

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263 066

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28 08 87
(21) PV 6301-87.B

(51) Int. Cl.⁴

C 12 M 1/40

(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 15 01 90

(75)
Autor vynálezu

KÜHN MANFRED ing., BERLIN (DD),
BENEŠ MILAN ing. CSc., PRAHA (CS)

(54)

Stabilní biosenzory a způsob jejich výroby

Stabilní biosenzory obsahující biologicky aktivní látky s SH enzymy a membránový materiál chránící před inaktivací těžkými kovy. Přednostními membránovými složkami schopnými vázat těžké kovy jsou komplexující ligandy, aromatické heterocyklické sloučeniny s endocyklickým terciárním dusíkovým atomem a funkční skupiny, které tvoří s těžkými kovy málo disociované sloučeniny. Pracovní a skladovací stabilita biosenzorů podle vynálezu se prodlouží ze dnů na týdny.

Vynález se týká stabilních biosenzorů, obsahujících biologicky aktivní vrstvy s SH enzymem a membránový materiál nerozpustný ve vodných roztocích a schopný vázat těžké kovy a způsobu jejich výroby. Dají se použít v medicíně, biotechnologii, zemědělství a potravinářství, při ochraně životního prostředí.

Pro vývoj biospecifických elektrod biosenzorů, které se získají z amperometrických, potenciometrických a konduktometrických elektrod, případně z ionselektivních tranzistorů řízených polem a enzymů imobilizovaných v membráně tedy biologicky aktivních membrán, se dá použít řada -SH enzymů, např. ureáza, asparaginasa, α -glukosidasa, alkoholdehydrogenasa a další. Řada z těchto biospecifických elektrod je připravena k zavedení do praxe / F. W. Scheller a spol.: Biosensors 1 (1985, 135 - 160), ačkoliv jejich širšímu použití stojí v cestě řada nevyřešených problémů. Jedním z nich je částečně snížená pracovní a skladovací stabilita takových biospecifických elektrod, v jejichž biokatalyticky aktivní membráně jsou imobilizovány -SH enzymy. To znamená takové enzymy, které potřebují pro vznik biokatalytické aktivity volné sulfhydrylové skupiny (-dále označované -SH skupiny) Tyto -SH enzymy reagují neobyčejně citlivě na nejmenší stopy těžkých kovů tím, že se inaktivují. Při analytických postupech s použitím biospecifických elektrod je ale možné jen zřídka se vyhnout přítomnosti iontů těžkých kovů. Jednak se připravují měrné roztoky z chemikálií, které pravidelně, i přes nejvyšší stupeň čistoty, obsahují ještě stopy těžkých

kovů, které jsou však postačující k tomu, aby inaktivovaly při kontinuálním působení -SH enzymy dlouhodobě používaných biospecifických elektrod. Dále difundují trvale ionty těžkých kovů z elektrod, např. referentních elektrod, do měrných roztoků, které je obklopují. Výsledkem je, že se inaktivují -SH enzymy nacházející se v biokatalyticky aktivních membránách.

Z těchto důvodů je dále zřejmé, že se těžkými kovy inaktivují nejen izolované enzymy. Je známé, že -SH enzymy jsou obsaženy také např. v integrovaných biokatalyticky aktivních ^{systemech} jako jsou mikroorganismy nebo buňky rostlinného nebo živočišného původu. Takové systémy byly na základě své biologické aktivity použity pro výrobu mikrobiálních elektrod pro analytiku substrátů. I tady však existují problémy malé pracovní a skladovací stability způsobené inaktivací těžkými kovy. Z uvedených problémů vyplývají omezené možnosti použití biospecifických a mikrobiálních elektrod. Na ochranu -SH enzymů před deaktivací ionty těžkých kovů bylo v minulosti popsáno několik způsobů. (DE Offenlegungsschrift 3 347 104 a DDR - W. P. C 12 Q/2695760). Řešení, které je v těchto patentech a v nich uvedené další literatuře popsáno, je založeno na ochraně SH enzymů před jedno a vícemocnými ionty těžkých kovů měrných roztoků přidáním rozpustných sulfhydriových sloučenin buď samotných nebo sulfhydriových sloučenin s chelotvornými stabilizátory nebo sulfhydriových sloučenin v kombinaci s chelotvornými, redukujícími a enzymovými stabilizátory. Tento postup má však značné nedostatky, protože se kromě vysoce čistých a tím i drahých chemikálií při něm používají také chemikálie nepříjemně páchnoucí. Všeobecné rutinní použití těchto postupů se nedá doporučit. Tyto závažné nevýhody řeší stabilní biosenzory a způsob jejich výroby podle vynálezu. Předmět vynálezu umožňuje získat použitelné biosenzory stabilizací biokatalyticky aktivních vrstev.

