



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 747

(21) PV 1898-89.Z
(22) Přihlášeno 28 03 89

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 06 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 27/40

(75) Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc.,
VRBOVÁ EVA ing., PRAHA (CS),
DIENYS GERVDAS doc. CSc.,
MEIZERAITYTE MEILUTE-BIRUTE, VILNIUS (SU)

(54)

Enzymová elektroda na stanovení oligosacharidů
a glykosidů a způsob její přípravy

(57) Enzymová elektroda určená pro stanovení oligosacharidů a glykosidů obsahujících o-glukosidovou vazbu na povrchu elektrochemického čidla pro stanovení kyslíku obsahují fixovanou vrstvu koimobilizované -glukosidasy, glukosa oxidazy a popřípadě mutarotasy spočívá v tom, že obsahují koimobilizovanou katalasu. Způsob její přípravy spočívá v tom, že se směs 1 až 10 μl o-glukosidasy o aktivitě 0,5 až 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 až 10 μl glukosa oxidasy o aktivitě 0,3 až 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0,5 až 10 μl katalasy o aktivitě 500 až 5000 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ a popřípadě 1 až 15 μl mutarotasy o aktivitě 1 až 10 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ koimobilizuje reakcí s 1 až 10 μl 1 až 5 % glutaraldehydu s 0,1 až 5 μl isokyanidu, například cyklohexylisokyanidu, při 4 °C po dobu 2 až 7 dnů na nylonovou síťku předem aktivovanou parciální hydrolýzou vodným roztokem s 10 až 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové po dobu 2 až 20 minut nebo na kolagenovou membránu předem aktivovanou působením 4 až 6 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ močoviny po dobu 1 až 5 dnů nebo na nativní kolagenovou membránu a potom se nylonová síťka nebo kolagenová membrána s koimobilizovanými enzymy fixuje na povrch elektrochemického čidla na stanovení kyslíku.

Výsledek se týká enzymové elektrody na stanovení oligosacharidů a glykosidů obsahujících α -glukosidovou vazbu a způsobu její přípravy.

Ke stanovení oligosacharidů a glykosidů se vedle různých typů chromatografií doposud v převážné míře používají chemické metody, založené na hydrolyze těchto látek pomocí minerálních kyselin a následující dehydratací uvolněných monosacharidů při zvýšené teplotě a převedením vzniklého derivátu furan-2-karbaldehydu reakcí s aromatickými aminy, fenoly nebo naftoly na barevné kondenzační produkty. Nevýhodou těchto kolorimetrických metod analýzy oligosacharidů a glykosidů je jejich malá specifita, to znamená že výsledky stanovení určitého sacharidu nebo glykosidu mohou být ovlivněny přítomností jiných cukrů nebo obdobně reagujících látek. Především z tohoto důvodu nalézají v analýze sacharidů čím dál větší uplatnění enzymové metody.

Veliká množství využití enzymů v analytické chemii jsou dána vysokou substrátovou specifikou enzymů a dále jejich schopností katalyzovat reakce při velmi nízkých koncentracích substrátů. Enzymové analytické metody umožňují stanovení určitého sacharidu v bohaté směsi ostatních látek bez jeho předchozí izolace nebo zdlouhavé úpravy vzorku před vlastní analýzou.

Pro analytické účely je ideální použití absolutně specifických enzymů, které přeměňují jen jednu jedinou látku sloučeninu. Typickým představitelem těchto enzymů je například glukosa-6-fosfátdehydrogenasa. V analytické chemii se běžně využívá i enzymů se skupinovou specifikou. Tyto enzymy poznají v různých sloučeninách jednu skupinu nebo uskupení atomů těchto sloučeninám společné, které je danými enzymy přeměňováno. Skupinová specifita enzymů nemusí být bezpodmínečně nevýhodou, protože velmi často pracujeme se spřaženými enzymovými reakcemi, kde v celém řetězci může být vysoce specifický jen jeden enzym. V mnoha případech je specifita stanovení i při použití skupinově specifických enzymů dána tím, že analyzovaný vzorek neobsahuje kromě stanovované sloučeniny jiné látky, které by mohly na základě přítomnosti shodné skupiny nebo uspořádání atomů interferovat. Například při stanovení laktosy se v mléčných výrobcích nevyskytují jiné látky s β -D-galaktopyranosidovou vazbou, které by toto stanovení, založené na enzymové hydrolyze laktosy pomocí β -galaktosidasy, rušily.

