



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254644

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/04

(22) Přihlášeno 26 06 86

(21) PV 4737-86.V

(40) zveřejněno 14 05 87

(45) vydáno 15 09 88

(75)

Autor vynálezu

MARKÉ MIROSLAV doc. ing. CSc., VRBOVÁ EVA, KÁŠ JAN ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy enzymové elektrody

Řešení se týká způsobu přípravy enzymové elektrody. Způsob spočívá v tom, že se enzym nebo směs enzymů imobilisuje na předem aktivovanou kolagenovou membránu reakcí s glutaraldehydem nebo s isokyanidem a glutaraldehydem, načež se kolagenová membrána s imobilisovaným enzymem či enzymy fixuje na povrch elektrochemického čidla. Aktivace kolagenové membrány se provede částečnou desintegrací kolagenových vláken a/nebo rozštěpením určitého podílu peptidových vazeb účinkem proteolytických enzymů (např. pepsinu) nebo denaturačních činidel (např. močoviny) nebo krátkodobým působením minerálních kyselin nebo dlouhodobým působením organických kyselin a/nebo opakovaným zmražením a rozmražením kolagenové membrány ve vodných roztocích.

Vynález se týká způsobu přípravy enzymové elektrody.

Využití enzymů v analytické chemii je podmíněno jejich vlastnostmi, které jsou neobvykle vhodné pro analytické účely. Jde o vysokou substrátovou a účinkovou specifitu, stereospecifitu, mírné reakční podmínky a značnou rychlost enzymových procesů. Použití volných enzymů naráží v některých případech na technické či ekonomické problémy jejich získávání, obtížnou regeneraci z reakční směsi, poměrně malou stabilitu volných enzymů atd. Tyto problémy jsou postupně řešeny náhradou rozpustných enzymů imobilizovanými enzymy použitelnými pro velký počet analys.

Jednou z možností použití imobilizovaných enzymů jsou biosensory, z nichž je značná pozornost věnována zejména enzymovým elektrodám. Enzymové elektrody jsou realizovány spojením imobilizovaného enzymu a vhodného elektrochemického senzoru. Tímto způsobem je možno detegovat velký počet enzymových reakcí, teoreticky všech, při kterých dochází ke změně koncentrace elektrochemicky detegovatelných látek. Velkou výhodou enzymových elektrod je rychlost, přesnost a reprodukovatelnost stanovení a dále možnost analýsy roztoků barevných, kalných či fluoreskujících, kde jsou jiné způsoby detekce obtížné. Tato skutečnost umožňuje jejich použití v nejrůznějších oblastech chemie, chemické technologie, farmaceutického a potravinářského průmyslu, v moderních biotechnologiích a v klinické biochemii.

Enzymové elektrody je možno připravit:

1. Použitím rozpustného enzymu, který se oddělí v blízkosti elektrochemického čidla od okolního prostředí semipermeabilní membránou (tzv. pseudoimobilisace).

2. Enzym se zachytí ve struktuře gelu (polyakrylamidového gelu, želatiny, alginátů apod.) na povrchu senzoru.

3. Enzym je sorbován na povrch senzoru či membrány obklopující senzor a tato fixace sorpcí je zvýšena vzájemným prokřížením enzymových molekul bifunkčními činidly.

4. Enzym je kovalentně vázán některou z imobilizačních technik na přírodní nebo syntetické membrány, které jsou v těsném styku se senzorem.

Analytická využitelnost enzymových elektrod je podstatně ovlivněna jejich stabilitou. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují stabilitu enzymových elektrod, je možno uvést způsob imobilisace, množství navázaného enzymu, čistotu enzymu, podmínky enzymové reakce a stabilitu senzoru (elektrochemického čidla). Z uvedených faktorů je způsob imobilisace nejspíše ovlivnitelným faktorem, kterému je věnována náležitá pozornost.

Způsobem podle vynálezu je enzymová elektroda připravena imobilisací enzymu na předem aktivovanou kolagenovou membránu následnou reakcí s glutaraldehydem nebo čtyřkomponentní reakcí mezi přidaným isokyanidem a glutaraldehydem s karboxylovými a aminoskupinami enzymu a kolagenové membrány.

Způsobem podle vynálezu se kolagenová membrána aktivuje částečnou dezintegrací kolagenových vláken a/nebo rozštěpením určitého podílu peptidových vazeb a tím zvýšení kapacity vazebných míst pro imobilisaci enzymů. Aktivace kolagenové membrány je způsobem podle vynálezu dosaženo krátkodobým působením minerálních kyselin nebo dlouhodobým působením organických kyselin, působením denaturačních činidel (např. močoviny), proteolytických enzymů (např. pepsinu) nebo i pouhým opakovaným zmrazováním a rozmrazováním kolagenových membrán ve vodných roztocích.