Podle vynálezu jsou vytvořeny biosenzory základním elektrochemickým senzorem s biologicky aktivní vrstvou, která se skládá z biologicky aktivního materiálu a ve vodě nerozpustného membránového materiálu schopného vázat těžké kovy. Jako biologicky aktivní materiál se používá jeden nebo -SH enzymů, jako je např. ureasa, asparaginasa, α -glukosidasa, alkoholdehydrogenasa nebo jeden či více SH enzymů obsahujících výše integrovaný biologicky aktivní systém, jako jsou např. mikroorganismy a buňky nebo orgány rostlin nebo zvířat. Materiál membrán, který váže těžké kovy, je obecně rozpustný v organických rozpouštědlech. V některých případech se ale může také jednat o anorganické i organické materiály v suspendované formě. V každém případě materiály tvořící membránu a schopné vázat těžké kovy jsou nerozpustné ve vodných roztocích. Membránové materiály vážící těžké kovy obsahují chemicky vázané komplexotvorné ligandy nebo jiné funkční skupiny, které tvoří s těžkými kovy málo disociované sloučeniny. V úvahu přitom přicházejí takové materiály vážící těžké kovy, které mají pro vazbu jedno nebo vícemocných těžkých kovů strukturu s chemicky vázanými chelatotvornými skupinami typu kyseliny iminodioctové a 8-hydroxychinolinu nebo aromatické heterocyklické sloučeniny s endocyklickým terciárním dusíkovým atomem, přednostně imidazol. Jako membránové materiály vážící těžké kovy na ochranu SH enzymů citlivých na těžké kovy v membránách biosenzorů se hodí také materiály obsahující SH skupiny, které tvoří obzvláště málo disociované merkaptidy těžkých kovů. Pro rozpustnost v organických rozpouštědlech se s výhodou jako organické materiály tvořící membránu používají funkcionalizovaný acetát celulózy, polyvinylalkohol nebo podobné polymery s uvedenými skupinami. Na výrobu membrán se ale také mohou použít suspenze vyrobené z roztoků nesíťovaného a nemodifikovaného acetátu celulózy nebo polyvinylchloridu v organických rozpouštědlech nerozpustných a jemně práškových nosičů organického nebo anorganického původu s kovalentně vázanými chelatotvornými skupinami nebo funkčními skupinami schopnými vázat těžké

kovy.

Biosenzory se vyrobí tak, že se amperometrický, potenciometrický nebo konduktometrický základní senzor nebo ionoselektivní polem řízený tranzistor, které mají na senzitivním povrchu zachycené SH-enzymy nebo směsi SH-enzymů nebo výše integrované systémy SH-enzymy obsahující, ponoří do roztoku membránového materiálu schopného vázat těžké kovy v organickém rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel. Případně se základní senzor ponoří do suspenze nerozpustného materiálu schopného vázat těžké kovy a SH-enzymů nebo směsi SH-enzymů nebo výše integrovaného systému tyto enzymy obsahujícího v roztoku membránového materiálu v organickém rozpouštědle. Odpařením organického rozpouštědla při pokud možno nízké teplotě nebo ponořením základního senzoru do vodného roztoku se vytvoří membrána, která obsahuje SH enzymy nebo výše integrované biologické systémy obsahující tyto enzymy, chráněná před inaktivací těžkými kovy a schopná je vázat. Na získání membrán s membránovými materiály podle vynálezu na ochranu SH-enzymů biosenzorů před inaktivací těžkými kovy jsou vhodné i jiné technologie. Pro modifikaci popsaného způsobu se může např. biokatalyticky aktivní membrána na povrchu základního senzoru získat také tak, že se senzor s volným senzitivním povrchem ponoří nejprve do suspenze popsaného materiálu se schopností vázat těžké kovy a SH enzymu v tekavém organickém rozpouštědle, přičemž rozpouštědlo se pak odpaří. Biosenzory s amperometrickými potenciometrickými nebo konduktometrickými biospecifickými elektrodami, případně enzymovanými tranzistory řízenými polem s SH enzymy jako biokatalyzátory, získané popsaným způsobem, se vyznačují pozoruhodně vysokou pracovní a skladovací stabilitou. Pracovní stabilita se může ze 3 až 4 dnů rozšířit nejméně na 2 až 3 týdny. Použitelnost takového stabilizovaného biosenzoru je samozřejmě závislá na obsahu těžkých kovů v médiu, protože kapacita membrán pro těžké kovy není omezena. Za obvyklých podmínek kvantitativní analýzy substrátů pomocí biosenzorů se ale za všech okolností do-

sahuje u stabilizovaných biosenzorů podle vynálezu doba použití dva týdny. To znamená podstatný pokrok proti předchozímu stavu techniky a dovoluje delší, širší a tím efektivnější použití biosenzorů; vyrobených s SH enzymy v biologicky aktivní vrstvě. Předmět vynálezu je dále objasněn na příkladech, ale jeho rozsah se tím neomezuje.

