



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263606

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 27/00

(22) Přihlášeno 11 03 86

(21) PV 1637-86.C

(40) Zveřejněno 16 09 88

(45) Vydáno 14 08 89

(75)

Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc., DOLEŽAL BOHUSLAV doc. ing. CSc.,
PAVLÍČEK ZDENĚK ing. CSc., VOLF RADKO ing. CSc.,
ŠTASTNÝ MILOSLAV ing. CSc., PRAHA, NEPOŽITEK JIRÍ ing. CSc., PROSTĚJOV,
GILAR OLDŘICH ing. CSc., ZDIBY

(54) Enzymový elektrochemický senzor na stanovení alkoholů a způsob jeho
přípravy

Řešení se týká enzymového elektrochemického senzoru na stanovení alkoholů, především ethylalkoholu, obsahujícího detektor kyslíku, na jehož povrchu je fixována vrstva s imobilizovaným enzymem alkoholoxidázou a způsobu jeho přípravy. Stanovení alkoholu se provádí na principu enzymové oxidace katalyzované imobilizovanou alkoholoxidázou v kombinaci s elektrochemickou detekcí ekvivalentní spotřeby kyslíku. Obsahuje-li fixovaná vrstva aldehydové skupiny, imobilizuje se alkoholoxidáza reakcí svých karboxylových skupin nebo aminoskupin a přidanými složkami obsahujícími izonitrilové a karboxylové skupiny a/nebo aminoskupiny, v případě, že obsahuje aminoskupiny, imobilizuje se enzym alkoholoxidáza reakcí svých karboxylových skupin aminoskupinami a přidanými složkami obsahujícími izonitrilové a aldehydové skupiny. Obdobný způsob přípravy je i tehdy, když fixovaná vrstva obsahuje buď karboxylové skupiny nebo izonitrilové skupiny. Enzymový elektrochemický senzor umožňuje rychle a spolehlivě měřit koncentraci alkoholu v technologických vzorcích bez předchozí úpravy analyzované směsi, ve fyziologických roztocích, i v dechu intoxikovaných probantů.

Vynález se týká enzymového elektrotechnického senzoru na stanovení alkoholů na principu jejich enzymové reakce - oxidace katalyzované imobilizovanou alkoholoxidázou v kombinaci s elektrotechnickou detekcí ekvivalentní spotřeby kyslíku a způsobu provedení tohoto enzymového senzoru.

Stanovení primárních alkoholů, především metanolu a etanolu, ale i například n-propanolu, n-butanolu a allylalkoholu je velmi důležité v řadě technologií chemického průmyslu a zvláště v moderních biotechnologiích. V mnoha případech je významné stanovení těchto alkoholů i v surovinách nebo produktech potravinářského průmyslu. Stanovení etanolu je zvláště potřebné a velmi časté i v soudních a klinických toxikologických laboratořích především z důvodu legislativní kontroly při zajišťování bezpečnosti dopravy.

Z uvedených důvodů byla pro stanovení titulních alkoholů vypracována řada postupů chemických, většinou s fotometrickou detekcí, i fyzikálně chemických, z nichž největšího uplatnění doznala plynová chromatografie.

V souvislosti s rozvojem enzymových analytických postupů vyznačujících se vysokou citlivostí, jednoduchostí a specifitou danou vlastní podstatou enzymové katalýzy, byla věnována pozornost též enzymovému stanovení především etanolu. Při tomto stanovení se využívá katalytického účinku alkoholdehydrogenázy (E.C.1.1.1.1), přičemž je nejběžněji množství oxidovaného etylalkoholu sledováno fotometricky na základě ekvivalentní tvorby redukované formy koenzymu nikotinamidadenin dinukleotidu (NADH).

K enzymovému stanovení etanolu je možno použít též alkoholoxidázu, která katalyzuje oxidaci alkoholu přímo kyslíkem, aniž by byla nutná přítomnost koenzymu NAD^+ . Substrátová specifita alkoholoxidázy je však širší, zahrnuje i některé další primární alifatické alkoholy, i když jejich relativní rychlost oxidace je ve srovnání s etanolem výrazně nižší. Této skutečnosti může být na jedné straně využito pro stanovení těchto jednotlivých alkoholů, na druhé straně však může být v některých případech zkreslen výsledek analýzy přítomností kontaminujících alkoholů. Z tohoto hlediska je největší nebezpečí ovlivnění výsledků analýzy přítomností etanolu jako kontaminující složky při stanovení jiných alkoholů. Naopak při stanovení etanolu zvláště ve fyziologických tekutinách, nebo jiných vzorcích fyziologického původu, toto nebezpečí prakticky nepřichází v úvahu.

