



SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

177369

Bejelentés napja: 1978. IX. 08.

(RA-688)

Nemzetközi osztályozás:

G 01 N 27/26
G 01 N 27/40

Közzététel napja: 1981. III. 28.

Megjelent: 1982. VIII. 31.

Feltalálók:

Dr. Havas Jenő okl. vegyész 45%, dr. Nagy Géza okl. vegyész 20%, Porjesz Emma okl. vegyész 15%, dr. Pungor Ernő okl. vegyész 20%, Budapest

Szabadalmas:

RADELKIS Elektrokémiai
Műszergyártó Szövetkezet, Budapest

Ipari molekula-szelektív érzékelő és eljárás annak előállítására

1

2

A találmány ipari molekula-szelektív elektroanalitikai érzékelő, amely alkalmas folyadékban pl. ipari szennyvizekben oldott vegyületek vagy ionok pl. diklórfenol, cianid-, higany(II)-ionok szelektív meghatározására, továbbá eljárás molekula-szelektív elektroanalitikai érzékelő előállítására.

Ismereteseek olyan molekula-szelektív elektroanalitikai érzékelők, ún. enzimelektrodok, amelyek alkalmasak folyadékmintákban oldott vegyületek koncentrációjának meghatározására. A molekula-szelektív érzékelők elektrokémiai viselkedésével és alkalmazásával az irodalom [P. L. Bailey: Elemzések szelektív elektrodokkal. Heyden and Son Ltd. London (1976), Nagy, G., Pungor, E.: Hung. Sci. Instr. 32. 1-10. (1975)] részletesen foglalkozik. Az ismert, elektroanalitikai mérőcellának tekintendő molekula-szelektív érzékelők közös tulajdonsága, hogy ionszelektív vagy fém jelzőelektrodot és másodfajú vonatkozási elektrodot hordozó elektrodtestük olyan elektrolit oldatot tartalmazó csőszzerű burkoló-testben van elhelyezve, amelynek a jelzőelektrod érzékelő felülete felé eső vége gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható hártáival pl. dialízis hártáival van lezárva és a hártá a meghatározandó komponensre nézve szelektív, hatás-specifikus katalizátort, kémiaiilag vagy fizikailag kötött állapotú enzimet tartalmazó réteggel, ún. reakció-réteggel pl. akrilamid gél-réteggel, vagy rendre: gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható hártáival pl. cellofán hártáival, szelektív enzimet

szuszpendált állapotban tartalmazó oldat-réteggel, mint reakció-réteggel, gáz és oldott anyag átjárható hártáival pl. cellofán hártáival van érintkezésben.

Ismeretes olyan magyar találmányi leírás (No. 7577, 1978) is, amelynél a reakció-réteg felületén kémiai kötással immobilizált enzimet tartalmazó fehérje alapú természetes membrán.

Az ismert molekula-szelektív érzékelők úgy működnek, hogy a meghatározandó komponens ún. szubsztrátum pl. glükóz molekulái, valamint adott esetben a reagens pl. oxigén molekulái a szelektív enzimet, mint hatáspecifikus katalizátort pl. glükóz-oxidázt tartalmazó reakció-rétegbe diffundálnak és ott kémiai reakciót hoznak létre. A jelzőelektrod az enzim által katalizált reakcióban résztvevő reagens vagy a reakcióban keletkezett anyagok egyikének koncentrációjával vagy aktivitásával jól definiált függvénykapcsolatban levő szelektív jelet szolgáltat. Az aktivitás vagy a koncentráció lokális értéke egyéb tényezők állandósága esetén a reakció sebességétől függ, amely a szubsztrátum koncentrációjával egyértelmű függvénykapcsolatban van. Így stacionárius állapotban az áramerősség vagy a cellafeszültség jel mérése útján tehát közvetlenül meghatározható a minta keresett koncentráció értéke.

Az ismert molekula-szelektív érzékelők elkészítése körülményes, időigényes és különleges szakértelmet igénylő feladat, amely — annak ellenére, hogy az enzim-immobilizálás problémájának meg-

oldására igen nagy számú különféle módszer áll rendelkezésre [O.R. Zaborsky: Immobilized Enzymes. CRC Press. Cleveland, Ohio. (1974)] – csak többé-kevésbé reprodukálható.

Az érzékelők legkedvezőtlenebb sajátsága a rövid élettartam pl. néhány nap, egy-két hét, amely a reakció-réteg kedvezőtlen felépítésével és kiképzésével van kapcsolatban. A használat során jelentkező további hátrány, hogy az érzékelőket, illetve a kötött állapotú enzimet tartalmazó gél-rétegeket aktivitásuk megőrzése céljából használaton kívül alacsony hőmérsékleten pl.: $-1 \dots -2^\circ\text{C}$ kell tárolni.

Az ismert elektródok sérülékenyek, mechanikai szilárdságuk kicsi és válaszüdejük hosszú pl.: $2 \dots 8$ perc, amely körülmény laboratóriumi – de főként ipari alkalmazásukat korlátozza. A felsorolt hátrányok elegendőek voltak arra, hogy a igényelt egyszerű és szelektív mérés technikát biztosító érzékelők a gyakorlatban ne terjedjenek el.

A találmány szerinti érzékelő konstrukciójának további előnye az ismert érzékelőktől eltérően, hogy kiküszöböli a vonatkozási elektródból eredő ezüstionok okozta enzimgátló hatást.

A találmány célja olyan ipari molekula-szelektív érzékelő biztosítása, amely egyszerűen, rövid idő alatt, különleges szakertelem nélkül és reprodukálhatóan állítható elő, továbbá, amelynek a mechanikai szilárdsága nagy, az érzékelő élettartama az ismertekének többszöröse pl. 1 év, a válaszüje rövid pl. $40 \dots 60$ másodperc.

