



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88311

(13) U

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 11685	(72) Винахідник(и):	Зінченко Олена Анатоліївна (UA), Шкотова Людмила Василівна (UA), Марченко Світлана Володимирівна (UA), Заїка Леонід Андрійович (UA), Потопальський Анатолій Іванович (UA), Солдаткін Олексій Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	03.10.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Ак. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	11.03.2014	(74) Представник:	Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.03.2014, Бюл.№ 5		

(54) ФЕРМЕНТНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АЛКАЛОЇДІВ ЧИСТОТІЛУ

(57) Реферат:

Ферментний біосенсор для визначення активності алкалоїдів чистотілу містить пару напівпровідникових перетворювачів на основі іоноселективного польового транзистора з рН-чутливим шаром з вбудованим мікроелектродом порівняння. Виходи обох напівпровідникових перетворювачів призначені для підключення до відповідних входів аналого-цифрового вимірювача параметрів рідких середовищ, а виходи цього приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера. На один з перетворювачів на основі рН-ПТ розташована робоча мембрана, яка містить фермент - ацетилхолінестеразу, чутливий до алкалоїдів чистотілу, а на другому перетворювачі на основі рН-ПТ розташована референтна мембрана, що містить сироватковий альбумін бика.

UA 88311 U

Корисна модель належить до галузі біомедичних досліджень і може бути використана у медицині для стандартизації лікарських препаратів на основі алкалоїдів чистотілу, а більш конкретно до ферментного біосенсору для визначення активності алкалоїдів чистотілу.

Останнім часом у медичній практиці все більшої популярності набувають лікарські засоби рослинного походження, які мають широкий спектр дії. Це пояснюється тим, що у порівнянні з синтетичними препаратами вони мають достатньо широку та м'яку терапевтичну дію, менш токсичні та відзначаються мінімальними побічними ефектами, що відноситься також і до лікарської рослини Чистотілу великого (*Chelidonium majus* L.) сімейства Papaveraceae. Алкалоїди чистотілу, вилучені з рослинної сировини, входять до ряду лікарських форм - екстрактів, мазей, супозиторіїв, ампульних розчинів [1].

Стандартизація лікарських препаратів, які одержані із рослин, дуже складна, так як рослини збираються в різних регіонах, тому і по вмісту алкалоїдів і по їх активності препарати будуть відрізнятися. А визначення активності та визначення терапевтичних доз коштують дуже дорого. Тому вкрай необхідні точні, дешеві та швидкі по своїй роботі прилади для визначення активності, стандартизації лікарських препаратів і особливо на основі алкалоїдів, кількість яких зростає із кожним роком.

Чимало алкалоїдів застосовуються у медичній практиці як наркотичні, спазмолітичних та протипухлинних засобів [2,3]. Крім того, добре відомо лікування холінергічними речовинами нейропсихопатологічних станів. Однак, ефективність алкалоїдів обмежується їх високою токсичністю. Край важливо визначити можливість використання зворотних інгібіторів ацетилхолінестерази (АцХЕ), щоб підтвердити їх клінічну значимість як засобів для лікування. В той же час, взаємодія природних алкалоїдів з різними ферментами має велике значення для біохімії з точки зору вивчення механізму взаємодії, а також, для розробки нових лікарських препаратів та визначення їх терапевтичної дози у медицині.

Єдиної методики кількісного визначення вмісту алкалоїдів у рослинній сировині не існує, так як їх хімічна структура, фізичні властивості різні. До того ж усі методики кількісного визначення алкалоїдів у рослинній сировині (гравіметричний, титрометричний, фізико-хімічні методи) є трудомісткими, довготривалими, недостатньо чутливими і селективними, не гарантують потрібної надійності результатів [4]. Відносна точність їх невелика.

