

Elektrody enzymatyczne

Henryk Sugier

Instytut Podstaw Chemii Żywności
Politechnika Łódzka

1. Budowa, działanie i klasyfikacja elektrod

Elektrody enzymatyczne stanowią najwcześniejszą opracowaną i najważniejszą grupę czujników enzymatycznych o dużych perspektywach i możliwościach zastosowań, zwłaszcza w diagnostyce medycznej, biotechnologii i ochronie środowiska naturalnego. Są to układy złożone z odpowiedniego (dla oznaczanego substratu) enzymu, immobilizowanego w bezpośredniej bliskości elektrody, czulej na dany substrat ewentualnie współsubstrat lub produkt reakcji katalizowanej enzymem. Zmiany stężenia elektrochemicznie aktywnego reagenta, będące miarą stężenia oznaczanego substratu, ujawniają się w zmianach sygnału elektrycznego elektrody. Elektroda wskaźnikowa jest tu przetwornikiem zmian chemicznych. Elektroda odniesienia jest zazwyczaj zablokowana z elektrodą wskaźnikową w tej samej obudowie. Dla uproszczenia taki kompletny układ dwu zablokowanych elektrod z immobilizowanym enzymem w pobliżu elektrody wskaźnikowej przyjęło się nazywać „elektrodą enzymatyczną”. Zalety elektrod enzymatycznych wynikają z połączenia dwóch zasadniczych cech: specyficzności substratowej enzymu oraz precyzji, prostoty i szybkości pomiaru sygnału elektrycznego elektrody.

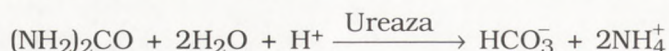
W zależności od tego, czy parametrem pomiarowym jest potencjał elektryczny elektrody wskaźnikowej czy natężenie prądu, elektrody enzymatyczne dzielimy na potencjometryczne i prądowe. Potencjometryczne elektrody enzymatyczne budowane są z udziałem elektrod jonoselektywnych, takich jak szklana elektroda czuła na jony amonowe lub wodorowe. Potencjał elektryczny (E) takiej elektrody liniowo zależy od logarytmu aktywności lub w przybliżeniu, od stężenia elektrochemicznie aktywnych jonów ($/S^+ /$), zgodnie z równaniem Nernsta:

$$E = E_{\text{ref}} + \frac{RT}{F} \ln[S^+] \quad (1)$$

gdzie: E_{ref} — stała zawierająca potencjał normalny i potencjał elektrody odniesienia, R — stała gazowa, T — temperatura, F — stała Faradaya.

Pierwszą elektrodę tego typu do oznaczenia stężenia mocznika w roztworze stanowiła szklana elektroda na jony NH_4^+ pokryta warstewką poliakryloamidu o grubości 60 – 350 μm , zawierającą enzym, ureazę (1) (1969).

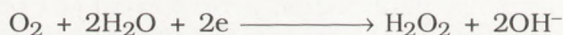
Mocznik z badanego roztworu dyfunduje do warstewki unieruchomionej ureazy zanurzonej elektrody i tu pod wpływem enzymu ulega hydrolizie.



Powstające jony NH_4^+ , których stężenie jest miarą stężenia oznaczanego mocznika, określają potencjał elektrody. Złożone warunki reakcji i zjawisk dyfuzyjnych w warstewce zawierającej enzym powodują, że zakres liniowej zależności potencjału elektrody E od logarytmu stężenia mocznika ogranicza się do kilku dekad, zaś współczynnik nachylenia prostej odbiega od teoretycznej wartości RT/F i w tym przypadku jest mniejszy. Tak zatem, dla danej elektrody należy zawsze wyznaczyć krzywą kalibracji, stosując serię roztworów wzorcowych.

Pehametryczną elektrodę szklaną wraz z elektrodą odniesienia i roztworem elektrolitu w jednej obudowie jest korzystnie oddzielić cienką hydrofobową membraną od roztworu zewnętrznego, zawierającego oznaczany substrat. Membrana taka wykonana np. z teflonu, polipropylenu lub polietylenu przepuszcza tylko gazowy produkt reakcji enzymatycznej (NH_3 lub CO_2), co zwiększa selektywność elektrody (2).