A találmány alapját az a felismerés képezi, hogy a célkitűzéseknek megfelelő minőségű érzékelő úgy állítható elő, hogy reakció-réteget fektet alapú természetes hártán pl. bőrfalon, vagy műanyag pl. polipropilén filmen vagy fehérjeszerű anyagból készült hálóban pl. selyemhálóban vagy műanyag hálóban pl. poliészter hálóban, mint hordozón vagy hordozóban, utóbbiakal kémiai vagy fizikai kötésben levő, vagy hordozó nélküli enzim katalizátort vagy katalizátorokat kovalens kötéssel tartalmazó ún. háló a hálóban szerkezetű membránból alakítjuk ki. A háló a hálóban szerkezetű membrán lényegében olyan térhálósított műanyag pl. poliakrilamid, polivinilklorid film, amelynek inert térhálójában inert fehérje és/vagy enzim molekulákból álló aktív térháló helyezkedik el.

A találmány szerinti érzékelő membránjának szilárdsága struktúrája, továbbá a hordozóként használt anyagoknak az enzimekkel kémiaiilag rokon sajátsága és mechanikai szilárdsága, valamint a hordozóhoz kémiai vagy fizikai erővel kötött állapota következtében kiváló. Ugyancsak kimagaslóan jó a membránban a leírt módon immobilizált enzimek kémiai ellenállóképessége és stabilitása, így az érzékelő hosszú ideig funkcióképes, használaton kívül pedig – adott esetben szobahőmérsékleten is – hosszú ideig pl. 1 év tárolható anélkül, hogy aktivitása jelentősen megváltozna. Előnyösen változik meg a háló a hálóban szerkezetű reakció-rétegben elhelyezkedő enzimek fizikai-kémiai sajátsága is, pl. a mobilis enzimekhez viszonyítva jelentősen megnő az a pH-tartomány, amelyben katalizátor sajátságuk kifejtésére alkalmasak.

A találmány szerinti membrán további kedvező sajátsága, hogy szilárdsága és az immobilizált enzimek koncentrációja tetszés szerint változtatható.

A hordozóként használt természetes alapú membránok (halfélék légshólyagja, emlősök, hüllők bőrrészelete, egyes állatfajok szaruhártyája, bőrfala, stb.) víz, gáz és ionátjárhatósága a mérés technikai feladatok szempontjából ideális. További hasznos sajátságuk, hogy a reagensként vagy reakciótermékként szereplő gázok vagy ionok átjárhatóságának biztosítása mellett a mérést esetleg zavaró nagy molekulájú anyagokkal – ez lehet maga a szubsztrát vagy egyéb a mintában levő anyag – szemben átjárható réteggént viselkednek.

A találmány szerinti érzékelő kialakítható úgy is, hogy reakció-rétegének kiképzésére egy, két reakció-réteggel rendelkező vagy több egymásra rétegezett egy vagy két reakció-réteggel rendelkező membránt használunk fel. Ebben az elrendezésben mindegyik membránfelület más és más sajátságú enzimet tartalmaz immobilizált állapotban. β -glükózid szelektív érzékelő esetében a minta felé eső membrán felülete β -glükózidázt, a jelzőelektród felé eső membrán glükózidázt tartalmaz. Az első membránon levő enzim, a β -glükózidáz a meghatározandó komponens, a β -glükózid (pl. amigdalín, szalicin) és a víz között hidrolízis reakciót hoz létre, amelynek egyik terméke glükóz. A második membránon levő enzim, a glükózidáz a keletkezett glükóz és az oxigén közötti reakciót katalizálja. Az oxigén a membránok mögött elhelyezkedő jelzőelektródon koncentrációjával arányos mérőjelet hoz létre. Az oxigén-koncentráció csökkenéssel arányos jel a meghatározandó komponens koncentrációjával jól definiált függvénykapcsolatban van. Ezzel a kiviteli elrendezéssel mérés technikai egyszerűsítések és szelektivitás növelés érhető el, ugyanakkor olyan termékek meghatározására is lehetőség van, amelyek egy lépésű reakcióban nem hoznak létre elektroanalitikai módszerrel mérhető terméket vagy változást a mérhető anyag koncentrációjában vagy aktivitásában.

A találmány szerinti érzékelő megvalósítható úgy is, hogy a reakció-réteget képező membrán vagy természetes struktúrája hártya, vagy háló szeparált felületrészletében(ein) vagy adott felületrészletében(én) statisztikusan homogén eloszlásban más és más enzim-fajta van megkötve és a felületrészlethez egy vagy több jelzőelektród tartozik. Ezzel az elrendezéssel méretnövelés nélkül többfunkciós molekula-szelektív érzékelők állíthatók elő, miáltal ugyanabban a mintában egyidejűleg több komponens meghatározása valósítható meg, vagy a mérést zavaró anyagok koncentrációjának párhuzamos mérésével azok hatása automatikusan vagy kézi úton számításba vehető.

A találmány szerinti molekula-szelektív érzékelők más változatainál a reakció-réteg mechanikai hatásokkal szembeni fokozott védelme és szilárdságuk további növelése céljából a membránnal érintkezésben inert műanyag háló vagy szövődék van elhelyezve. Más változataiknál – az igen rövid válaszüdő elérése érdekében – a membrán egyik oldalának felületi rétegében impregnálást követő

térhálósítással létrehozott gázátjárható vagy ioncserélő sajátosságú réteg van kialakítva.