Відомий іоноселективний польовий транзистор /ІСПТ/ [5], конструкція якого передбачає розміщення двох перетворювачів на основі рН-ПТ, р+-дифузійні шини з контактами до стоку і витоку кожного з транзисторів виведені на край чипа, як і вивід до вбудованого мікроелектрода порівняння, в центрі транзистора розташований контакт до п-підкладки, алюмінієві контактні площини до транзисторних виходів, виведені на край чипа.

Відомий аналого-цифровий іоноселективний вимірювач параметрів рідких середовищ [6] «ISFET».

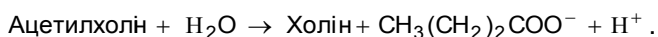
Під час досліджень автори не виявили ферментного біосенсору для визначення активності алкалоїдів чистотілу для визначення активності алкалоїдів та для визначення терапевтичних доз лікарських препаратів.

В основу корисної моделі поставлена задача створення такого ферментного біосенсору для визначення активності алкалоїдів чистотілу, який би дозволив визначати активність алкалоїдів при одержанні лікарських препаратів.

Поставлена задача вирішується запропонованим ферментним біосенсором для визначення активності алкалоїдів чистотілу, що містить пару напівпровідникових перетворювачів на основі іоноселективного польового транзистора з рН-чутливим шаром з вбудованим мікроелектродом порівняння, виходи обох напівпровідникових перетворювачів призначені для підключення до відповідних входів аналого-цифрового вимірювача параметрів рідких середовищ, а виходи цього приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера, а відповідно до пропозиції, на один з перетворювачів на основі рН-ПТ розташована робоча мембрана, яка містить фермент - ацетилхолінестеразу, чутливий до алкалоїдів чистотілу, а на другому перетворювачі на основі рН-ПТ розташована референтна мембрана, що містить сироватковий альбуміну бика.

В основі роботи ферментного біосенсору для визначення активності алкалоїдів чистотілу, лежить ефект інгібування наступної ферментативної реакції:

АцХЕ



В ході протікання ферментативної реакції змінюється концентрація протонів, відповідно, має місце зміна рН, яку і реєструє ISFET. У присутності інгібіторів, наприклад, алкалоїдів чистотілу великого - препарату "Амітозин" [7], фермент інгібується, що спричиняє зменшення величини

відгуку біосенсору пропорційно певним аліквотам алкалоїдів. Активність інгібітора в пробі визначається за зменшенням сигналу біосенсора відносно калібрувального графіка.

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де на Фіг. 1. схематично зображено контурний вигляд топології диференційної пари рН-ПТ;

5 Фіг. 2. показано блок-схему вимірювального пристрою;

Фіг. 3. показано відгуки біосенсора на основі рН-ПТ на додавання субстрату до інгібування препаратом "Амітозин";

Фіг.4. показано відгуки біосенсора на основі рН-ПТ на додавання субстрату після інгібування препаратом "Амітозин".

10 Принцип роботи запропонованого ферментного біосенсора для визначення активності алкалоїдів чистотілу визначається тим, що потенціал затвора польового транзистора, який задає струм через структуру, модулюється зміною рН розчину біля його поверхні. Зміна рН відбувається в наслідок ферментативної реакції в шарі іммобілізованої ацетилхолінестареми.

15 Ферментний біосенсор для визначення активності алкалоїдів чистотілу складається з двох перетворювачів на основі рН-ПТ (Фіг. 1) - це дві зигзагоподібні області затворів - 1,2 /ПТ/. На 1 нанесено робочу мембрану 3 з ферментом ацетилхолінестеразою селективною до ацетилхоліну та на 2 - нанесено референтну мембрану 4 - сироватковий альбумін бика. Зигзагоподібна геометрія затворної області транзистора має відношення довжини каналу до його ширини рівним 100, що забезпечує достатній рівень крутизни перехідної характеристики. 20 р+-дифузійні шини (5 /ДШ/) з контактами до стоку і витоку кожного з транзисторів виведені на край чипа, як і вивід до вбудованого мікроелектроду порівняння - 6 /МП/. В центрі транзистора розташований контакт до п-підкладки - 7 /К/. Алюмінієві контактні площини до транзисторних виходів, виведені на край чипа - 8 14/. Два тестових МОН-транзистори з металевими затворами - 9 /МЗ/. Біосенсор занурений у розбірну вимірювальну кювету з буферним розчином. У 25 вимірювальній кюветі пробоприймач прикріплюється до кришки корпусу кювети через ущільнювальну прокладку і, таким чином, утворює стакан для постачання проби. Вказаний біосенсор 10 /Б/ Фіг. 2 підключений до відповідного входу потенціометричного приладу 11 /«ISFET»/. Виходи приладу 11 підключені до відповідних входів блоку живлення 12 (БЖ) та комп'ютера 13 (К) (типу IBM PC AT, Sempron 2200+ Processor, 40Gb memory).