W elektrodzie prądowej miarą stężenia oznaczanego substratu jest natężenie prądu elektrycznego płynącego w obwodzie elektrody. Najważniejszą elektrodą tego typu stanowi tlenowa elektroda Clarka (3) i jej odmiany. Jest ona zbudowana z katody platynowej, chlorosrebrowej (Ag , AgCl) elektrody odniesienia i elektrolitu wewnętrznego (roztwór KCl). Całość zostaje zamknięta hydrofobową membraną przylegającą do płaskiego czoła elektrody Pt . Elektroda platynowa jest spolaryzowana napięciem zewnętrznym do potencjału ok. $-0,6\text{V}$ (charakterystyka prądowo-napięciowa wykazuje plateau (w zakresie $-0,4$ $-(-0,8)$ V), przy którym tlen dyfundujący przez membranę z zewnętrznego roztworu jest redukowany.



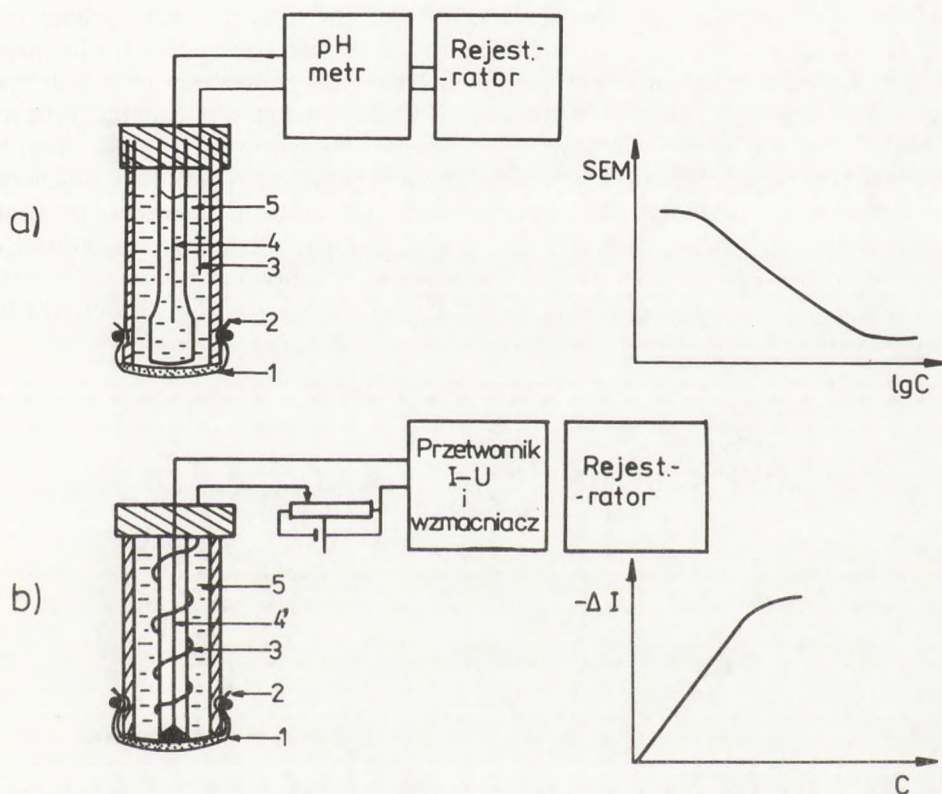
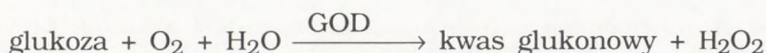
Na elektrodzie odniesienia Ag , AgCl zachodzi sprzężona reakcja utlenienia:



Natężenie powstającego w ten sposób prądu elektrycznego jest proporcjonalne do strumienia tlenu dyfundującego przez membranę, ten zaś jest proporcjonalny do ciśnienia O_2 w roztworze zewnętrznym.

Oprócz opisanej tzw. polarograficznej elektrody tlenowej, zostały opracowane również elektrody galwaniczne, nie wymagające polaryzacji z zewnątrz. Potencjał elektryczny katody, przy którym zachodzi redukcja O_2 pochodzi z wytwarzanej siły elektromotorycznej ogniwa. Katoda w tych ogniwach jest najczęściej wykonana ze srebra, anodę zaś mogą stanowić metale: Pb , Zn , Al , Cd .

Enzymatyczną elektrodę amperometryczną na bazie elektrody tlenowej można otrzymać, jeżeli zewnętrzna powierzchnia membrany zostaje pokryta warstwą zawierającą immobilizowany enzym typu oksydazy lub reduktazy. Pierwsza i najszlachetniejsza zbadana elektroda do oznaczania glukozy została zbudowana z tlenowej elektrody Clarka, na którą naniesiono warstwą żelę, zawierającą immobilizowaną oksydazę glukozową (GOD) (4). Elektroda taka zanurzona do mieszanego roztworu wodnego nie zawierającego glukozy, daje prąd elektryczny o natężeniu proporcjonalnym do stężenia wolnego tlenu w roztworze i warstwie żelowej. Wówczas gdy do roztworu zostaje wprowadzona glukoza, to dyfunduje ona do warstwy żelowej i ulega utlenieniu pod wpływem enzymu:

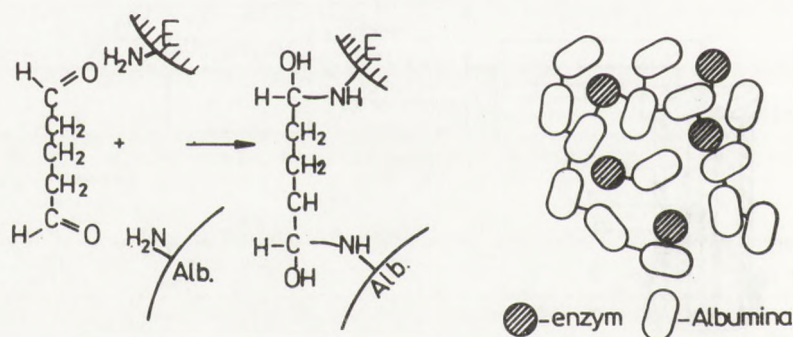


Rys. 1. Budowa i krzywe kalibracji elektrody enzymatycznej; a) potencjometrycznej, b) amperometrycznej; 1 — warstewka immobilizowanego enzymu, 2 — hydrofobowa membrana, 3 — elektroda odniesienia, 4 — elektroda pehametryczna, 4' — spolaryzowana elektroda platynowa, 5 — roztwór elektrolitu wewnętrznego.

Następuje zmniejszenie stężenia tlenu w warstewce i tym samym zmniejszenie strumienia O_2 do katody, a zatem zmniejszanie natężenia prądu — ΔI . Jest ono miarą stężenia oznaczanej glukozy w roztworze zewnętrznym — $\Delta I = f(C_{gluk.})$. Ogólną zasadę budowy i działania enzymatycznej elektrody potencjometrycznej (a) i amperometrycznej polarograficznej (b) pokazano na rys. 1.

2. Immobilizacja enzymu na elektrodzie

Do unieruchomienia enzymu na membranie elektrody można stosować różne znane metody fizyczne i chemiczne (5). Najprostsza z nich jest nałożenie częściowo zamrożonej pasty enzymu na membranę i szczelne przykrycie jej (zamknięcie) błoną celofanową do dializy. Inna fizyczna metoda polega na „zamknięciu” cząsteczek enzymu w żelu poliakrylamidowym. Takie metody nie zabezpieczają całkowicie przed wypłukiwaniem enzymu. Pod tym względem lepsze są metody chemiczne. Jedną z najprostszych i najczęściej używanych polega na kowalencyjnym wiązaniu enzymu z grupami funkcyjnymi nośnika, np. albuminy surowicy wołowej (BSA) za pośrednictwem aldehydu glutarowego (rys. 2). Aldehyd glutarowy tworząc wiązania między grupami aldehydowymi a grupami aminowymi cząsteczek enzymu oraz białka nośnika, wytwarza nierozpuszczalną warstewką żelową. Dla polepszenia właściwości mechanicznych i przylegania do hydrofobowej membrany, świeżo przygotowany w odpowiednich proporcjach, roztwór buforu, albuminy, enzymu i aldehydu glutarowego nanosi się na membranę z umocowaną na niej siatką nylonową. Następuje usieciowanie żelu, a ewentualny nadmiar aldehydu jest wypłukiwany.



Rys. 2. Wiązanie chemiczne enzymu z cząsteczkami białkowego nośnika za pośrednictwem aldehydu glutarowego.

3. Zależność sygnału elektrody prądowej od stężenia substratu

W enzymatycznych elektrodach amperometrycznych prąd powstaje w wyniku zaistnienia dwóch kolejnych procesów:

- 1) dyfuzji substratu do warstwy enzymu,
- 2) reakcji enzymatycznej.

Procesem kontrolującym i określającym zależność prądu stacjonarnego od stężenia oznaczanego substratu w roztworze jest najwolniejszy etap. Współczynnik obciążenia enzymem warstwy enzymatycznej, f_E (6) stanowi jego ilościowe kryterium:

$$f_E = \frac{k_2 [E] X^2}{K_m D}$$

gdzie: k_2 — stała szybkości rozpadu kompleksu enzym — substrat na enzym i produkt reakcji, $[E]$ — stężenia enzymu w warstwie, X^2 — grubość warstwy enzymatycznej, K_m — stała Michaelisa, D — współczynnik dyfuzji substratu w warstwie.

