

УДК 577.121.08

УНИВЕРСАЛЬНАЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ

© 1995г. К. Бернотас, А. Ионушка, П. Микульскис, В. Лауринавичюс,
А. Гуя

Институт биохимии Литвы

Поступила в редакцию 19.09.94

Приводятся описание и технические характеристики универсальной аналитической биосенсорной системы для определения метаболитов в цельной крови и других биожидкостях. Система может служить прообразом многопараметрических биосенсорных систем.

Современная медицина, микробиологическая и пищевая промышленность, охрана объектов окружающей среды требуют высокоточных и высокопроизводительных методов анализа метаболитов (глюкозы, лактозы, сахарозы, холестерина и др.), находящихся в многокомпонентных растворах. Один из способов определения метаболитов – превращение их в электрохимически легко определяемые вещества путем ферментного катализа, обеспечивающего высокую избирательность и эффективность. На основе этих явлений были созданы биосенсоры, включающие в себя ферментную и соответствующую ей электрохимическую системы для

определения глюкозы, лактозы, алкоголя и многих других метаболитов. Пример такого применения – глюкозный сенсор, состоящий из глюкозооксидазной ферментной мембраны с амперометрическим определением перекиси водорода как продукта каталитической реакции. Эксплуатация выпущенных на их основе первых промышленных образцов анализаторов показала необходимость автоматизации всего цикла измерения, контроля состояния сенсора и обработки результатов измерения.



Рис.1. Функциональная схема анализатора.
Объяснение в в тексте.

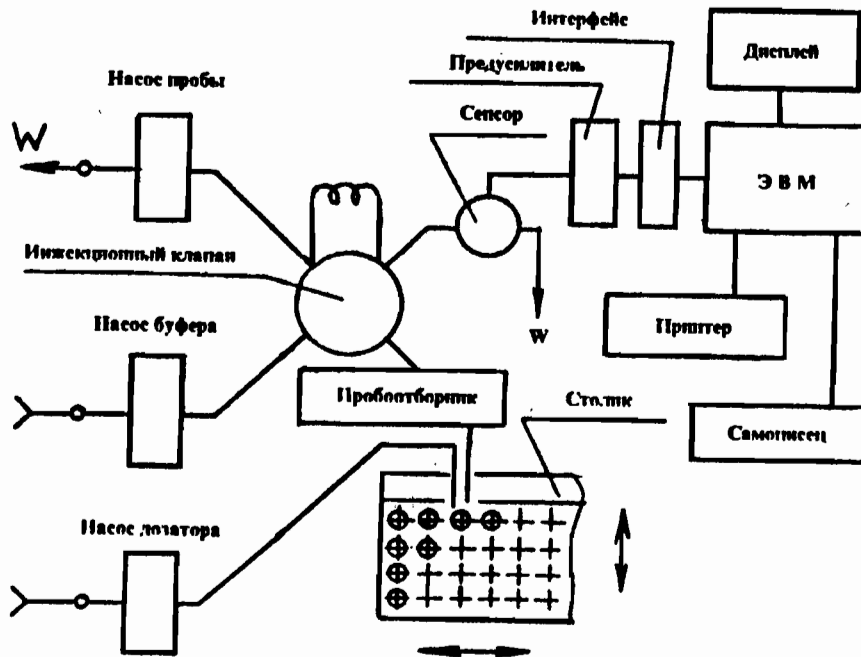


Рис.2. Блок-схема анализатора.
Объяснение в тексте.

Накоплен большой опыт по исследованию различных биосенсоров и систем по определению метаболитов [1], но отсутствуют работы по созданию высокопроизводительных автоматических аналитических систем. Данная работа выполнена в объеме ПИОКР на создание автоматического анализатора глюкозы.

При создании автоматического анализатора выбран проточно-инжекционный анализ (ПИА) жидких образцов в потоке как наиболее эффективный метод автоматизации основных стадий аналитического процесса [2]. В зависимости от требований к объекту анализа предусмотрена возможность работы системы как со встроенным микропроцессором Intel 8085 (для выполнения рутинных работ), так и в соединении с персональным компьютером типа IBM (для накопления больших массивов информации с последующей ее графической и статистической обработкой). Функциональная схема анализатора приведена на рис.1. Микропроцессор или компьютер осуществляет:

- математическую обработку измерительных сигналов для определения концентрации субстрата по сигналу отклика стандартного раствора и управления усилением измерительного тракта;
- вывод данных на индикаторное табло и печатающее устройство;
- диагностику функциональных блоков анализатора.