A találmány szerinti molekula-szelektív érzékelőket úgy állítjuk elő, hogy az inert térháló képzésére alkalmas monomer vagy polimereket pl. akrilamid és/vagy polivinilalkohol oldatát összekeverjük az aktív térháló képzésére alkalmas inert fehérje és/vagy enzim pl. szérumprotein és glükóz-oxidáz pufferolt oldatával. Az oldatkeverékhez adunk még bifunkciós térhálósító anyagokat pl. N,N'-metilén-bis-akrilamidot és glutáraldehidet, iniciátort pl. perszulfátot, és adalékanyagokat pl. fenoszulfátot és glicerint. Az oldatkeveréket sima felületen elhelyezett fehérje alapú természetes membránra pl. bélre vagy műanyag pl. polipropilén filmre vagy anyag hálójára pl. folyamhálóra vagy inert műanyag hálóra pl. nylon hálóra vagy magára a sima felületű anyagra visszük fel. Az oldatkeverék térhálósodása és száradása után a kész membránokat a sima felületű anyagról leválasztjuk, majd desztillált vizes fürdőbe helyezzük, ahol az oldható állapotban maradt részeket kioldjuk. A kioldási művelet befejeztével a membránok mérőkész állapotban vannak. A kész membránt adott esetben gáz vagy gáz és oldott anyag számára átjárható filmmel együtt felhelyezzük az érzékelő burkoló testére, a jelző és vonatkozási elektródot pedig belemerítjük a burkoló testben levő elektrolit oldatba, oly módon, hogy a jelzőelektród felülete a membrán közvetlen közelében helyezkedjen el. Az elektródokat rögzítjük. Ezzel az érzékelőt mérőképes állapotba helyeztük.

1. példa

Az 1. ábra a találmány szerint glükóz-szelektív érzékelő példakénti kiviteli alakját szemlélteti részben metszetben.

1 burkoló test üregében van elhelyezve a puffer sajátosságú, klorid-tartalmú 2 elektrolit oldat, amelybe 3 hordozó testbe foglalt platina 4 jelzőelektród és ezüst-ezüst-klorid 5 vonatkozási elektród merül.

1 burkoló test végét 4 jelzőelektróddal érintkező polipropilén 6 gázátjárható hártya zárja le. 6 gázátjárható filmmel kereskedelmi sertésbélhez kémiaailag kötött állapotú, N,N'-metilén-bis-akrilamiddal térhálósított polivinilalkohol inert hálóban elhelyezett, glutáraldehiddel térhálósított, albumin és glükózoxidáz enzimet (E.C.1.1.3.4.) tartalmazó aktív hálóból felépített 7 membrán érintkezik. 6 gázátjárható hárttyát és 7 membránt 8 gumigyűrű rögzíti 1 burkoló testhez.

1 burkoló test másik végét műanyag 9 elektród-kupak zárja le. 4 jelzőelektróddal és 5 vonatkozási elektróddal összekötött 10 kábel polarizáló feszültségforrással és áramerősség mérő áramkör beme-
netivel van kapcsolatban.

A glükóz-szelektív érzékelő előállítását a következő módon valósítjuk meg. A kereskedelmi forgalomban kapható sózott sertésbél adott részletét desztillált vízben 10...15 percig áztatjuk. A duzzasztott membránt 15 μ vastag gázátjárható pl. polipropilén hárttyával együtt kifeszített állapotban az érzékelő burkoló testének végére rögzítjük. (A

polipropilén membrán burkoló test üregébe a 1. oldalon helyezkedjen el.) 20 percig száradni hagyjuk a membránt. Edénybe bemérünk 80 mg bovin albumint, 80 mg glükózoxidázt (SIGMA Chemical Company, Type II.) és 100 mg N,N'-metilén-bis-akrilamidot és rázogatással feloldjuk 2 ml 7,08 pH-értékű pufferoldatban. Másik edénybe bemérünk 10 súly %-os polivinilalkoholból 2,9 g-ot. Ezután az első edényben levő oldathoz 0,3 ml glicerint, a második edényben levőhöz 100 μ l 25%-os glutáraldehid oldatot, 100 μ l 5%-os frissen készült fenoszulfát oldatot adunk. Mindkettőt összekeverjük, majd az oldatokat összeöntjük és ismét megkeverjük. Az oldatkeverékhez 2...3 mg kálium-perszulfátot adunk, összekeverjük és 40 μ l, illetve 2 ml-ét, illetve 8 cm² felületű sertésbélre vagy polírozott felületű műanyaglapra vagy a polipropilén filmre öntjük. 12 órai szobahőmérsékleten történő állás után a burkoló testen levő vagy a műanyaglapról leválasztott membrán felületéről desztillált vizes mosással eltávolítjuk az immobilizáltan enzimet és a glutáraldehid maradékot. Az így elkészített, a glükózoxidázt immobilizáltan tartalmazó membrán mérőkész vagy tárolásra kész állapotban van.

Az aktivált membrán elkészítése után a hordozó testbe ismert módon elhelyezett platina jelzőelektródot készítjük elő. A jelzőelektród felületét üveglapra cseppentett 6 mól/dm³ koncentrációjú salétromsavban áztatjuk 2...3 percig. A salétromsavat desztillált vízzel mossuk. A mosás befejeztével a jelzőelektród mérésre kész állapotban van. (A salétromsavas mosási műveletet a mérések során 2...3 hetente meg kell ismételni.)

Az előkészítési művelet után az 1. ábrának megfelelően összeszereljük a glükóz-szelektív érzékelőt, majd polarizáló feszültségforráshoz és áramerősség mérő egységhez csatlakoztatjuk.

Az érzékelővel a minta keresett glükóz-koncentrációjának meghatározása kalibrációs görbe felvételével vagy addíciós módszerrel valósítható meg. Az alábbiakban az addíciós módszer előnyös változatát a sorozatos minta-addíciós módszert ismertetjük.