Dla małych wartości $f_E < 1$, reakcja enzymatyczna jest kontrolującym procesem. Zależność prądu stacjonarnego od stężenia substratu jest wówczas zgodna z równaniem kinetyki enzymatycznej, w najprostszej formie — Michaelisa — Menten. Dla większych wartości współczynnika $f_E > 10$, procesem ograniczającym jest dyfuzja substratu. Konsekwencją jest liniowa zależność prądu stacjonarnego od stężenia oznaczanego substratu w roztworze, o ile nie ma ograniczeń, np. w niedostatecznej ilości drugiego współsubstratu.

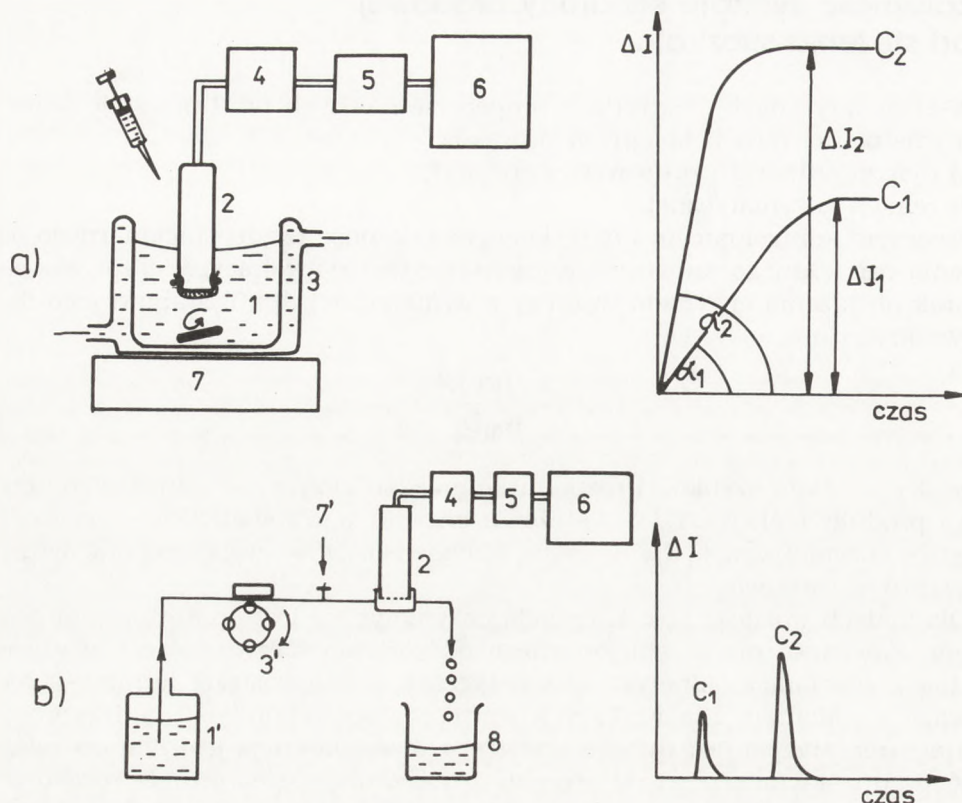
4. Metodyka pomiarów

Pomiary stężenia substratu za pomocą elektrody enzymatycznej można dokonywać w dwóch wersjach eksperymentalnych (rys. 3) w układach:

- a) zanurzeniowym,
- b) przepływowym.

W układzie zanurzeniowym wykalibrowaną elektrodę zanurza się do dobrze mieszanego roztworu oznaczanego substratu lub do roztworu buforowego, do którego wprowadza się następnie określoną objętość roztworu próbki. Odczytu dokonuje się po ustaleniu się natężenia prądu stacjonarnego. Zmiana stacjonarnej wartości prądu w stosunku do jego wartości w nieobecności próbki ΔI , jest miarą stężenia oznaczanego substratu. Wówczas gdy czas ustalania się prądu jest zbyt długi, jako miarę stężenia można przyjąć początkową szybkość zmian prądu dI/dt .

W układzie przepływowym, małą objętość $V < 0,5$ ml badanej próbki wprowadza się do strumienia przepływającego roztworu nośnego, który transportuje ją do elektrody i na zewnątrz. Krótki czas kontaktu próbki z elektrodą



Rys. 3. Układy pomiarowe oraz sygnały elektryczne elektrody amperometrycznej (przy dwóch różnych stężeniach substratu C_1 i C_2); a) w metodzie zanurzeniowej, b) w metodzie przepływowej; 1 — roztwór z oznaczanym substratem, 1' — buforowy roztwór nośny, 2 — elektroda, 3 — termostatowane naczyniśko, 3' — pompa perystaltyczna, 4 — potencjostat do polaryzacji elektrody wskaźnikowej, 5 — przetwornik prąd-napięcie i wzmacniacz, 6 — rejestrator, 7 — mieszadło magnetyczne, 7' — wprowadzenie próbki, 8 — zbiornik zużytego roztworu.

nie pozwala na osiągnięcie sygnału o stacjonarnej, maksymalnej wartości, ale jednocześnie skraca znacznie czas trwania sygnału. Umożliwia to osiągnięcie dużej szybkości oznaczeń seryjnych.

