

## ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Іванова А. Д., Блажеєвський М.Є., Ковальська О. В.

*Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна*

[an.ivanova2014@gmail.com](mailto:an.ivanova2014@gmail.com)

**Вступ.** Ферментативний аналіз, метод, заснований на використанні ферментів для кількісного визначення хімічних речовин у розчині. За допомогою ферментативних методів аналізу можна визначити речовини, які можуть брати участь у хімічних реакціях, що каталізуються ферментами, а також активатори чи інгібітори ферментів. Ферментативні аналітичні методи (ФМА) характеризуються високою чутливістю і специфічністю, оскільки ферменти каталізують перетворення речовин з високою швидкістю і високою селективністю, навіть якщо досліджувана сполука знаходиться в суміші з іншими речовинами - хімічно подібні речовини.

**Мета роботи.** Здійснити аналітичне дослідження ферментативних методів аналізу.

**Матеріали та методи.** Узагальнення та систематизації матеріалів і наукових публікацій з метою об'єктивно-достовірного відтворення інформації щодо ферментативних методів аналізу.

**Результати дослідження.** При визначенні субстрату для ферментативної реакції до аналітичної проби додається фермент або подібний інгредієнти, необхідні для реакції. Після завершення реакції вміст продукту реакції в розчині вимірюють будь-яким зручним способом. Наприклад, визначення етилового спирту в розчині проводиться за допомогою ферменту алкогольдегідрогенази (АДГ), в якому бере участь кофермент АДГ - нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД). Останній під час ферментативної реакції кількісно перетворюється на відновлений НАД. Відновлена форма НАД, на відміну від окисленої, має здатність поглинати ультрафіолетове світло ( $\lambda=340$ ) нм. Цим методом можна виміряти 1 мкг спирту в 1 мл розчину. Він заснований на визначенні зміни кислотності розчину під час ферментативної реакції. Наприклад, ефіри карбонових кислот, фосфатні ефіри тощо. Кислоти можна виміряти за допомогою певних ферментів, які каталізують гідроліз. Оскільки під час гідролізу утворюється відповідна кислота, визначену концентрацію ефіру можна розрахувати за результатами титрування після завершення реакції.

У ферментативних дослідженнях часто використовують комбінації (сполучення) кількох ферментативних реакцій. Наприклад, концентрацію глюкози можна визначити за допомогою ферментів глюкозооксидази (ГО) і пероксидази (ПО). Під дією ГО глюкоза перетворюється на глюконову кислоту, утворюється перекис водню, а під впливом ПО введений у розчин ортодіанідин (або тризин) може окислюватися з утворенням забарвленого розчину. Вимірюючи інтенсивність забарвлення розчину, можна розрахувати початкову концентрацію глюкози (чутливість цього методу становить 5 мкг у зразку). Цей метод призначений для швидкого визначення глюкози в сечі хворих на цукровий діабет за допомогою індикаторного паперу, просоченого спеціальним реактивом.

Різновидом ферментативних методів аналізу є кінетичні методи аналізу, засновані на залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації аналізованих речовин, якими можуть бути субстрати, активатори або інгібітори ферментів. Знаючи характер цієї залежності, можна, вимірюючи швидкість ферментативної реакції, розрахувати концентрацію аналізованої речовини. Наприклад, кількісне визначення фосфорорганічних інсектицидів, що є сильними інгібіторами, ферменту холінестерази виробляється шляхом виміру активності цього ферменту у відсутності і у присутності інгібітору. Чутливість методу визначення, наприклад діетил-пара-нітрофенілфосфата, складає 0,015 мкг в пробі, іонів магнію (по впливу, що активує їх, на фермент, що окислює ізолимонну кислоту) – 0,1 мкг.

Широкого поширення набули ферментативні методи аналізу, засновані на використанні ферментів, міцно пов'язаних з твердими носіями, якими можуть бути полімери, неорганічні сорбенти, гелі. «Твердотільний фермент», розміщений поверх такого електрохімічного датчика (електрод зі скла, платини тощо), є ферментним електродом, який служить інструментом для вимірювання швидкості ферментативної реакції в розчині аналіту. За допомогою ферментних електродів вимірюють сечовину, амінокислоти, пеніцилін, глюкозу тощо. Чутливість у пробах 0,1–0,01 мкг.

#### **Висновки:**

Отже, як показав огляд літературних джерел, завдяки своїй специфічності ферменти є корисними інструментами в аналітичній хімії. Специфічність та вибірковість аналізу пояснюється довжиною хвилі для спектрофотометричних методів. Водночас завдяки гнучким параметрам ензимних методів аналізу - для кожного типу ферменту характерна певна довжина хвилі, холосте вимірювання, додавання буфера, додавання реагентів, додавання субстрату, температура й час інкубації для конкретного ферменту, а також тривалість збору даних - формується специфічність та вибірковість методу, що в свою чергу, дозволяє розробляти впроваджувати ферментні методи аналізу як в науково-дослідних лабораторіях так і в лабораторіях контролю якості.

#### **Література:**

1. Березін І. Ст, Клесов А. А., Ферментні електроди, «Успіхи хімії», 1976, т. 45, см 2: *Methoden der enzymatische Analyse*, Hrsg. H. U. Bergmeyer, 3 Aufl., Bd 1–2, Weinheim, 1974.
2. Pohanka M. *Electrochemical Biosensors with Butyrylcholinesterase. Period 2016-2022. A review. Int. J. Electrochem. Sci.*, 17 (2022) Article Number: 221271, doi: 10.20964/2022.12.74
3. Kerestes O., Pohanka M. *Enzymatic Biosensors for the Environmental Analysis of Pesticides. Chem. Listy* 116, 358–364 (2022) <https://doi.org/10.54779/chl20220358>