30 Пропонований біосенсор працює наступним чином: біоселективні мембрани формували на поверхні перетворювачів шляхом іммобілізації чутливого ферменту у насичених парах глутарового альдегіду (ГА). Суміш з якої формується ферментна мембрана 3 на електроді 1 (Фіг. 1) складається з АцХЕ, ковалентно зв'язаного з сироватковим альбуміном бика за допомогою ГА. Спочатку готували розчини 5 % ферменту АцХЕ та 5% БСА для формування 35 чутливої до алкалоїдів мембрани та 10 % БСА - референтна мембрана 4 на електроді 2. Розчини готувались у 20 мМ фосфатному буфері рН 7,4. До сумішей фермент-БСА та БСА додавали гліцерин до кінцевої концентрації 10 % для стабілізації мембран при іммобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхні перетворювачів. 40 Краплю суміші фермент-БСА наносили на частину чутливої поверхні зигзагоподібні області затвору 1, на поверхню зигзагоподібної області затвору 2 - розчин БСА без ферменту (датчик порівняння) - мембрана 4.

Таким чином, ферментну мембрану - 3, що наносилась на одну з робочих поверхонь рН-ПТ, складалась з 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, та з наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

45 5 ацетилхолінестераза,
5 БСА,
10 гліцерин.

На робочу поверхню іншого рН-ПТ наносилась референтна мембрана - 4, яка складалась з наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас %):

50 10 БСА,
10 гліцерин.

Для полімеризації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів ГА на 30 хв. і потім підсушували на повітрі й відмивали від надлишку глутарового альдегіду протягом 10-20 хв. у розчині 5 мМ буфера, рН 7,4, в якому і проводились подальші дослідження. Для 55 проведення вимірів біосенсор з нанесеними мембранами встановлювали у вимірювальну кювету з 5мМ фосфатним буферним розчином, рН 7,4 та розміщували на магнітному перемішувачі. Витримували півгодини для отримання стабільного базового сигналу. Потім у комірку вводили субстрат. Концентрації субстратів змінювали, додаючи певні аліквоти вихідних концентрованих розчинів субстрату - ацетилхолінхлориду. Після отримання кожного відгуку 60 біосенсор відмивали від продукту реакції, змінюючи робочий буфер 3 рази. Таким чином,

шляхом додавання різної кількості концентрованих розчинів субстрату та отримання відповідних відгуків було побудовано калібруючу криву - контрольний дослід, за яким визначали 100 % активність ферменту. Далі відмивали біосенсор до базової лінії шляхом зміни робочого буферного розчину декілька разів. Для визначення активності алкалоїдів в комірку з розташованим біосенсором вносили аліквоти алкалоїдів і витримували декілька хвилин (2-3хв.) (процес пре інкубації). Після цього без відмивки знову вводили субстрат та проводили вимірювання активності ферменту. Після отримання кожного відгуку біосенсор відмивали від продукту реакції та алкалоїдів, змінюючи робочий буфер 3 рази. Кожну наступну концентрацію субстрату вносили з попередньо доданою аліквотою алкалоїдів аналогічно стадії контрольного досліду. Отримували калібрувальну криву зі зменшеною активністю ферментної мембрани пропорційно внесеним аліквотам алкалоїдів. Таким чином отримали калібрувальні криві (Фіг. 3), які показали зниження активності ферментного біосенсору пропорційно внесеним концентраціям інгібітора.