Průběh enzymové reakce je možno sledovat přímo na základě tvorby nebo spotřeby určité substance, nebo pomocí následných chemických nebo enzymových reakcí vzniklých reakčních produktů. Vedle velmi často používané fotometrie má velký význam spojení enzymové reakce s elektrochemickými čidly detekujícími substráty, produkty nebo jiné látky ovlivňující průběh enzymové reakce.

Použití volných enzymů je spojeno v některých případech s technickými nebo ekonomickými problémy jejich získávání. Z tohoto důvodu je velmi atraktivní jejich fixace v blízkosti elektrochemického čidla, čímž je vytvořen senzor - enzymová elektroda, opakovaně použitelný při stovkách analýz bez jakékoliv spotřeby chemikálií, v některých případech pouze pufry.

Pro stanovení alkoholů byla vypracována příprava enzymové elektrody spočívající v imobilizaci enzymu alkoholoxidázy ve spojení buď s elektrochemickou detekcí vznikajícího peroxidu vodíku, nebo s elektrochemickým stanovením spotřeby kyslíku kyslíkovým článkem Clarkova typu.

S ohledem na stabilitu vytvoření enzymové elektrody je výhodná imobilizace enzymu kovalentní vazbou. Pro přípravu enzymových elektrod je nejčastěji používanou technikou imobilizace prokřížení molekul, případně v kombinaci s jinými enzymy či přidanou bílkovinou pomocí glutaraldehydu.

Tento problém je řešen enzymovým elektrochemickým senzorem na stanovení alkoholů a způ-

sobem jeho přípravy podle vynálezu. Senzor obsahuje detektor kyslíku, na němž je fixována vrstva nebo membrána s imobilizovaným enzymem alkoholoxidázou. Podstatou vynálezu je, že vrstva nebo membrána je tvořena polymerem obsahujícím reaktivní zbytek organické sloučeniny vybraný ze skupiny obsahující aldehydové skupiny, aminoskupiny, karboxylové skupiny nebo izonitrilové skupiny, přes které je na polymer enzym vázán kovalentní vazbou. Způsob přípravy spočívá v tom, že na polymerní vrstvu obsahující aldehydové skupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin nebo aminoskupin a přidanými složkami obsahujícími izonitrilové a karboxylové skupiny a/nebo aminoskupiny, případně v tom, že na polymerní vrstvu obsahující aminoskupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin s aminoskupinami obsaženými v polymerní vrstvě a přidanými složkami obsahujícími izonitrilové a aldehydové skupiny. Dále na polymerní vrstvu se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých aminoskupin s karboxylovými skupinami obsaženými v této vrstvě a přidanými složkami obsahujícími izonitrilové a aldehydové skupiny, nebo na polymerní vrstvu obsahující izonitrilové skupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin nebo aminoskupin a přidanými složkami obsahujícími aldehydové skupiny a/nebo aminoskupiny.

Výhodou enzymového elektrochemického senzoru a způsobu jeho přípravy podle vynálezu je zvýšení jeho stability. Pro některé aplikace senzoru s ohledem na další zvýšení jeho stability je výhodné překrýt vrstvu s imobilizovaným enzymem další membránou propustnou pouze pro nízkomolekulární látky.

Enzymový elektrochemický senzor na stanovení alkoholu podle vynálezu umožňuje rychle a spolehlivě měřit koncentraci alkoholů v technologických vzorcích bez předchozí úpravy analyzované směsi, zvláště výhodný je pro stanovení ethylalkoholu ve fyziologických tekutinách, především plasmě a v dechu intoxikovaných probantů, v rozsahu desetin až stovek promile.