Pomocí enzymové analýzy je možno získat snadno informace, které jsou jinými metodami dosažitelné jen s vysokou experimentální náročností opět v důsledku nedostatečné specifiky. Jako příklad lze uvést stanovení jednotlivých sacharidů, například D-glukosy, D-galaktosy, D-mannosy, D-fruktosy, laktosy, rafinósy a podobně ve vzorcích, které obsahují tyto sacharidy ve směsích s libovolným zastoupením jednotlivých cukrů nebo cukerných derivátů. Ilustrativní jsou z tohoto hlediska rozdíly ve stanovení redukcí cukrů v hydrolyzátech škrobu nebo dřevní hmoty, obvykle vyjadřovaných v koncentraci D-glukosy, a v enzymovém stanovení skutečného obsahu D-glukosy.

Průběh enzymových reakcí je možno sledovat buď následnými reakcemi, například vzniklých reakčních produktů, nebo s výhodou fyzikálními nebo fyzikálně chemickými metodami. Vedle velmi často používané fotometrie má velký význam spojení enzymových reakcí s elektrochemickými čidly detegujícími substráty, produkty nebo jiné látky ovlivňující průběh enzymových reakcí.

Použití volných enzymů naráží v některých případech na technické nebo ekonomické problémy jejich získávání, obtížnou regeneraci z reakční směsi, poměrně malou stabilitu některých volných enzymů atd. Tyto problémy jsou postupně řešeny náhradou rozpustných enzymů imobilizovanými enzymy použitelnými pro velký počet analýz. Ve spojení s elektrochemickou detekcí jsou získány biosenzory, se kterými je možno provádět analýzy bez spotřeby chemikálií v tzv. bezreagenční analýze. Velkou výhodou těchto biosenzorů je rychlost, přesnost a reprodukovatelnost stanovení a dále možnost analýzy roztoků barevných,

kalných nebo fluoreskujících, kde jsou jiné způsoby detekce obtížné.

Analytická využitelnost biosenzorů je podstatně ovlivněna jejich stabilitou. Tato je potom výrazně závislá na vlastní konstrukci biosenzoru a na druhu imobilizovaného biologického, enzymově aktivního materiálu. V některých případech může být stabilita biosenzoru snižována inhibičním vlivem vedlejších produktů probíhajících enzymových reakcí. U enzymových elektrod na stanovení oligosacharidů založených na enzymové hydrolyze pomocí příslušných glykosidas s následující detekcí vzniklé D-glukosy pomocí glukosooxidasy může být posledně uvedený enzym, v míře závislé na způsobu imobilizace, inhibován vznikajícím peroxidem vodíku.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu biosenzorů je způsob imobilizace enzymů. Imobilizace se nejčastěji provádí zachycením ve struktuře gelu, například polyakrylamidového gelu, želatiny, alginátu a podobně, sorpcí bifunkčními činidly, popřípadě přímou kovalentní vazbou realizovanou některou z imobilizačních technik na přírodní nebo syntetické membrány, které jsou v těsném styku s elektrochemickým čidlem.

Stávající způsoby imobilizace α -glukosidas, glukosooxidasy u enzymové elektrody na stanovení oligosacharidů a glykosidů jsou použité enzymy zachyceny do nevytvrzeného žatatinového gelu, který je nutno při aplikaci na elektrochemické čidlo chránit acetát-celulózovou membránou ze strany roztoku, což vyžaduje složitější způsob přípravy vlastní elektrody.

Tyto nevýhody odstraňuje enzymová elektroda na stanovení oligosacharidů a glykosidů obsahujících α -glukosidovou vazbu jako například maltosy, sacharosy nebo glukopyranosidů s různými aglykony obsahující koimobilizované enzymy α -glukosidasu, glukosaoxidasy, popřípadě také mutarotasy, fixované na povrchu elektrochemického čidla pro stanovení kyslíku spočívá podle vynálezu v tom, že obsahuje koimobilizovanou katalasu. Způsobem podle vynálezu se enzymová elektroda na stanovení oligosacharidů a glykosidů obsahujících α -glukosidovou vazbu připravuje koimobilizací směsí 1 až 10 μl α -glukosidas, o aktivitě 0,5 až 5 $\mu\text{kat}.\text{ml}^{-1}$, 1 až 10 μl glukosaoxidasy o aktivitě 0,3 až 5 $\mu\text{kat}.\text{ml}^{-1}$, 0,5 až 10 μl katalasy o aktivitě 500 až 5 000 $\mu\text{kat}.\text{ml}^{-1}$ a popřípadě 1 až 15 μl mutarotasy o aktivitě 1 až 10 $\mu\text{kat}.\text{ml}^{-1}$ na nylonovou sítku předem aktivovanou parciální hydrolyzou vodným roztokem s 10 až 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové po dobu 2 s až 20 minut nebo na kolagenovou membránu předem aktivovanou působením 4 až 6 $\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ močoviny po dobu 1 až 5 dnů nebo na nativní kolagenovou membránu. Vlastní koimobilizace se podle vynálezu provádí reakcí s 1 až 10 μl 1 až 5 % glutaraldehydu a 0,1 až 5 μl isokyanidu, například cyklohexylisokyanidu, při 4 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 až 7 dnů. Po imobilizaci se nylonová síťka nebo kolagenová membrána s navázanými enzymy fixuje na povrchu elektrochemického čidla na stanovení kyslíku.