Megállapítást nyert, hogy a mért áramerősség csökkenés (Δi) és az oldat glükóz-koncentrációja (c) között az alábbi összefüggés áll fenn:

$$\Delta i = k \frac{V}{1 + \frac{K}{c}} \quad (1)$$

Ahol V — a maximális reakciósebesség,
K — az enzim-szubsztrát reakció Michaelis-állandója,
k — arányossági tényező.

Két ismert koncentrációjú glükóz oldatban mért áramerősség csökkenés értékből meghatározzuk az adott mérési körülményektől és az érzékelőtől függő V és K értékeket, amelynek alapján az n-edik mintát tartalmazó oldat koncentrációja a mért áramerősség csökkenésből az alábbiak szerint számítható:

$$C_n = i_n k \frac{(C_{n-1} + K)^2}{K + V} \quad (2)$$

(2) egyenlet alapján a minta koncentrációja

$$C_n = C_n \frac{V_A + \sum a_n}{a_n} \quad (3)$$

ahol a_n – az n -edik minta térfogata,
 V_A – a standard oldatok adagolása után
az oldat térfogata,

A példa szerinti módon más molekula-szelektív
érzékelők is előállíthatók. Az 1. táblázatban néhány
további példát mutatunk be. A táblázatban az első
oszlopban azt a molekula-fajtát szerepeltettük,
amelyre az érzékelő szelektív, második oszlopban a
gázátjárható filmmel érintkező, membránban immo-
bilizált enzimet, a harmadikban a jelzőelektród
fajtáját jelöltük.

1. Táblázat

A meghatározandó anyag	Az immobilizált enzim	A jelző-elektrod
húgsav	urát oxidáz E.C.1.7.3.3.	platina
koleszterin	koleszterin oxidáz E.C.1.1.3.6.	platina
L-aminosav	L-aminosav oxidáz E.C.1.4.3.2.	platina
D-aminosav	D-aminosav oxidáz E.C.1.4.3.3.	platina
D-galaktóz	Galaktóz oxidáz E.C.1.1.3.9.	platina
szulfid	szulfid oxidáz E.C.1.8.3.1.	platina
oxalát	oxalát oxidáz E.C.1.2.3.4.	platina
xantin	xantin oxidáz E.C.1.2.3.2.	platina
O-difenol	O-difenol oxidáz E.C.1.10.3.1.	platina
p-difenol	p-difenol oxidáz E.C.1.10.3.2.	platina
hidrogén-hiperoxid	kataláz E.C.1.11.1.6.	platina
laktát	laktát oxidáz E.C.1.1.3.2.	platina
piruvát	piruvát oxidáz E.C.1.2.3.3.	platina
alkohol	alkohol oxidáz E.C.1.1.3.1.3.	platina
L-fenilalanin	fenilalanináz E.C.1.14.3.1.	platina
2-oxosav	piruvát dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.1.	hidrogénion-szelektív

A meghatározandó anyag	Az immobilizált enzim	A jelző-elektrod
oxálacetát	oxálacetát dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.3.	hidrogénion-szelektív
acetoacetát	acetoacetát dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.4.	hidrogénion-szelektív
L-valin	valin dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.14.	hidrogénion-szelektív
L-glutamát	glutamát dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.15.	hidrogénion-szelektív
L-ornitin	ornitin dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.17.	hidrogénion-szelektív
L-lizin	lizin dekarb-oxiláz E.C.4.1.1.18.	hidrogénion-szelektív
penicillin	-laktamáz I E.C.3.5.2.6.	hidrogénion-szelektív

2. példa

A 2. ábra a találmány szerinti karbamid-szelektív érzékelő példakénti kiviteli alakját szemlélteti részben metszetben. 1 burkoló testben van elhelyezve klorid-tartalmú 2 elektrolit oldat, amelybe ammóniumion-szelektív 4 jelzőelektród és ezüst-ezüst-klorid 5 vonatkozási elektród merül, 4 jelzőelektródot 1 burkoló test végében 2 elektrolit oldat számára átjárhatatlan kötással korong alakú 11 szigetelő réteg rögzíti, 4 jelzőelektróddal immobilizált ureáz enzimet (E.C.3.5.1.5.), selyem vagy műanyag hálót tartalmazó, vagy hordozó nélküli háló a hálóban szerkezetű 7 membrán érintkezik. A 7 membránt 1 burkoló testhez 8 gumigyűrű rögzíti. 1 burkoló test falában 2 elektrolit oldat számára átjárható 12 szűrő réteg pl. kerámia rúd van elhelyezve. Az 1 burkoló test másik végét műanyag 9 elektródkupak zárja le. 4 jelzőelektróddal és 5 vonatkozási elektróddal összekötött 10 kábel elektronikus feszültség mérő egység bemeneitvel van kapcsolatban.

A karbamid-szelektív érzékelő reakció-rétegének kialakítása ugyanúgy történik, mint az 1. példában leírtuk. A különbség annyi, hogy a membránban ureáz (E.C.3.5.1.5.) enzimet immobilizálunk és a sertséből helyett selyem vagy nylon hálót használunk. Az érzékelő összeállítása a 2. ábrán bemutatott módon történik. A mérendő komponens koncentrációjának meghatározása ismert módon cellafeszültség-koncentráció kalibrációs görbével vagy addíciós módszerrel valósítható meg.

A 2. példa szerint más molekula-szelektív érzékelők is megvalósíthatók. A 2. táblázatban összefoglalva néhány további példát ismertetünk. A táblázatban az első oszlopban azt a molekula-fajtát jelöltük, amelyre az érzékelő szelektív, a második oszlopban az immobilizált enzimmfajtát, a harmadikban az alkalmazandó szelektív jelzőelektródot szerepeltettük.