Концентрацію інгібітора в пробі визначали за калібрувальним графіком (Фіг. 4), концентрація субстрату складала 2 мМ (експериментально встановлено що концентрація субстрату 2 мМ є оптимальною для проведення експерименту).

Нижня межа визначення похідних алкалоїдів чистотілу у вигляді препарату «Амітозин» становила 10 мкМ. Показано, що запропонований ферментний біосенсор для визначення активності алкалоїдів чистотілу з іммобілізованим ферментом ацетилхолінестераза чутливий до алкалоїдів чистотілу в значному діапазоні концентрацій. Динамічний діапазон визначення препарату «Амітозину» складав 20-960 мкМ, що входить в діапазон терапевтичних доз препарату «Амітозину» і, відповідно, може бути визначений за допомогою розробленого ферментного біосенсору.

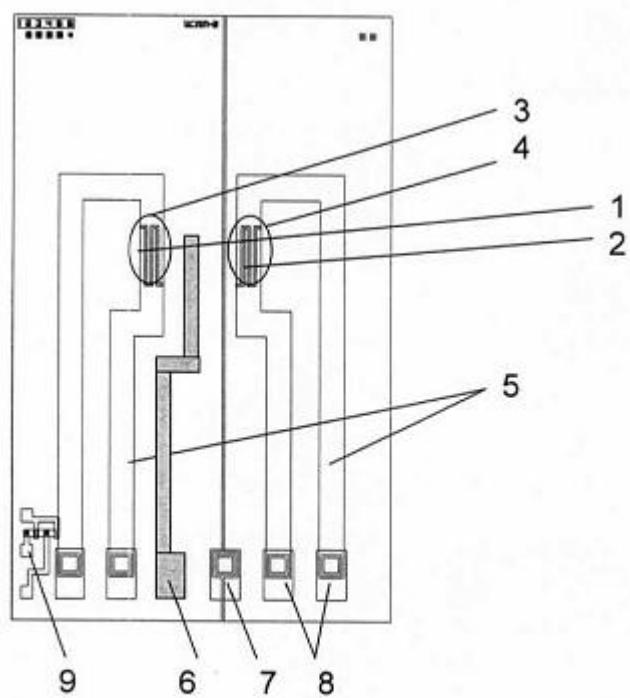
Таким чином, отримані дані (Фіг. 4) демонструють, що запропонований ферментний біосенсор для визначення активності алкалоїдів чистотілу шляхом інгібіторного аналізу може бути використаний у точному експрес-аналізі активності алкалоїдів при одержанні лікарських препаратів та визначати терапевтичні дози лікарських препаратів, одержаних на основі алкалоїдів чистотілу.

Джерела інформації:

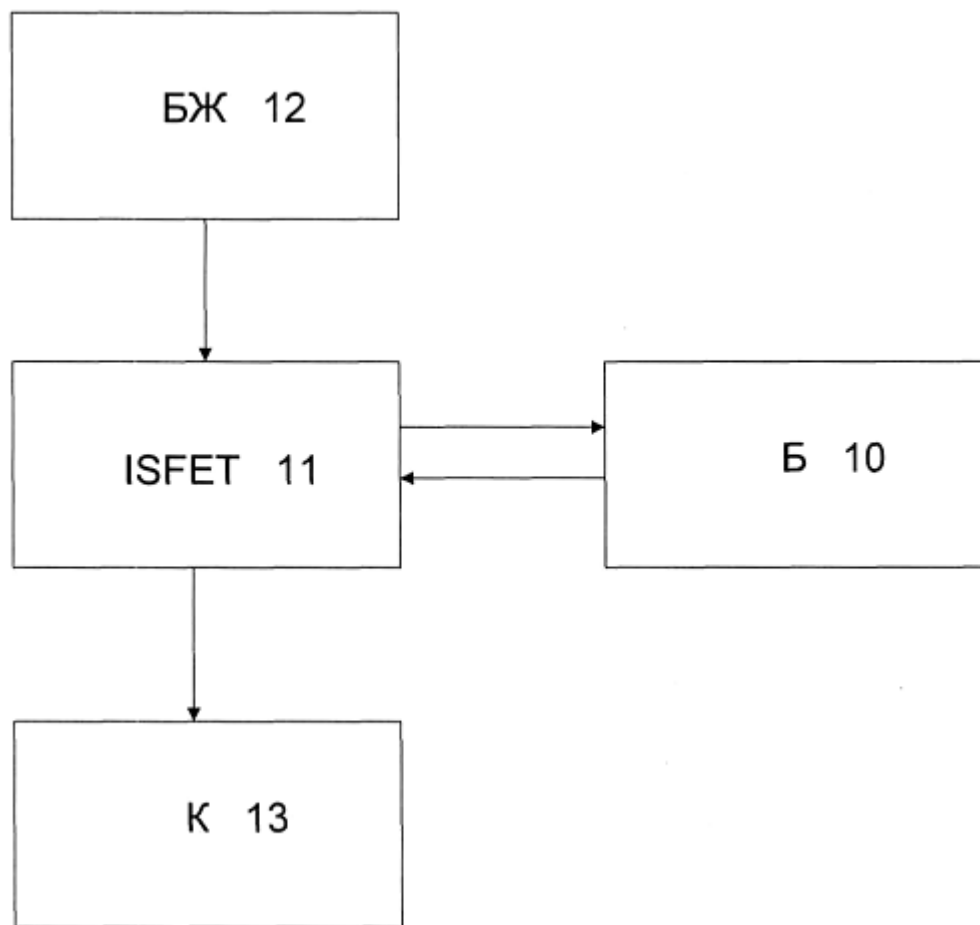
1. <http://likarski-travi.ks.ua/chistotl.html>.
2. Потопальский А.И. Препараты чистотела в биологии и медицине. Киев, Наукова думка, 1992. 200 с.
3. Taborska E., Bochorakova H., Dostal J., Paulova H. The greater celandine (*Chelidonium majus* L.) - review of present knowledge. Ceska Slov. Farm. 1995; 44: 71-75.
4. Гришина Е.И., Погодин И.С., Лукша Е.А. Фармакогнозия. Электронное учебное пособие, Омская государственная медицинская академия, Омск, 2008. 1067 с. [http://gendocs.ru/v3832/лекции -_ фармакогнози](http://gendocs.ru/v3832/лекции_-_фармакогнози) 12.06.2013.
5. Павлюченко А.С., Кукла А.Л., Голтвянский Ю.В. Применение ионселективных полевых транзисторов для ферментного анализа токсичных примесей в водных растворах. // Сенсоэлектроника. 2010. № 3. С. 35-46.
6. О.Л.Кукла, О.С Павлюченко, О.В. Бушма, Ю.В. Голтвянский, С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін. Патент України на корисну модель «Аналого-цифровий іонно-селективний вимірювач параметрів рідких середовищ», UA №48359 МПК G01N27/26, 27/27, заявл. 26.10.2009, опубл. 10.03.2010, Бюл.№5.
7. Авторське свідоцтво СРСР №368254. Способ получения тиафосфоамидных производных алкалоидов чистотела большого. / Туркевич Н.М., Потопальский А.И., Оликовская М.С., Пашкевич Ю.М., Новицкий В.М. Бюл. № 9. - 1973. - С. 92., заявка 16.06.1969.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