Блок-схема автоматического проточно-инжекционного анализатора приведена на рис.2. Анализатор состоит из следующих блоков:

- дозирования буферного раствора;
- отбора проб, состоящий из механизма перемещения пробоотборника с иглой, насоса и столика с ячейками в кассетах;
- потокораспределительного устройства, состоящего из потокораспределителя, системы микротрубопроводов, соединяющих блоки ввода пробы, сенсора, резервуара буфера и насоса;
- сенсора с проточной камерой;
- управления, измерения, обработки данных, индикации и печатания результатов.

- управление функциональными блоками в процессе измерения по заданной программе;

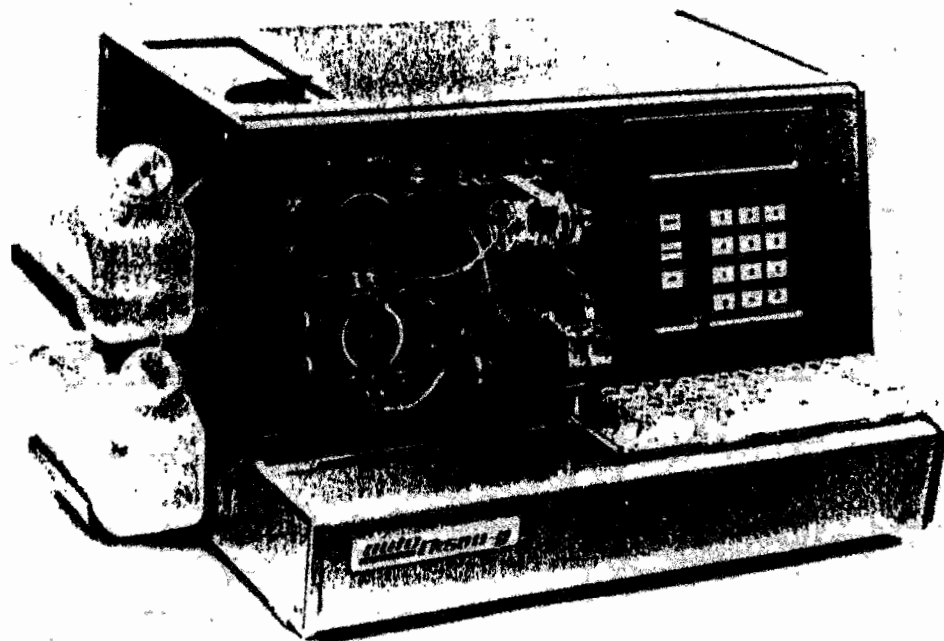


Рис.3. Внешний вид анализатора.

Аналитическая система работает следующим образом (рис.3). По команде, набранной на клавиатуре анализатора, насос дозирования автоматически наполняет ячейки в кассетах заданным объемом буферного раствора. В первую ячейку кассеты дозатором пипеточным вводят калибровочный раствор, в остальные — дозы измеряемой пробы. Кассеты устанавливаются на держатель и включают режим автоматического анализа. После погружения иглы пробоотборника в ячейку с пробой определенная доля объема пробы забирается и транспортируется в мерную петлю потокораспределителя. После заполнения мерной петли пробой доза пробы, отсеченная потокораспределителем, прокачивается через камеру сенсора (рис.4). Камера сенсора сообщается с ферментной мембраной, надетой на амперометрический электрод. При протекании пробы через сенсор глюкоза в мембране преобразуется в перекись водорода. На рабочем электроде (рис.5) при напряжении $+0.6$ В по отношению к хлорсеребряному электроду сравнения перекись водорода электрохимически окисляется, создавая ток (кривая А на рис.6). По напряжению на выходе усилителя тока контролируется рабочее состояние сенсора. Для компенсации разброса чувствительности мембран предусмотрен программ-

но управляемый усилитель.