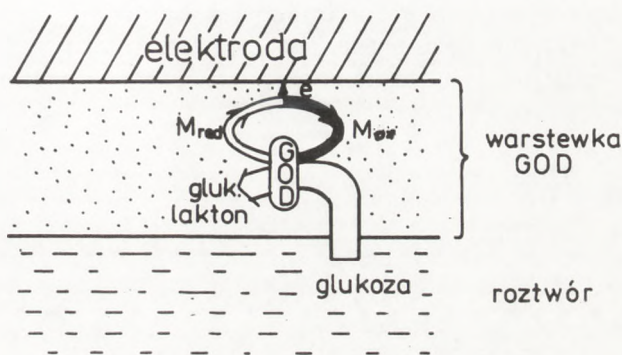
5. Mediatorzy przejść elektronowych

W enzymatycznych reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych do utlenienia lub redukcji danego substratu potrzebny jest drugi reagent, współsubstrat, który gdy występuje w niedostatecznej ilości, ogranicza zakres oznaczanych stężeń. Przykładem może być oznaczanie glukozy przez pomiar tlenu zużytego w reakcji utleniania. Ograniczenie to można rozwiązać przez zastąpienie tlenu innym utleniaczem, np. benzochinonem lub odpowiednim małowcząsteczko-

wym związkami, mediatorem, który pośredniczy w przekazywaniu elektronów między enzymem a elektrodą, a przy tym nie ulega zużyciu (rys. 4). Role takich mediatorów dobrze spełniają ferroceny i ich pochodne Fcpc_2R , zawierające żelazo ulegające łatwo utlenieniu i redukcji: $\text{Fe}^{+3} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{+2}$. Mediator taki nanosi się z odpowiednim enzymem (np. z GOD) na elektrodę, najłatwiej na węglową. Na elektrodzie glukozowej (7) zachodzą następujące procesy:

- 1) $\text{glukoza} + \text{GOD}_{\text{ox}} \longrightarrow \text{glukonolakton} + \text{GOD}_{\text{red}}$,
- 2) $\text{GOD}_{\text{red}} + 2 \text{Fcpc}_2\text{R}^+ \longrightarrow \text{GOD}_{\text{ox}} + 2 \text{Fcpc}_2\text{R} + 2\text{H}^+$,
- 3) $2 \text{Fcpc}_2\text{R} \longrightarrow 2 \text{Fcpc}_2\text{R}^+ + 2e$.

W etapie 3 mediator oddaje elektrony elektrodzie i w formie utlenionej ponownie wchodzi w reakcję 2. Tak jak widać nie jest już potrzebny tlen, a zakres liniowej zależności prądu elektrody od stężenia glukozy rozciąga się tu do 30 mmol/dm^3 . Na tej samej zasadzie zastosowania mediatora można oznaczać szereg innych substancji, np. metanol, tlenek węgla, galaktozę, NADH (8).



Rys. 4. Schemat działania mediatora M w procesie enzymatycznego utleniania glukozy.

6. Elektrody multienzymatyczne

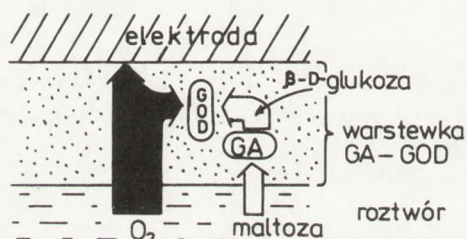
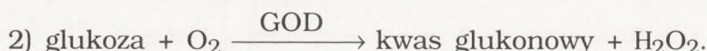
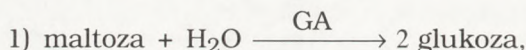
Elektrody zawierające jeden tylko enzym immobilizowany w warstwie przylegającej do jej czoła mają ograniczony zakres zastosowań, ponieważ często substraty lub produkty reakcji enzymatycznej nie są czynne elektrochemicznie i nie wytwarzają sygnału elektrycznego. Dwa lub kilka enzymów wspólnie immobilizowanych na elektrodzie znacznie rozszerzają ten zakres. Mogą one działać szeregowo, gdy elektrochemicznie nieaktywny produkt powstający z udziałem pierwszego enzymu staje się substratem reakcji z następnym enzymem, produkt drugiej reakcji substratem trzeciej z udziałem trzeciego enzymu itd., aż do pojawienia się związku wywołującego sygnał elektryczny elektrody. W innych przypadkach enzymy działają równolegle, konkurując o jeden substrat. Mogą też tworzyć sprzężoną ze sobą parę powodującą wielokrotną recykulację tych samych cząsteczek $\text{A} \rightleftharpoons \text{P}$ wzmacniając w ten sposób sygnał. Wreszcie enzymy immobilizuje się w oddzielnych, nałożonych na siebie warstwach. W ten sposób pierwsza warstwka od strony badanego roztworu może być warstwą antyinterferencyjną, gdy enzym w niej