2. Táblázat

A meghatározandó anyag	Az immobilizált enzim	A jelző-elektrod
L-dioxifenilalanin	L-aminosav oxidáz E.C.1.4.3.2.	Ammónium-szelektív
L-fenilalanin	L-aminosav-oxidáz E.C.1.4.3.2.	Ammónium-szelektív
L-aminosavak	L-aminosav oxidáz E.C.1.4.3.2.	Ammónium-szelektív
D-szerin	D-szerin dehidratáz E.C.4.2.1.14.	Ammónium-szelektív
L-homoszerin	homoszerin dehidratáz E.C.4.2.1.15.	Ammónium-szelektív
L-treonin	treonin dehidratáz E.C.4.2.1.16.	Ammónium-szelektív
L-hisztidin	hisztidináz E.C.4.3.1.3.	Ammónium-szelektív
nitrit	nitrit reduktáz E.C.1.6.6.4.	Ammónium-szelektív

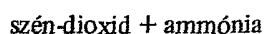
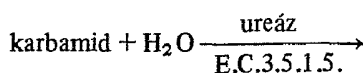
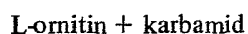
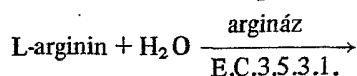
3. példa

A találmány szerinti arginin-szelektív érzékelő példakénti kiviteli alakjának felépítése lényegében azonos a 2. példában leírt karbamid-szelektív érzékelő felépítésével. Az eltérés annyi, hogy az 1 burkoló test végén két egymást fedő 7 membrán van 8 gyűrűvel rögzítve, amelyek közül a 4 jelző-elektrod felé eső membrán felületén ureáz enzim, a másik perforált membrán felületén argináz enzim van immobilizált állapotban megkötve. Az arginin-szelektív érzékelő így két reakció-réteggel van kiépítve.

A találmány szerinti arginin-szelektív érzékelő előállítása a következőképpen történik. Először kialakítjuk a 2. példában leírt módon a karbamid-szelektív érzékelőt. Ezután az ureáz enzimet tartalmazó membránon még egy perforált membránt helyezünk el, amely argináz enzimet (E.C.3.5.3.1.) tartalmaz. Utóbbi előállítása az 1. példában leírtakkal azonos módon történik.

Az arginin-szelektív érzékelő megvalósítható úgy is, hogy csak egy olyan 7 membránt használunk fel az érzékelő kialakítására, amelyben statisztikusan homogen eloszlásban két fajta enzim, az argináz és az ureáz van immobilizálva. Ennél a változatnál az érzékelő további felépítése és előállítása értelemszerűen az előzőekben ismertetett változatnál leírtakkal azonos.

Az érzékelő működése kétlépéses reakción alapul:



A mérendő arginin koncentráció meghatározása ismert módon kalibrációs görbe felhasználásával vagy addíciós módszer alkalmazásával történik.

A 3. példához hasonlóan két reakció-réteggel vagy a két enzimfajtát statisztikusan homogen eloszlásban tartalmazó reakció-réteggel készíthető találmány szerinti molekula-szelektív érzékelőkről a 3. táblázat ad áttekintést. A táblázat első oszlopában a molekula-szelektív érzékelővel meghatározható molekula áll, második oszlopban a külső membránban immobilizált enzim katalizátor található. A harmadik oszlopot a belső – a jelzőelektrodhoz közelebb elhelyezett – membránban immobilizált enzim katalizátorok alkotják. A negyedik oszlopba a jelzőelektrodokat soroltuk.

4. példa

A 4. példában a találmány szerinti két funkciós molekula-szelektív érzékelő példakénti kiviteli alakját és előállítását mutatjuk be.

Az 1 burkoló testben levő puffer sajátosságú, kloridion-tartalmú 2 elektrolit oldatban két 3 horodó testbe épített, platina 4 jelzőelektrod van elhelyezve. 4 jelzőelektrodok felületével 1 burkoló test nyílására rögzített gázátjárható polipropilén 6 hártya van érintkezésben. 6 hártya felületét 7 membrán fedi. 7 membrán egyik 4 jelzőelektroddal érintkező részletében D-aminosav oxidáz, a másik 4 jelzőelektroddal érintkező részletében L-aminosav oxidáz enzim van immobilizált állapotban megkötve. A két funkciós molekula-szelektív érzékelő felépítése a további részleteket tekintve értelemszerűen olyan, mint az 1. példában leírt érzékelő.

Az aminosav oxidázt tartalmazó reakció-rétegek előállítása lényegében az 1. példában leírtakkal azonos módon történik, a különbség az, hogy a sertésbél helyett bőrt használunk, a glükóz oxidáz helyett az egyik membrán részletben 8,3 pH-értéknél 2–3 mg D-aminosav enzimet (E.C.1.4.3.3., Sygma, kristályos), a másik membrán részletben 6,5 pH-értéknél 2–3 mg L-aminosav enzimet (E.C.1.4.3.2., Sygma, IV.) enzimet immobilizálunk. Az érzékelő előállítására vonatkozó lépések értelemszerűen azonosak az 1. példában leírtakkal.

