



УДК 543.831:547.466

Применение полимера с молекулярным отпечатком фенилаланина в анализе крови потенциометрическим методом

Захарова Л.М., Никитский А.С.

Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Красникова О.П., Зяблов А.Н., Жиброва Ю.А.,

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

В работе произведена модификация поверхности рН-селективного электрода полимером с молекулярными отпечатками аминокислоты – фенилаланина. Впервые с использованием модифицированного потенциометрического сенсора сделаны попытки определения фенилаланина в крови. Также оценена воспроизводимость результатов измерений на модельных растворах и в реальных системах

Введение

Многие патологии необходимо диагностировать в первые дни жизни. Одним из таких заболеваний является фенилкетонурия, характеризующееся нарушением миелинизации нервных волокон, снижением количества меланоцитов, обусловленное нарушением обмена фенилаланина в виду его дефицита и приводящее к задержке психического развития. Из всех наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена аминокислот, фенилкетонурия встречается наиболее часто (1/11000).

Чрезвычайно важно установить диагноз в доклинической стадии или, по крайней мере, не позднее 2-го месяца жизни, когда могут проявиться первые признаки болезни. Для этого всех новорожденных обследуют по специальным программам скрининга, выявляющего повышение концентрации фенилаланина в крови уже в первые недели жизни. Каждого ребенка, у которого обнаруживаются признаки задержки развития или минимальная неврологическая симптоматика, необходимо обследовать на патологию обмена фенилаланина. Используют микробиологический и флюорометрический методы определения концентрации фенилаланина в крови, а также пробу Феллинга на фенилпировиноградную кислоту в моче. Эти и другие подобные методы относятся к категории ориентировочных, поэтому при положительных результатах требуется специальное обследование с использованием точных количественных методов определения содержания фенилаланина в крови и моче (хроматография аминокислот, использование

аминоанализаторов и др.), которое осуществляется централизованными биохимическими лабораториями. Данные методы исследования занимают достаточно много времени, что напрямую влияет на течение заболевания. Для решения данной проблемы необходимы методы и устройства, обеспечивающие химико-аналитический контроль, которые бы отличались быстродействием, надежностью, простотой эксплуатации. Этими качествами обладают химические и биологические сенсоры.

Сенсоры – миниатюрные, высокочувствительные, быстродействующие приборы, предназначенные для прямого селективного полностью автоматизированного определения химических веществ и биообъектов в различных средах [1].

Накоплен обширный экспериментальный материал по созданию селективных и неселективных сенсорных систем. Остается нерешенной проблема создания покрытий электродов, позволяющих выделять из многокомпонентной смеси вещества с близкими свойствами, либо оценивать соотношение концентраций основных компонентов. Сделать электрод селективным могут различные полимеры, нанесенные на его поверхность [2].

Целью работы было модифицирование рН-селективного электрода полимером с молекулярным отпечатком фенилаланина.

Эксперимент

Метод молекулярного импринтинга заключается в получении органических или неорганических полимеров, способных распознавать молекулы, которые использовались в качестве молекулярных шаблонов (темплатных молекул) при их синтезе. Распознавание становится возможным благодаря присутствию в структуре таких полимеров участков (так называемых отпечатков), способных к специфическим (комплементарным) взаимодействиям с молекулами – шаблонами или близкими к ним по структуре соединениями. В понятие комплементарности входит соответствие отпечатка шаблону как по форме и размеру, так и по наличию в отпечатке дополняющих функциональных групп, способных к взаимодействию с функциональными группами шаблона [3].

В работе была синтезирована пленка на основе нитрата целлюлозы – коллоксилина. Коллоксилин – продукт частичной этерификации целлюлозы азотной кислотой с содержанием азота до 12%, получали при нагревании (333 – 343 К) в течение 5 – 6 минут смеси целлюлозы, концентрированной серной и азотной кислоты. Затем просушивали на кипящей водяной бане, полученный коллоксилин растворяли в смеси этанола и диэтилового эфира (1:3) [4]. В качестве молекулы-шаблона использовали фенилаланин. Образовавшийся вязкий раствор наносили на рН-селективный электрод ЭСЛ – 43 - 07.

