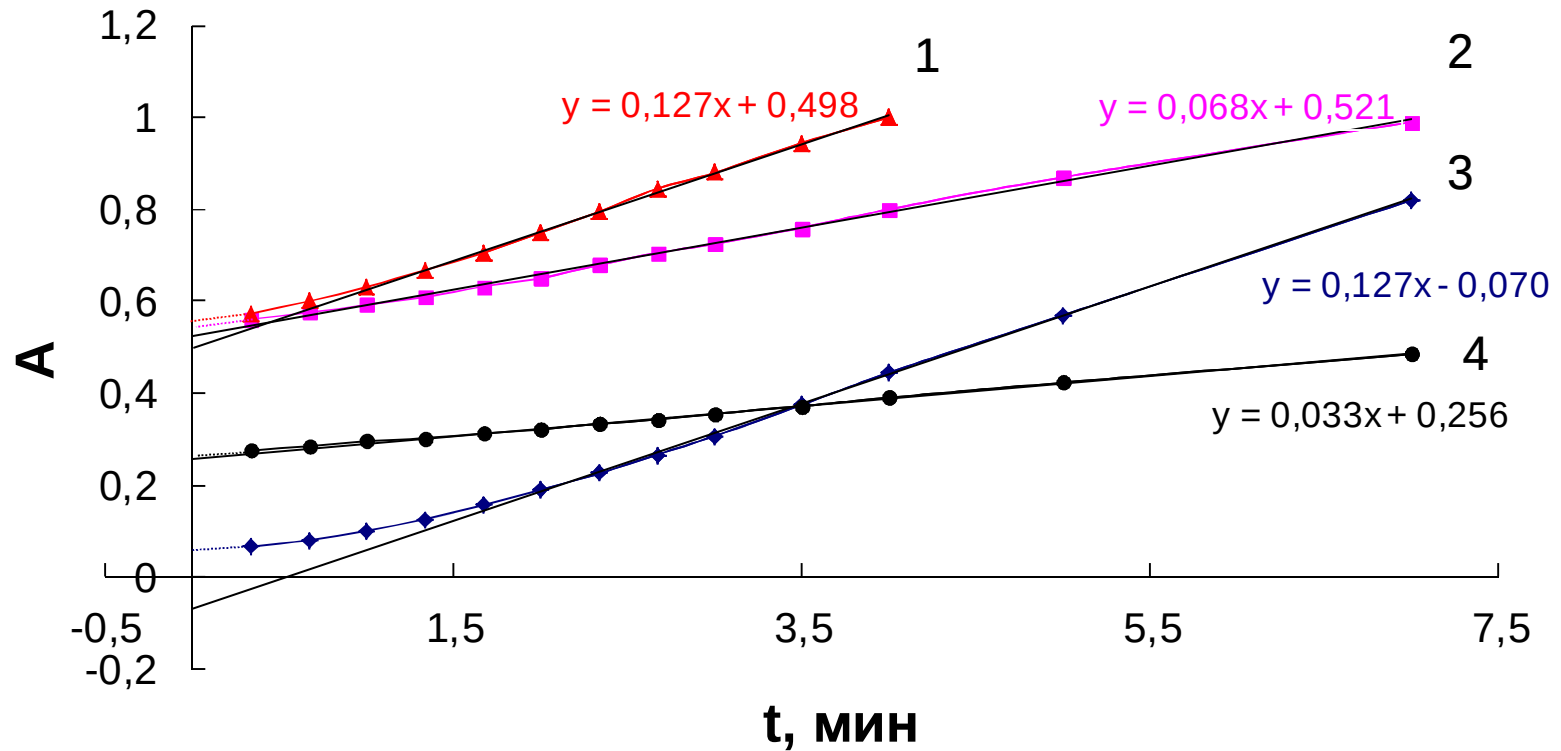
R = CH₃; n = 2

Рис. 2. Гідроліз сполук фосфору в умовах визначення ортофосфату з використанням утворення іонного асоціату (ІА) 12-молібдофосфату (12-МФК) з астрафлосином (АФ)



Висновки: Фенілфосфат (ФФ), аденозінтрифосфат (АТФ), пірофосфат (ПФ) не гідролізують в умовах реакції утворення ІА 12-МФК-АФ. Глюкозофосфат (ГФ) повільно гідролізує, а креатинфосфат (КФ) дуже інтенсивно гідролізує в умовах реакції.