Předmět vynálezu je dokumentován dále uvedenými příklady použití, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d 1

Na terčík z karboxymethylcelulózy byly aplikovány 2 μ l ethylaminu 0,5 mol/dm³, 1 μ l cyklohexylisokyanidu a 150 μ l alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm³ fosfátového pufru pH 7,5. Po šesti hodinách byl terčík s navázanou alkoholoxidázou důkladně promyt 0,1 mol/dm³ fosfátovým pufrem pH 7,5 a poté byl fixován na detektor kyslíku. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven n-butanol s lineární odezvou v koncentračním rozsahu 10⁻⁶ až 10⁻³ mol v dm³.

P ř í k l a d 2

Na terčík z modifikovaného bopolymeru styrenu s glycidylmethakrylátem obsahující izonitrilové skupiny byly aplikovány 2 μ l glutaraldehydu - 0,5 mol/dm³ a 150 μ l alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm³ fosfátovém pufre pH 7,5. Po šesti hodinách byl terčík s navázanou alkoholoxidázou důkladně promyt 0,1 mol/dm³ fosfátovým pufrem pH 7,5 a poté byl fixován na detektor kyslíku. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven n-butanol s lineární odezvou v koncentračním rozsahu 10⁻⁶ až 10⁻³ mol v dm³.

P ř í k l a d 3

Na terčík z modifikovaného bopolymeru styrenu s glycidylmethakrylátem obsahující aldehydové skupiny byly aplikovány 2 μ l kyseliny octové - 0,5 mol/dm³, 1 μ l cyklohexylisokyanidu a 150 μ l alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm³ fosfátového pufru pH 7,5. Po šesti hodinách byl terčík s navázanou alkoholoxidázou fixován na detektor kyslíku a dále překryt membránou z acetátu celulózy propouštějící pouze nízkomolekulární látky. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven ethylalkohol na základě úbytku kyslíku v reakční směsi s lineární odezvou v rozsahu 5.10⁻⁷ až 5.10⁻⁴ mol ethylalkoholu v dm³.

P ř í k l a d 4

Na terčík z porézního skla modifikovaného gama-aminopropyltriethoxysilanem byly aplikovány 2 μ l kyseliny octové - 0,5 mol/dm³, 1 μ l cyklohexylcyanidu a 150 μ l alkoholoxidázy v 0,1 mol/dm³ fosfátového pufru pH 7,5. Terčík byl fixován na detektor kyslíku a dále překryt membránou z acetátu celulózy propouštějící pouze nízkomolekulární látky. Pomocí takto připraveného enzymového elektrochemického senzoru byl stanoven methylalkohol ve vodných roztocích s lineární odezvou v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-7}$ až $4 \cdot 10^{-4}$ mol v dm³.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Enzymový elektrochemický senzor na stanovení alkoholů obsahující detektor kyslíku, na jehož povrchu je fixována vrstva nebo membrána s imobilizovaným enzymem alkoholoxidázou, vyznačující se tím, že vrstva nebo membrána je tvořena polymerem obsahujícím reaktivní zbytek organické sloučeniny vybraný ze skupiny obsahující aldehydové skupiny, aminoskupiny, karboxylové skupiny nebo izonitrilové skupiny, přes které je na tento polymer enzym vázán kovalentní vazbou.

2. Způsob přípravy enzymového elektrochemického senzoru podle bodu 1, vyznačující se tím, že na polymerní vrstvu nebo membránu obsahující aldehydové skupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin nebo aminoskupin a přidáním složkami obsahujícími izonitrilové a karboxylové skupiny a/nebo aminoskupiny.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že na polymerní vrstvu nebo membránu obsahující aminoskupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin s aminoskupinami obsaženými v polymerní vrstvě nebo membráně a přidáním složkami obsahujícími izonitrilové a aldehydové skupiny.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že na polymerní vrstvu nebo membránu obsahující karboxylové skupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých aminoskupin s karboxylovými skupinami obsaženými v polymerní vrstvě nebo membráně a přidáním složkami obsahujícími izonitrilové a aldehydové skupiny.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že na polymerní vrstvu nebo membránu obsahující izonitrilové skupiny se enzym alkoholoxidáza imobilizuje reakcí svých karboxylových skupin nebo aminoskupin a přidáním složkami obsahujícími aldehydové skupiny a/nebo aminoskupiny.