A két funkciós molekula-szelektív érzékelővel aminosavak D és L izomerjeinek egymás melletti szelektív mérésére van lehetőség. A mérést úgy végezzük, hogy a szelektív érzékelőt először a mérni kívánt egyik aminosav pl. fenilalanin L formájából készített standard oldatokkal, aztán a másik aminosavból pl. D-formából készített standard oldatokkal kalibráljuk. A kalibrációt úgy végezzük, hogy az elektródot kevert, foszfát puffer-oldatból (pH = 8) azonos pH-jú állandó intenzitással kevert standard oldatba téve mérjük a –0,6 V polarizáló feszültség hatására létrejött áramintenzitás változást (Δi). A Δi értékeket a standard oldatok koncentrációjának függvényében ábrázolva készítjük el a kalibrációs görbéket, melyek segítségével különböző aminosav minták optikai izomer aránya a Δi mérése után meghatározható.

3. Táblázat

A meghatározandó anyag	A membránban immobilizált		A jelzőelektród
	egyik enzim-fajta	másik enzim-fajta	
inosin	uridin nukleozidáz E.C.3.2.2.2.	xantin oxidáz E.C.1.2.3.2.	platina
adenosin	adenosin nukleozidáz E.C.3.2.2. a.	adenin deamináz E.C.3.5.4.2.	ammóniumion-szelektív vagy hidrogénion- -szelektív
guanosin	guanosin foszforiláz E.C.2.4.2.15.	guanáz E.C.3.5.4.3.	ammóniumion- szelektív vagy hidrogénion- -szelektív
guanin	guanáz E.C.3.5.4.3.	xantin oxidáz E.C.1.2.3.2.	platina
kreatinin	kreatinináz E.C.3.5.3.3.	ureáz E.C.3.5.1.5.	ammóniumion- -szelektív
β -D-glükózidok, diszaharidok, amigdalín, szalicin	β -glükózidáz E.C.3.2.1.21.	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	platina
α -D-glükózidok (pl. maltóz)	α -glükózidáz E.C.3.2.1.20.	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	platina
D-glükóz-1-foszfát	glükóz-1-foszfátáz E.C.3.1.3.10.	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	platina
D-glükóz-6-foszfát	glükóz-6-foszfátáz E.C.3.1.3.9.	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	platina
barbiturát	barbituráz E.C.3.5.2.1.	ureáz E.C.3.5.1.5.	ammóniumion-szelektív vagy hidrogénion- -szelektív

4. Táblázat

A meghatározandó anyag	A membrán egyik rész- letében immobilizált enzim	A meghatározandó anyag	A membrán másik részletében immobilizált enzim
glükóz	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	alkohol	alkohol oxidáz E.C.1.1.3.1.9.
glükóz	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	mannóz	hexóz oxidáz E.C.1.1.3.5.
karbamid	ureáz E.C.3.5.1.5.	kreatinin	kreatinináz E.C.3.5.3.3.
glükóz	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	húgysav	ureáz E.C.3.5.1.5.
glükóz	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	L-fenilalanin	urát oxidáz E.C.1.7.3.3.
karbamid	ureáz E.C.3.5.1.5.	arginin	fenilalanináz E.C.1.14.3.1.
glükóz	glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.	amigdalín	arginin dekarboxiláz E.C.4.1.1.19.
			glükózidáz E.C.3.2.1.21.
			glükóz oxidáz E.C.1.1.3.4.

A példa szerinti összetett szelektív érzékelő használata resolvációs folyamatok hatékonyságának vizsgálata esetében rendkívül előnyös.

Jól alkalmazható az izomer arány meghatározáshoz az 1. példa kapcsán leírt addíciós mérőmódszer is. A 4. példához hasonlóan számos más előnyösen használható találmány szerinti két funkciós molekula-szelektív érzékelő készíthető. Ezekről ad áttekintést a 4. táblázat.

A táblázat második oszlopában az egyik felületi részleten, a harmadik oszlopban a másik felületi részleten immobilizált enzim megnevezése van feltüntetve.

5. példa

Az 5. példában a találmány szerinti, aminosavak egymás melletti szelektív meghatározására alkalmas többfunkciós molekula-szelektív érzékelő példakénti felépítését és előállítási módját ismertetjük.

A többfunkciós érzékelő felépítése hasonló a 4. példában bemutatott két funkciós érzékelőjéhez, az eltérés annyi, hogy 6 gázátjárható filmet nem tartalmaz, továbbá 1 burkoló testben levő 2 elektrolit oldatban három hidrogénion-szelektív üveg 4 jelzőelektród van elhelyezve, amelyekkel érintkező 7 membrán három szeparált részletében más-más szelektív aminosav dekarboxiláz: L-lizin dekarboxiláz, L-tirozin dekarboxiláz, L-fenilalanin dekarboxiláz immobilizált állapotú enzimet tartalmazó reakció-réteg van kiképezve.

Az érzékelő és a reakció-rétegek kialakítása a 4. példában leírtakkal azonos módon történik.

A példaként megvalósított molekula-szelektív érzékelővel aminosav tartalmú minták L-tirozin, L-lizin, L-fenilalanin tartalma határozható meg szelektíven. A meghatározások három, egy-egy aminosavra vonatkozó feszültség-koncentráció kalibrációs görbe felhasználásával valósíthatók meg.

A példaként bemutatott többfunkciós érzékelő mintájára más változatok is készíthetők. Az egyes reakció-réteg mezők az alábbi enzimeket tartalmazó immobilizált állapotban: L-arginin dekarboxiláz, L-glutaminsav-dekarboxiláz, L-glutamin dekarboxiláz, L-hisztidin dekarboxiláz, ureáz.