Рис. 3. Гідроліз креатинфосфату в умовах реакції утворення ІА МФК з АФ



- 1) $4,0 \cdot 10^{-6}$ М КФ, $8,0 \cdot 10^{-7}$ М PO_4^{3-} ;
- 2) $2,0 \cdot 10^{-6}$ М КФ, $8,0 \cdot 10^{-7}$ М PO_4^{3-} ;
- 3) $4,0 \cdot 10^{-6}$ М КФ;
- 4) $1,0 \cdot 10^{-6}$ М КФ, $3,2 \cdot 10^{-7}$ М PO_4^{3-}

Висновок: лінійна екстраполяція кінетичних кривих гідролізу КФ приводить до значних погрешностей визначення ортофосфату у присутності КФ

Способи зменшення швидкості гідролізу креатинфосфату⁹

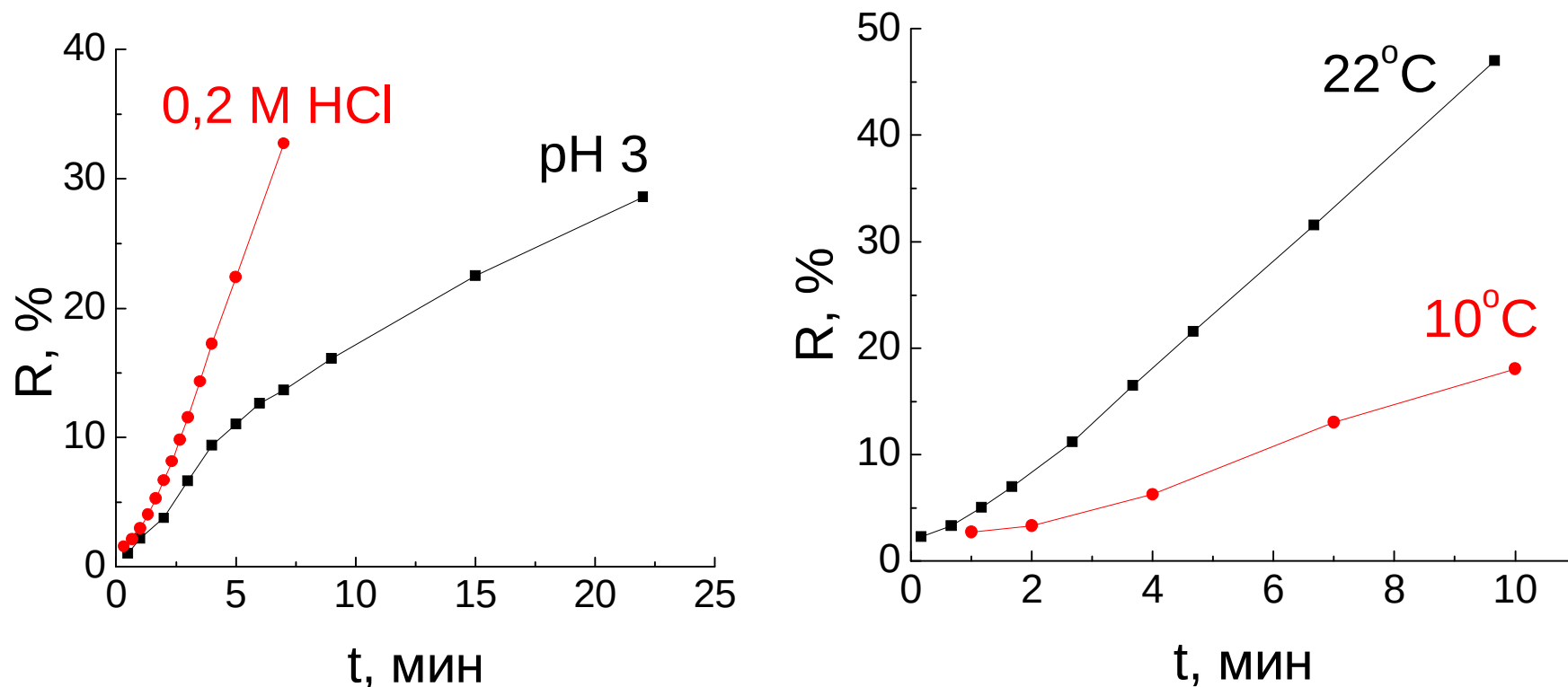
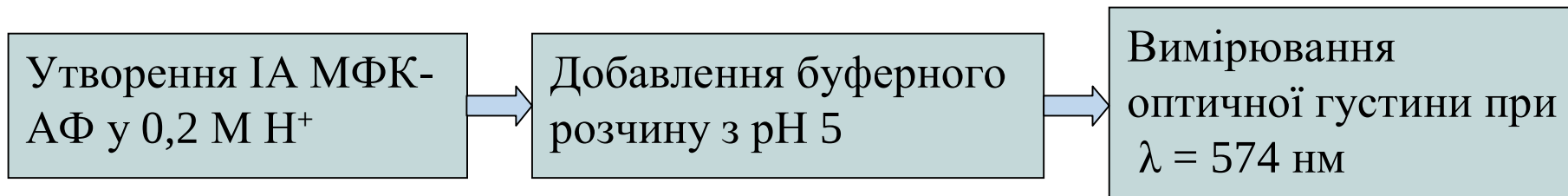
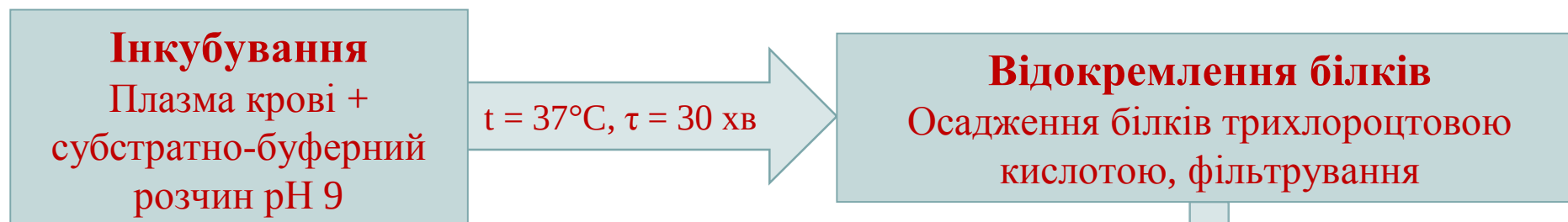