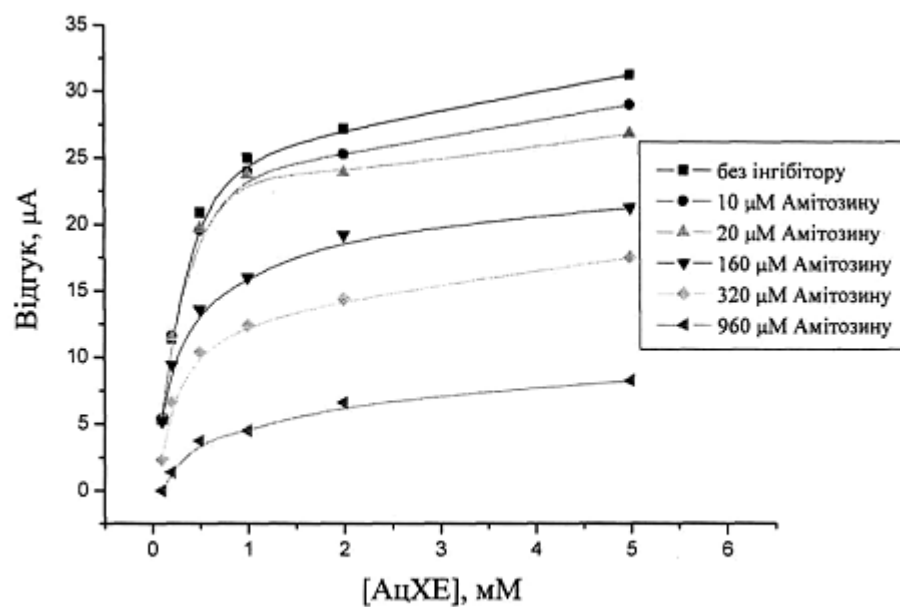
Ферментний біосенсор для визначення активності алкалоїдів чистотілу, що містить пару напівпровідникових перетворювачів на основі іонселективного польового транзистора з рН-чутливим шаром з вбудованим мікроелектродом порівняння, виходи обох напівпровідникових перетворювачів призначені для підключення до відповідних входів аналого-цифрового вимірювача параметрів рідких середовищ, а виходи цього приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера, який **відрізняється** тим, що на один з перетворювачів на основі рН-ПТ розташована робоча мембрана, яка містить фермент - ацетилхолінестеразу, чутливий до алкалоїдів чистотілу, а на другому перетворювачі на основі рН-ПТ розташована референтна мембрана, що містить сироватковий альбумін бика.



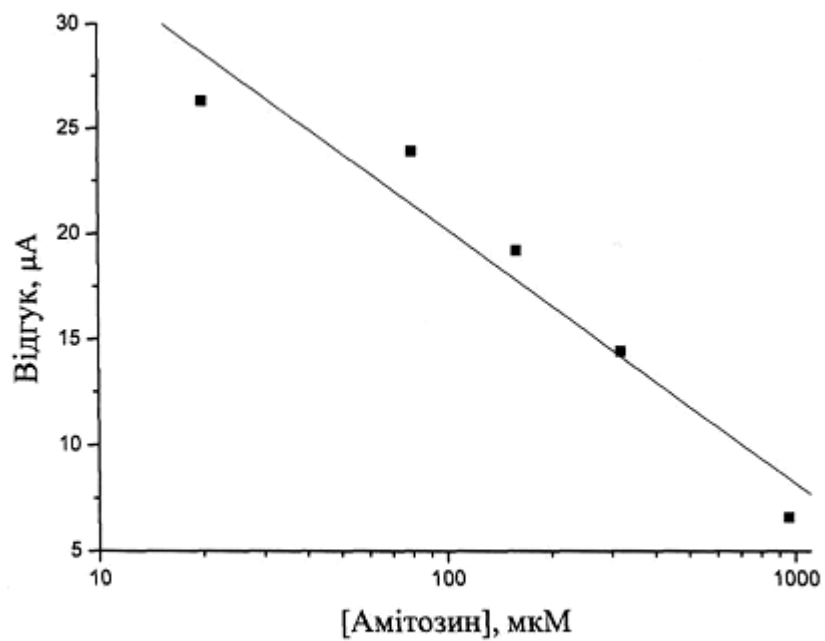
Фиг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601