Výhodou enzymové elektrody na stanovení oligosacharidů a glykosidů obsahujících α -glukosidovou vazbu podle vynálezu je jednoduchost provedení, vysoká stabilita získaného biosenzoru, dostatečně rychlá odezva a šíře lineární odezvy biosenzoru v závislosti na koncentraci oligosacharidu nebo α -glukosidu v analyzovaném vzorku. Enzymová elektroda podle vynálezu rozkládá vznikající peroxid vodíku a zabráňuje inhibici ostatních přítomných enzymů.

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

Příklad 1

Nylonová síťka byla ponořena na 2 s do vodného roztoku s 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové a potom byla ihned promyta vodou a 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0. Na takto aktivovanou síťku bylo aplikováno 5 μl α -glukosidas o aktivitě 2,5 $\mu\text{kat}.\text{ml}^{-1}$, 5 μl glu-

glukosa oxidasy o aktivitě 3 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 5 μl katalasy o aktivitě 2 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 5 μl 2,5 % glutaraldehydu a 1 μl cyklohexylisokyanidu. Po 4 dnech stání při 4 °C byla síťka promyta 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,0 a potom byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

Příklad 2

Na nylonovou síťku aktivovanou 20 minutovým působením 10 % hmot. kyseliny chlorovodíkové bylo po jejím promytí vodou a 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0 aplikováno 10 μl α -glukosidasy o aktivitě 0,5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 μl glukosa oxidasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0,5 μl katalasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 10 μl mutarotasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 μl 5 % glutaraldehydu a 0,1 μl cyklohexylisokyanidu. Po 5 dnech reakce při 4 °C byla síťka s koimobilizovanými enzymy promyta 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0 a poté byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

Příklad 3

Kolagenová membrána byla podrobena 24 h působení 6 M močoviny. Potom byla promyta vodou a 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0. Na částečně vysušený povrch membrány bylo aplikováno 10 μl α -glukosidasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 μl glukosa oxidasy o aktivitě 1 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 10 μl katalasy o aktivitě 500 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 10 μl 1 % glutaraldehydu a 5 μl cyklohexylisokyanidu. Po 48 h působení při 4 °C byla membrána důkladně promyta 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,0 a potom byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

Příklad 4

Na nativní kolagenovou membránu byl aplikován 1 μl α -glukosidasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 2 μl glukosa oxidasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0,5 μl katalasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 μl mutarotasy o aktivitě 10 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 μl 5 % glutaraldehydu a 5 μl 20 % hmot. roztoku γ -dimethylaminopropylisokyanidu. Po 7 denním působení při 4 °C byla membrána s koimobilizovanými enzymy promyta 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,0 a potom byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Enzymová elektroda na stanovení oligosacharidů a glykosidů, obsahujících α -glukosidovou vazbu jako například jsou maltosy, sacharosy nebo glukopyranosidy s různými aglykony, které na povrchu elektrochemického čidla pro stanovení kyslíku obsahují fixovanou vrstvu koimobilizované α -glukosidasy, glukosa oxidasy a popřípadě mutarotasy, vyznačující se tím, že obsahují koimobilizovanou katalasu.
2. Způsob přípravy enzymové elektrody podle bodu 1, vyznačující se tím, že se směs 1 až 10 μl α -glukosidasy o aktivitě 0,5 až 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1 až 10 μl glukosa oxidasy o aktivitě 0,3 až 5 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0,5 až 10 μl katalasy o aktivitě 500 až 5 000 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ a popřípadě 1 až 15 μl mutarotasy o aktivitě 1 až 10 $\mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ koimobilizuje reakcí s 1 až 10 μl 1 až 5 % glutaraldehydu a 0,1 až 5 μl isokyanidu, například cyklohexylisokyanidu, při 4 °C po dobu 2 až 7 dnů na nylonovou síťku předem aktivovanou parciální hydrolýzou vodným roztokem 10 až 25 % hmot. kyselinou chlorovodíkovou po dobu 2 s až 20 minut nebo na kolagenovou membránu předem aktivovanou působením 4 až 6 mol. $\cdot \text{dm}^{-3}$ močoviny po dobu 1 až 5 dnů nebo na nativní kolagenovou membránu a potom se nylonová síťka nebo kolagenová membrána s koimobilizovanými enzymy fixuje na povrch elektrochemického čidla na stanovení kyslíku.