zawarty usuwa jakiś związek przeszkadzający w oznaczaniu interesującego nas substratu.

Działanie elektrod multienzymatycznych będących pochodnymi dobrze poznanych elektrod glukozowych zostanie zilustrowane na kilku przykładach.

6.1. Elektroda z immobilizowaną oksydazą glukozową (GOD) i glukoamylazą (GA)

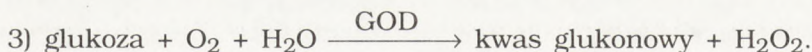
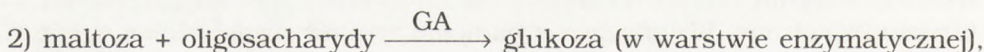
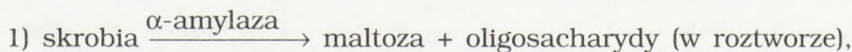
Elektroda może służyć do oznaczania glukozy, maltozy oraz wielocukrów ulegających hydrolizie pod wpływem GA. Maltoza lub inne cukry złożone dyfundują do warstwy enzymów i ulegają hydrolizie z wytworzeniem cząsteczek β -D-glukozy (11), które reagują pod wpływem oksydazy glukozowej z tlenem zmniejszając jego strumień do elektrody i tym samym natężenie prądu elektrody. To zmniejszenie — ΔI jest miarą stężenia oznaczanego w roztworze substratu. Schematycznie, następujące po sobie reakcje z udziałem GA i GOD pokazano na rys. 5.



Rys. 5. Schemat oznaczania maltozy w roztworze za pomocą elektrody z immobilizowanymi enzymami GA i GOD, działającymi sekwencyjnie.

Elektroda taka może służyć także do oznaczania aktywności glukoamylazy lub α -amylazy. W tym celu elektrodę zanurza się do roztworu buforowego zawierającego skrobię w zakresie stężeń odpowiednich dla reakcji hydrolizy skrobi zerowego rzędu $C_S \gg K_M$. Po ustaleniu się prądu elektrody, do roztworu wprowadza się określoną objętość roztworu enzymu i mierzy szybkość zmian natężenia prądu elektrody. Szybkość ta liniowo zależy od aktywności enzymu hydrolizującego skrobię i jest miarą tej aktywności (9,10). Se-

kwencja reakcji w tych oznaczeniach jest następująca:

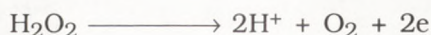


Z ostatniej reakcji wynika, że szybkość zmiany natężenia prądu może być związana z szybkością wyczerpywania się tlenu w warstwie enzymatycznej,

albo z szybkością produkcji nadtlenu wodoru. W tym ostatnim przypadku należy:

1) umożliwić dostęp H_2O_2 do platynowej elektrody, co można osiągnąć przez zastąpienie hydrofobowej membrany oddzielającej warstwę enzymatyczną od elektrody błoną, np. celofanową, przepuszczalną dla H_2O_2 .

2) spolaryzować elektrodę wskaźnikową do potencjału rozkładu H_2O_2 zgodnie z reakcją:

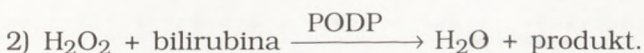
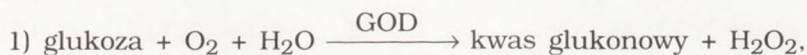


który wynosi +0,6 V (11).

Należy zauważyć, że zastąpienie membrany hydrofobowej — hydrofilową, nie przeszkadza praktycznie w funkcjonowaniu elektrody glukozowej w oparciu o zużywanie O_2 na elektrodzie wskaźnikowej spolaryzowanej ujemnie do potencjału — 0,6 V (11).