Szabadalmi igénypontok:

1. Ipari molekula-szelektív érzékelő, amely potenciometriás, voltometriás jelzőelektródot és vonatkozási elektrodot hordozó, nyitott, üreges burkoló testben elhelyezett elektrolit oldatba merülő elektrodtestével, a burkoló test jelzőelektród felőli nyílását lezáró gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható filmmel és a filmmel érintkező meghatározandó komponensre nézve szelektív, kémiai

kötött állapotú enzimet tartalmazó reakció-réteggel, az érzékelő elektrodjaihoz kapcsolódó polarizáló feszültségforrással és áramerősség mérő egységével vagy feszültség mérő egységével alkalmas oldatban jelenlevő molekulák vagy ionok koncentrációjának meghatározására, amelyre az jellemző, hogy a burkoló test (1) jelzőelektród (4) felőli nyílását olyan egy vagy több, folyamatos vagy perforált membrán (7) zár le, amely fehérje alapú természetes hártán vagy inert műanyag filmen vagy fehérjeszerű anyagból vagy inert műanyagból készült hálóban, mint hordozón vagy hordozóban, utóbbiakal kémiai vagy fizikai kötésben levő, vagy hordozó nélküli, műanyag inert térhálójában elhelyezkedő fehérje és/vagy egy vagy több fajta enzim molekulákból felépített, aktív térhálóból áll, a membrán (7) adott esetben gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható filmmel van érintkezésben, továbbá adott esetben a burkoló test (1) és a jelzőelektród (4) teste között szigetelő réteg (11), a burkoló test (1) falában elektrolit átjárható szűrő réteg (12) van elhelyezve.

2. Az 1. igénypont szerinti ipari molekula-szelektív érzékelő, amelyre az jellemző, hogy a membrán (7) inert anyagból készült védőhálával vagy szövetekkel van érintkezésben.

3. Az 1. és 2. igénypont szerinti ipari molekula-szelektív érzékelő, amelyre az jellemző, hogy több jelzőelektródot (4) tartalmaz.

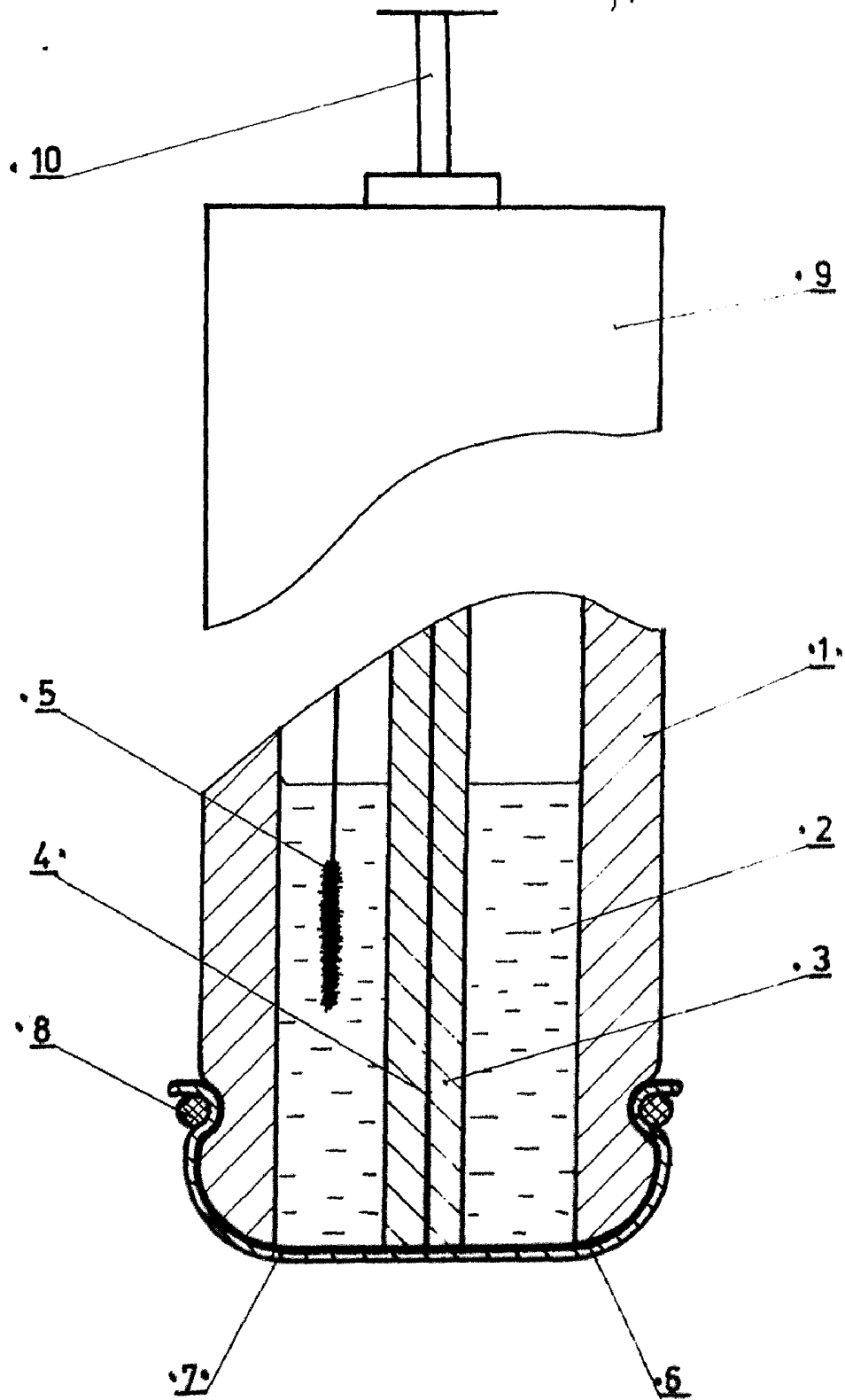
4. Az 1., 2. és 3. igénypont szerinti ipari molekula-szelektív érzékelő, amelyre az jellemző, hogy a membrán (7) adott felületi részletében gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható réteg van kialakítva.