Způsobem podle vynálezu se na aktivovanou kolagenovou membránu aplikuje enzym či směs enzymů určených k imobilisaci a poté se přidá buď samotný roztok glutaraldehydu, nebo v kombinaci s přidaným isokyanidem. Vlastní enzymová elektroda se poté připraví fixací

kolagenové membrány s imobilisovaným enzymem či enzymy na povrchu elektrochemického čidla.

Výhodou způsobu přípravy enzymové elektrody podle vynálezu je jednoduchost provedení, vysoká stabilita získané elektrody, dostatečně rychlá odezva a širší lineární odezvy enzymové elektrody na koncentraci přidaného substrátu.

Vynález je dokumentován příklady použití, aniž by se jimi omezoval:

P ř í k l a d 1

Kolagenová membrána byla podrobena 24 h působení 6 mol.dm^{-3} močoviny. Poté byla promyta dest. vodou a $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ amonnofosfátovým pufrům pH 7,0. Kovovým dutým válečkem byl vyříznut terčík o průměru 8 mm. Na částečně vysušený povrch vyříznutého terčíku bylo aplikováno $20 \mu\text{l}$ glukosaoxidas a $2,5 \mu\text{l}$ 2,5% glutaraldehydu. Po 96 hodinách imobilisace při 4°C byla membrána důkladně promyta $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ amonno-fosfátovým pufrům pH 7,0. Kolagenový terčík s imobilisovanou glukosaoxidase byl fixován na povrchu kyslíkového čidla Clarkova typu.

Spodní hranice objektivně stanovitelné koncentrace D-glukosy činila $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Horní hranice lineárního rozsahu kalibrační křivky činila $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ D-glukosy v reakční směsi, tj. $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.dm}^{-3}$ v nástřiku. S takto připravenou enzymovou elektrodou bylo provedeno přibližně 500 analys během 30 dnů, aktivita imobilisované glukosaoxidasy během této doby poklesla o pouhých 3 %.

P ř í k l a d 2

Kolagenová membrána byla podrobena 24 hodinovému působení 1% roztoku pepsinu v $0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$ kyselině chlorovodíkové. Poté byla promyta vodou a $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ amonno-fosfátovým pufrům pH 7,0. Kovovým dutým válečkem byl vyříznut terčík o průměru 8 mm. Na částečně vysušený povrch vyříznutého terčíku bylo aplikováno $20 \mu\text{l}$ askorbátoxidasy, $2,5 \mu\text{l}$ 2,5% glutaraldehydu a $1,0 \mu\text{l}$ cyklohexylisokyanidu. Po 48 h imobilisace při 4°C byla membrána důkladně promyta $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ amonno-fosfátovým pufrům pH 7,0. Kolagenový terčík s imobilisovanou askorbátoxidase byl fixován na povrchu kyslíkového článku Clarkova typu. Získaná enzymová elektroda byla použita ke stanovení vitamínu C v rozsahu koncentrací 10^{-4} až $10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$.

P ř í k l a d 3

Kolagenová membrána byla podrobena 6 měsíčnímu působení 1 mol.dm^{-3} kyseliny mléčné při 4°C . Shodným postupem jako v příkladu 1 byla připravena enzymová elektroda na stanovení D-glukosy vykazující srovnatelné parametry z hlediska linearitý odezvy i stability imobilisovaného enzymu.

P ř í k l a d 4

Kolagenová membrána byla podrobena opakovanému zmražení a rozmražení (celkem 5krát) ve vodném roztoku. Shodným způsobem jako v příkladu 1 byla na vykrojený terčík imobilisována galaktosaoxidas. Po fixaci kolagenového terčíku s navázanou galaktosaoxidase na kyslíkový článek byla připravena enzymová elektroda s lineární odezvou na D-galaktosu v koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ až $10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$.

P ř í k l a d 5

Kolagenová membrána aktivovaná postupem dle příkladu 4 byla podrobena následnému působení močoviny dle příkladu 1. Na vykrojený terčík byla aplikována beta-galaktosidas ($15 \mu\text{l}$), glukosaoxidas ($15 \mu\text{l}$) a 2,5% glutaraldehyd ($4 \mu\text{l}$). Dalším postupem dle příkladu 1 byla připravena enzymová elektroda na stanovení laktosy v koncentračním rozsahu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ až $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ v reakční směsi.

P R Ě D M Ě T V Y N Ā L E Z U

1. Způsob přípravy enzymové elektrody vyznačující se tím, že se enzym nebo směs enzymů imobilisuje na předem aktivovanou kolagenovou membránu reakcí s glutaraldehydem nebo s glutaraldehydem za přítomnosti isokyanidu a kolagenová membrána s imobilisovaným enzymem se fixuje na povrch elektrochemického senzoru.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se kolagenová membrána aktivuje částečnou desintegrací kolagenových vláken a/nebo rozštěpením určitého podílu peptidových vazeb účinkem proteolytických enzymů nebo denaturačních činidel nebo krátkodobým působením minerálních kyselin nebo dlouhodobým působením organických kyselin a/nebo opakovaným zmražením kolagenových membrán ve vodných roztocích.