6.2. Elektroda z oksydazą glukozową (GOD) i peroksydazą (POD)

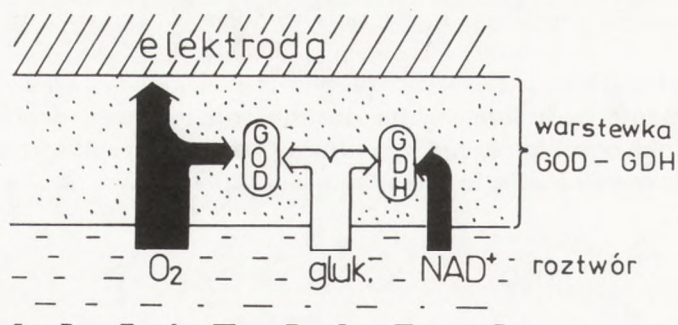
Elektroda z GOD i POD ma zastosowanie do oznaczania bilirubiny — jednego z substratów peroksydazy (12). Elektrodę zanurza się do buforowanego roztworu glukozy o stężeniu 10 mmol/dm³. Po ustaleniu się prądu dodatnio spolaryzowanej (+0,6 V) elektrody wskaźnikowej wprowadza się małą objętość ok. 50 μ l roztworu bilirubiny. Glukoza i bilirubina dyfundują do warstewki enzymatycznej, gdzie kolejno zachodzą reakcje:



Glukoza użyta w tym przypadku służy do wytworzenia w reakcji 1 elektrochemicznie aktywnego współsubstratu bilirubiny jakim jest H_2O_2 . Ze względu na duże stężenie glukozy tlen w warstewce ulega całkowitemu wyczerpaniu i przekształceniu w H_2O_2 . Stężenie H_2O_2 maleje w reakcji 2 proporcjonalnie do stężenia oznaczanej bilirubiny i w tym stopniu maleje natężenie prądu elektrody.

6.3. Elektroda z immobilizowanymi, współzawodniczącymi enzymami: oksydazą glukozową (GOD) i dehydrogenazą glukozową (GDH)

Bienzymatyczna elektroda GOD i GDH może być wykorzystana do oznaczenia stężenia koenzymu GDH, tzn. NAD^+ (11). Elektroda reagująca na tlen, przy polaryzacji — 0,6 V elektrody wskaźnikowej jest zanurzona do buforo-

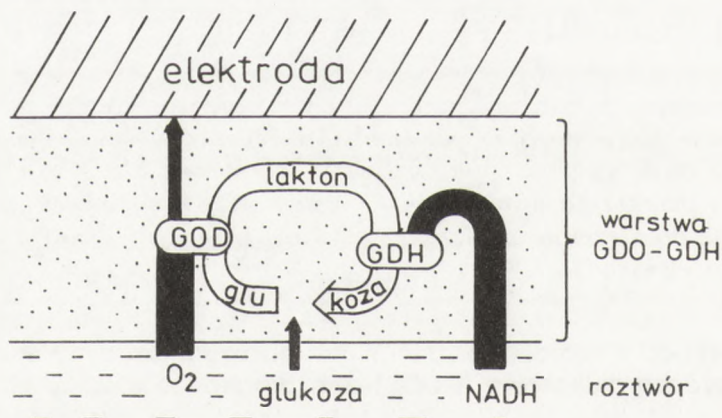


Rys. 6. Schemat oznaczania glukozy za pomocą równoległe i konkurencyjnie działających enzymów GOD i GDH.

wanego roztworu glukozy 1 mmol/dm^3 . Po ustaleniu się natężenia prądu, do roztworu dodaje się próbkę oznaczanego roztworu NAD^+ włączając GDH do konkurencji o glukozę (rys. 6). Na tej samej zasadzie współzawodnictwa o wspólny substrat, tj. glukozę, między enzymami GOD i heksokinazą zbudowano elektrodę do oznaczania stężenia ATP w roztworze (10).

6.4. Elektroda ze współimmobilizowanymi enzymami GOD i GDH

Elektroda już opisana może być zastosowana w układzie recyrkulacji cząsteczek glukozy między sprzężonymi enzymami. Produkt utleniania glukozy tlenem przez GOD, glukonolakton, jest z powrotem zredukowany do glukozy działaniem GDH, z wykorzystaniem koenzymu $NADH$ (11) (rys. 7). Taka wielokrotna recyrkulacja tych samych cząsteczek glukozy powoduje duże zużycie tlenu, dużą zmianę natężenia prądu, a zatem wzmocnienie sygnału elektrody.