Рис. 4. Залежність ступеню гідролізу креатинфосфату від часу при різних кислотності (а) и температурі (б)



Визначення активності лужної фосфатази

10



Умови	Розроблена методика		За поглинанням комплексу фенолу з 4-аміноантипірином	
	U/l	нкат/л	U/l	нкат/л
У плазмі крові за ФФ	0,70	12,0	4,5	75
У плазмі крові за ПФ	0,35	5,8	-	-
Без розведення за ФФ	0,13	2,2	4,5	75
Без розведення за ПФ	0,07	1,2	-	-

Визначення ортофосфату

$$\text{H}_2\text{PO}_4^- + 12\text{MoO}_4^{2-} + 22\text{H}^+ = \text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-} + 12\text{H}_2\text{O}$$

$$\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-} + 3\text{R}^+ = \text{R}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$$

где R⁺ катіон астрафлосину

Зразок	Активність лужної фосфатази					
	Методика за фенолом			Розроблена методика		
	U/l	мккат/л	S _r	U/l	мккат/л	S _r
1	65,2±4,3	1,087±0,717	0,04	65,7±4,0	1,095±0,067	0,04
2	25,7±2,0	0,428±0,034	0,05	24,8±1,7	0,413±0,028	0,04
3	21,8±1,4	0,363±0,023	0,04	21,4±1,5	0,357±0,025	0,04
4	7,1±0,7	0,118±0,012	0,06	6,4±0,6	0,105±0,009	0,06

Переваги застосування запропонованого способу у присутності сполук фосфору

Методика		
Аналітична форма	Аналітичний ефект	Переваги та особливості
АФ-12-МФК	Утворення при рН 3, спектрофотометрія	В умовах реакції не гідролізує більшість сполук фосфору. Визначенню не заважає кремній у 1000 кратному надлишку.
ДІДК-МВФК	Окиснення надлишку барвнику, спектрофотометрія	Легкогідролізуючі сполуки фосфору не заважають визначенню, оскільки в реакцію вступає лише фосфат, який присутній в реакційному середовищі на початку реакції.
АФ-12-МФК	Утворення ІА при 10 °С, спектрофотометрія	При зниженні температури гідроліз легкогідролізуючих сполук сповільнюються, отже вони не заважають визначенню.
АФ-12-МФК	Створення рН 5 одразу після утворення ІА, спектрофотометрія	При рН 5 гідроліз легкогідролізуючих сполук фосфору відбувається дуже повільно, а фосфат, який при цьому утворюється не здатен вступати в реакцію утворення ІА.
АФ-12-МФК	Ферментативний гідроліз пірофосфату або фенілфосфату, спектрофотометрія	Визначення активності лужної фосфатази

Конкурентні переваги

Перевагами запропонованого способу визначення активності ензимів є простота, експресність, зниження заважаючого впливу гідролізу органічних сполук фосфору, зменшення витрат на придбання реактивів, підвищення точності та правильності, визначення ензимів. Застосована реакція для визначення фосфату є швидкою і однією з найбільш чутливих.

Перспективні сфери використання запропонованої лабораторної системи для визначення ензимів

Клінічна медицина, ензимологія,
мікробіологія, фармакологія, біохімія.