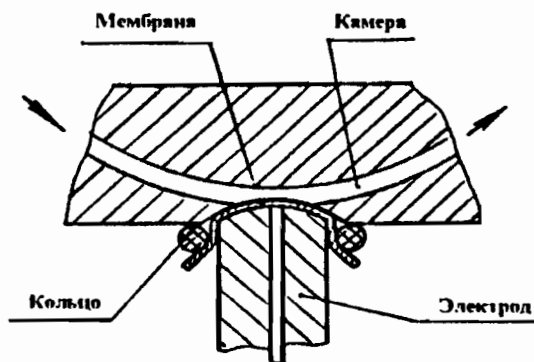


Рис.4. Конструкция сенсора.

С целью получения максимальной производительности анализов и точности измерения производится по максимальному значению скорости нарастания сигнала dl/dt (рис.5, кривая Б на рис.6).

Для дальнейшей обработки сигналов применен 12-разрядный аналого-цифровой преобразователь (АЦП). Анализатор в варианте с компьютером типа IBM оснащен гибкой программой на языке Паскаль, охватывающей управление и контроль всеми узлами прибора, анализ и предоставление данных в цифровой и графической форме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оптимизации режимов измерения исследованы зависимости метрологических характеристик прибора от проницаемости мембраны, активности ферментов, концентрации субстрата, конструкции сенсора, скоро-

сти течения пробы и буфера, температуры и др. [3]. Кроме того, разработаны ферментные мембраны, чувствительные к различным метаболитам. В случае измерения глюкозы получена линейная зависимость и воспроизводимость в диапазоне концентраций от 1 до 40 мМ.

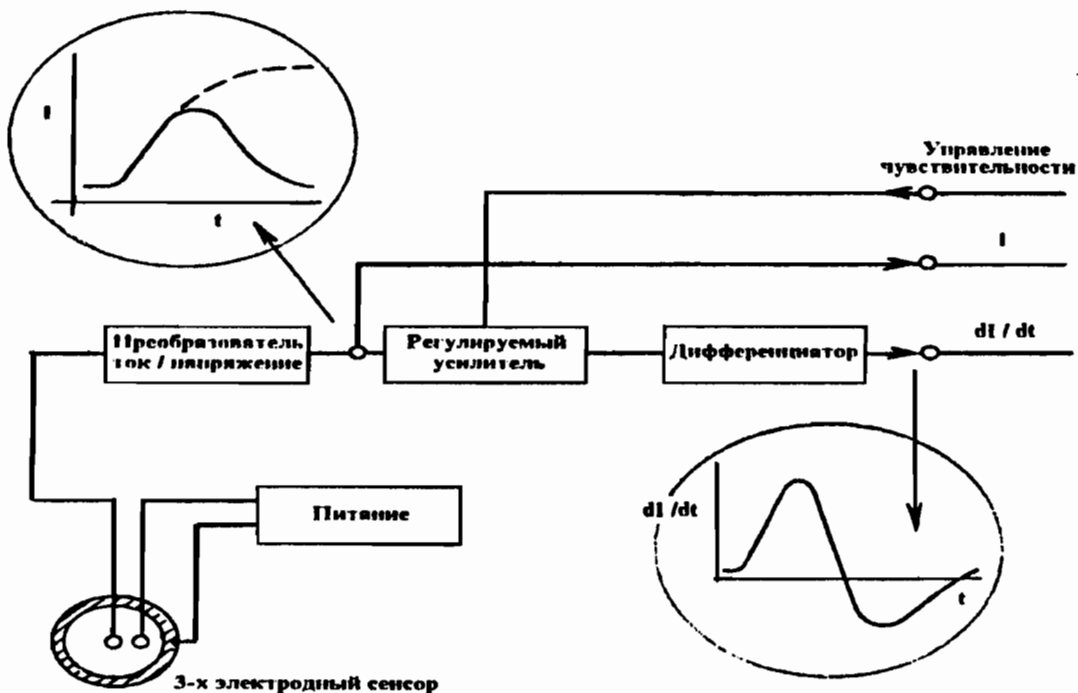


Рис.5. Блок-схема предварительной обработки сигнала сенсора.