Příklad 1

50 mg acetátu celulózy modifikovaného SH-skupinami (obsah SH skupin 22 $\mu\text{mol/g}$ materiálu) se rozpustí za míchání při teplotě místnosti v 2,5 ml čerstvě destilovaného dimethylformamidu. Současně se naváže adsorpčně ureáza na senzitivní povrch kombinované pH elektrody, který byl uveden do aktivní formy obvyklým způsobem. Takto upravená pH elektroda se ponoří na asi 5 sekund do roztoku výše uvedeného polymeru. Pro získání biosenzoru se zpracovává dále dvěma způsoby. Při prvním se ponoří elektroda do acetonu a rozpouštědlo se odpaří při teplotě místnosti. Při druhém se pH elektroda hned po namočení do roztoku polymeru ponoří do vodného roztoku. V obou případech se vytvoří membrána, která obsahuje ureázu a je na pH senzitivním povrchu pH elektrody pevně vázána. Taková potenciometrická elektroda se může používat pro stanovení močoviny ve fyziologických roztocích nejméně 3 týdny. Má ještě po 10 dnech více než 50 % počáteční aktivity; zatímco stejná, ale z obvyklého nemodifikovaného acetátu celulózy vyrobená, enzymová elektroda již po 3 až 4 dnech nemá žádnou aktivitu. Imobilizovaná ureáza je tudíž zcela inaktivovaná.

Příklad 2

Ureáza, polyvinylchlorid, práškováný imidazolový polymer připravený podle DDR W.P. 124405 (obsah imidazolu 1,46 mmol/g nosiče) ve stejných váhových poměrech (1:1:1) se rozpustí, respektive suspenduje, v čerstvě destilovaném tetrahydrofuranu

zbaveném peroxidů. Do míchané suspenze se ponoří připravená kombinovaná pH elektroda a organické rozpouštědlo se pak nechá při teplotě místnosti odpařit. Vytvořená biologicky aktivní membrána má vysokou stabilitu ureázy, která je při každodenním tříhodinovém použití po týdnu ještě nezměněná. Po dvou-týdenním použití za stejných podmínek má tato enzymová elektroda ještě 60 % původní aktivity. Stejná elektroda, ale bez polymerní komponenty, která váže těžké kovy, je již po 3 dnech úplně inaktivní.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Stabilní biosenzory na bázi elektrochemických základních senzorů s biokatalyticky aktivní vrstvou, vyznačené tím, že biokatalyticky aktivní vrstvu tvoří biologicky aktivní látky v kombinaci s membránovým materiálem nerozpustným ve vodných roztocích a schopným vázat těžké kovy.
2. Stabilní biosenzory podle bodu 1, vyznačené tím, že jako biologicky aktivní látky se používají jeden nebo více SH enzymů v izolované formě nebo výše integrované, biologicky aktivní systémy obsahující takové SH enzymy.
3. Stabilní biosenzory podle bodu 1, vyznačené tím, že jako membránový materiál se schopností vázat těžké kovy se použije ve vodě nerozpustné organické nebo anorganické nosiče s kovalentně vázanými komplexotvornými skupinami nebo aromatickými heterocyklickými sloučeninami s endocyklickým terciálním dusíkovým atomem nebo s funkčními skupinami tvořícími s těžkými kovy málo disociované sloučeniny.
4. Způsob výroby stabilních biosenzorů, vyznačený tím, že se elektrochemický základní senzor s vrstvou biologicky aktivní látky uvede do styku s membránovým, ve vodě nerozpustným materiálem schopným vázat těžké kovy.
5. Způsob podle bodu 4, vyznačený tím, že elektrochemický základní senzor s SH enzymem nebo směsí SH enzymů nebo s výše integrovaným systémem obsahujícím tyto SH enzymy, zachyceným na aktivním povrchu, se ponoří do roztoku membránového materiálu schopného vázat těžké kovy v organickém rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel a rozpouštědlo se pak odpaří.

6. Způsob podle bodu 4, vyznačený
tím, že se elektrochemický základní senzor ponoří do sus-
penze tvořené roztokem membránového ^{materiálu} rozpustného v organic-
kém rozpouštědle s nerozpustným materiálem schopným vázat
těžké kovy a SH enzymem nebo směsí SH enzymů nebo výše
integrovaným systémem, obsahujícím takové enzymy, a organic-
ké rozpouštědle se pak odpaří.

7. Způsob podle bodu 4, vyznačený
tím, že se biokatalyticky aktivní vrstva vytvoří ponořením
elektrochemického základního senzoru opatřeného nejprve SH
enzymem nebo směsí SH enzymů nebo výše integrovaným systé-
mem obsahujícím SH enzymy a membránovým materiálem schopným
vázat těžké kovy do vodného roztoku.