5. Eljárás molekula-szelektív érzékelő előállítására, amelyre az jellemző, hogy fehérje alapú hártán vagy inert műanyag fólia vagy fehérjeszerű anyagból háló vagy inert műanyagból előállított háló hordozón vagy hordozóban, utóbbiakal kémiai vagy fizikai kötésben levő, 1–20 súly % monomert(eket) és/vagy 1–20 súly % polimer(eket) pl. akrilamidet és/vagy polivinilalkoholt,

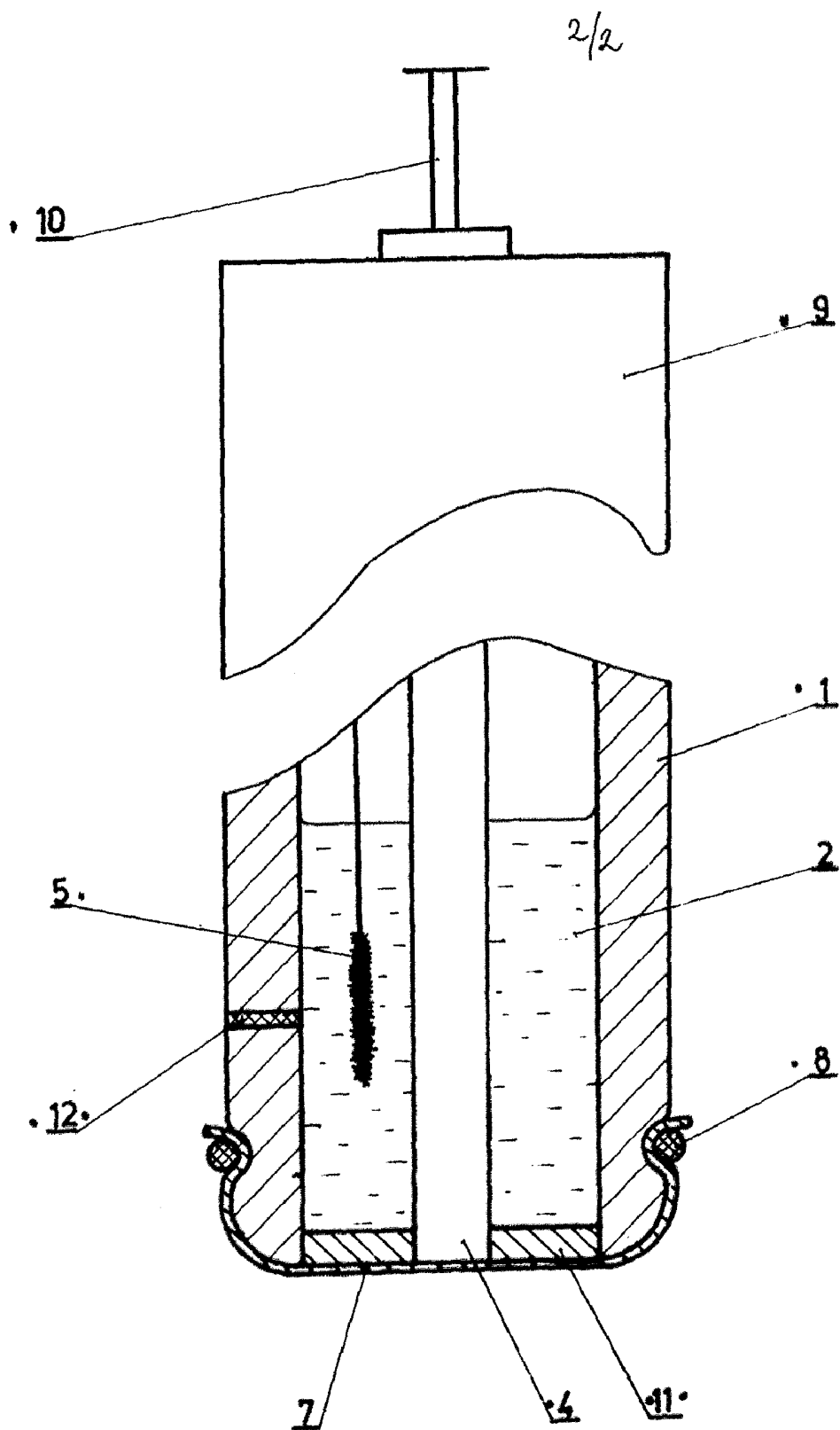
0,1–5 súly % térhálósító anyagot, fém-sót, iniciátort, továbbá 0,01–10 súly % fehérjét és/vagy 0,001–5 súly % enzimet, 0,1–5 súly % térhálósító anyagot, glicerinnal kevert anyagot tartalmazó puffertartalmú oldatok összeöntésével, vagy hordozó nélkül 1–20 súly % akrilamidet és/vagy 1–20 súly % polivinilalkoholt, 0,1–5 súly % térhálósító anyagot, fém-sót, iniciátort, továbbá 0,01–10 súly % fehérjét és/vagy 0,001–5 súly % enzimet, 0,1–5 súly % térhálósító anyagot, glicerinnal kevert anyagot tartalmazó puffertartalmú oldatok összeöntésével immobilizált enzimet tartalmazó membránt alakítunk ki és az immobilizált enzimet tartalmazó membránt, adott esetben gáz vagy gáz és oldott anyag átjárható filmmel együtt, nyitott, üreges test nyílására rögzítjük, az üregben elektrolit oldatot, egy vagy több jelzőelektródot és vonatkozási elektrodot helyezünk el.

2 rajz, 2 ábra

2/1



1. ÁBRA



2.ÁBRA