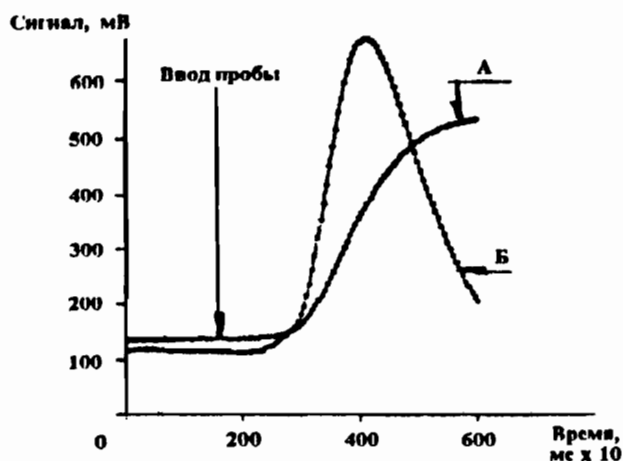


Рис.6. Сигнал отклика сенсора. (кривая А - сигнал на выходе усилителя тока, кривая Б - сигнал на выходе дифференциатора).

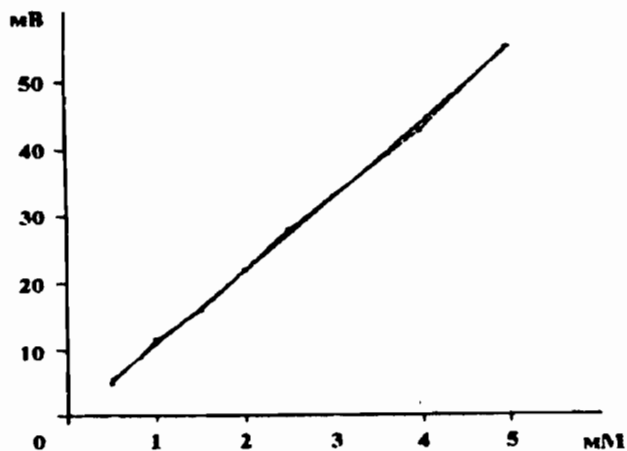


Рис.7. Зависимость сигналов отклика от концентраций глюкозы.

$$y = (10.93 + 0.03)x + (0.085 + 0.012), r = 0.9987, n = 10, \text{ s.v.} = 1.3\%$$

Нижний предел ограничен отношением сигнал/шум, верхний – линейностью сенсора. После оптимизации времени контактирования пробы с сенсором и условий промывки время одного измерения было сокращено до 25–35 сек.

Результаты измерений концентрации глюкозы и соответствующих сигналов отклика приведены на рис.7. Раствор глюкозы каждой концентрации измерялся по 10 раз и на базе данных построена калибровочная кривая, которая показывает линейность полученных результатов измеренных концентраций в пределах от 1 до 40 мМ.

Объем пробы может быть выбран в зависимости от требуемого диапазона измерений и состава среды. Например, для измерения глюкозы в цельной крови он составляет 20 мкл.

Получены результаты измерения лактата в диапазоне концентраций от 2 до 20 мМ с воспроизводимостью не хуже 4%.

Технические характеристики анализатора по глюкозе

Диапазон концентраций	1–40 мМ
Производительность	100–120 анал./ч
Воспроизводимость в серии	3%
Объем пробы	20 мкл
Ресурс мембраны	более 2000 ч.

ВЫВОДЫ

Разработана универсальная аналитическая система для определения метаболитов (глюкозы, лактата, алкоголя и др.) в цельной крови и других биологических жидкостях. Особенность системы — гибкость при переходе к измерению других метаболитов, возможность исследования сигналов с графической и статистической обработкой данных.

Аналитическая система может служить моделью для разработки многопараметровых биосенсорных систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Applied Biochemistry and Bioengineering*/ Ed. L.B.Wingard, Jr., E.Katchalski-Katzir, L.Goldstein // Acad. Press. 1981. Vol.3. P.1–74.
2. *Шпигун К.* Проточно-инжекционный анализ // ЖАХ. 1990. Т.45, вып.6, С.1045–1091.
3. *Кулис Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс, 1981.