Эксперименты проводили на иономере ЭВ-74 и рН – метре «Аквилон-410». Для этого готовили серию стандартных растворов с концентрацией 10^{-2} – 10^{-5} М. Водные растворы фенилаланина анализировали на кафедре аналитической химии Воронежского государственного университета, а эксперименты с кровью проводили на фармацевтическом факультете Воронежской медакадемии им. Н.Н. Бурденко. Цельную кровь, консервированную с помощью раствора «Глюгицир» получали в областной станции переливания крови. Паспорт крови № 015927.

Обсуждение результатов

Ионометрия обладает некоторыми принципиальными преимуществами перед другими методами: позволяет определять активную концентрацию иона или молекулы на фоне его общей концентрации; измерения можно проводить в непрозрачных, мутных и окрашенных средах и вязких пастах; время установления равновесного потенциала составляет секунды и т.д.

В работе была поставлена цель отработки методики потенциометрического определения фенилаланина в водных растворах и крови, для последующего ее

использования в медицинских учреждениях, поскольку существующие методики достаточно сложны и громоздки.

По полученным для серии стандартных растворов данным строили калибровочные графики в логарифмических координатах $pPhe - pC$. Электродная функция линейна в рабочем диапазоне концентраций фенилаланина $10^{-6}-10^{-3}$ моль/л для водных растворов и в диапазоне $10^{-2}-10^{-5}$ М для крови. Коэффициент корреляции составил ($R^2 > 93\%$). Равновесие в растворе устанавливается за 30 – 60 секунд.

На основании анализа стандартных растворов, полученных в разные дни можно, сделать вывод о том, что в первые 4 дня после нанесения полимерной пленки на электрод воспроизводимость результатов практически полная, о чем свидетельствуют результаты, представленные в работе [5].

Таким образом, в работе впервые с использованием модифицированного потенциометрического сенсора сделаны попытки определения фенилаланина в крови. Также показан период пригодности данной системы во времени. Следует отметить, что в процессе эксплуатации электрода пленка гидратируется, дегидратируется, протравливается, загрязняется компонентами раствора. В результате у полученной первоначально, пленки с молекулярными отпечатками фенилаланина происходит изменение структуры поверхности, что влечет за собой снижение точности определения аналита.

Для установления более точных закономерностей в поведении полимерных пленок, селективных к фенилаланину, в биологических жидкостях необходимы дальнейшие исследования. Тем не менее, полученные результаты являются актуальными и могут быть использованы при определении фенилаланина в биологических жидкостях.

Список литературы

1. Химические сенсоры / А. А. Вечер, П. П. Жук. - М.: Наука, 1990. – 47 с.
2. Шведене Н. В. Селективные электроды на органические ионы / Н. В. Шведене // СОЖ. – 2004. Т. 1, № 2. – С. 11-13.
3. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Материалы с молекулярными отпечатками: синтез, свойства, применение //Успехи химии, 2006, Т.75, № 10, С. 998 – 1017.
4. Шестаков А.С. Высокомолекулярные соединения. – Воронеж.: Изд-во ВорГУ, 2004. – 48 с.
5. Зяблов А.Н. Анализ морфологии поверхности молекулярно-импринтированных полимеров // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, Вып.1. – С.172 – 175.

Application of polymer with a molecular imprint of phenylalanine in analysis of blood by potentiometric method

*Zakcharova L.M., **Krasnikova O.P., **Zyablov A.N., **ZhibrovaYa.A., *Nikitinsky A.S.

* *N.N.Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh*

***Voronezh State University, Voronezh*

In this work the modification of a surface of a pH-selective electrode is made by polymer with molecular imprints of aminoacid - phenylalanine. For the first time attempts are made for definition phenylalanine in blood using a modified potentiometric sensor. Also repeatability of results is estimated in standard test solutions and in real systems.

Ключевые слова: pH-selective electrode, potentiometric sensor, polymer with molecular imprints, phenylalanine.