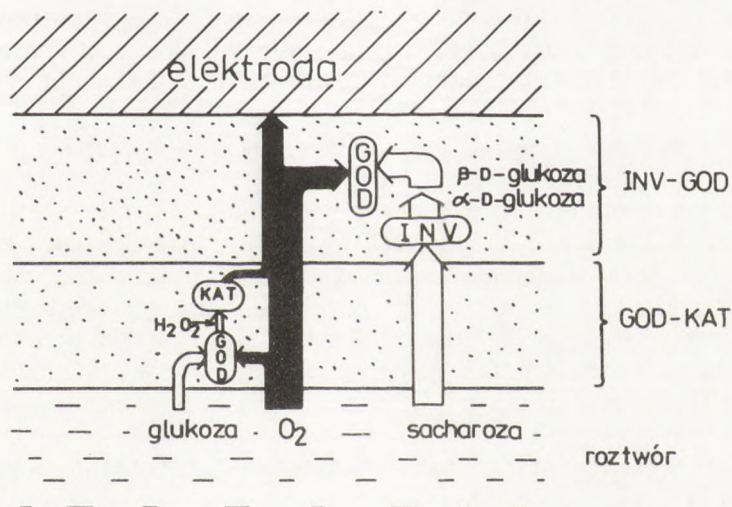


Rys. 7. Schemat oznaczania glukozy ze wzmocnieniem za pomocą sprzężonych enzymów GOD i GDH.

Wypadkową reakcją cyklu jest utlenienie NADH do NAD⁺. Elektroda może zatem służyć do oznaczenia bardzo małych ilości glukozy, bądź do oznaczania NADH w roztworze. Osiągnięta granica detekcji glukozy wynosiła 0,8 $\mu\text{mol}/\text{dcm}^3$ (11).

6.5. Elektroda z warstwą antyinterferencyjną

W oznaczaniu interesującego nas substratu mogą przeszkadzać pewne związki, będące również substratami, albo też inhibitory czy aktywatory enzymów zastosowanych do oznaczenia. Problem ten można rozwiązać przez nałożenie warstwy osłaniającej, zawierającej enzymy przekształcające związki przeszkadzające na nie przeszkadzające. Z chwilą gdy chcemy oznaczać np. stężenie sacharozy w sokach pitnych, w soku z buraka cukrowego itp. za pomocą elektrody zawierającej immobilizowaną β -fruktofuranosydazę (inwertazę, INV) i GOD, to obecna w roztworze glukoza przeszkadza, zawyżając wyniki. Obecność drugiej, zewnętrznej warstwy zawierającej immobilizowaną GOD i katalazę (KAT) eliminuje przeszkadzającą glukozę, nie dopuszczając jej do warstwy pierwszej (rys. 8). Eliminacja ta jest skuteczna aż do stężenia glukozy, wynoszącego 2 mmol/dm^3 (11). W ten sposób można oznaczać także maltozę, skrobię, α -amylazę (11).



Rys. 8. Schemat oznaczania sacharozy w obecności glukozy. Zewnętrzna warstewka immobilizowanych enzymów GOD i KAT nie dopuszcza glukozy do warstewki wewnętrznej INV-GOD.

TABELA 1
WYBRANE PRZYKŁADY ELEKTROD ENZYMATYCZNYCH I ICH CHARAKTERYSTYKA

| Substrat | Elektroda | Trwałość | Zakres pomiaru mol/dm ³ | Litera- tura |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------|--|-----------------|
| mocznik | gazowa (NH ₃) | > 4 mies. | 5 · 10 ⁻² do 5 · 10 ⁻⁵ | (17) |
| glukoza | Pt (H ₂ O ₂) | > 14 mies. | 2 · 10 ⁻² do 10 ⁻⁴ | (18) |
| kwas mlekowy | Pt | < 1 tydz. | 2 · 10 ⁻³ do 10 ⁻⁴ | (19) |
| penicylina | pH | 1 – 2 tyg. | 10 ⁻² do 10 ⁻⁴ | (20) |
| kwas moczowy | Pt (O ²) | 4 mies. | 10 ⁻² do 10 ⁻⁴ | (17) |
| L-aminokwasy ogólnie | Pt | 4 – 6 mies. | 10 ⁻³ do 10 ⁻⁵ | (21) |
| kreatynina | gazowa NH ₃ | – | 10 ⁻² do 7 · 10 ⁻⁵ | (22) |
| etanol | Pt (O ₂) | 4 mies. | do 5 mg% | (23) |

7. Elektrody z materiałem biologicznym

Niektóre tkanki zwierzęce, roślinne, bakterie są szczególnie bogatym źródłem określonych enzymów. Bezpośrednie nałożenie takiego materiału na elektrodę potencjometryczną, czułą na gazowy amoniak lub dwutlenek węgla, może zastąpić immobilizację czystego, wyizolowanego enzymu zwłaszcza w oznaczaniu aminokwasów.

Arnold i Rechnitz (1980) (13) dokonali porównania parametrów elektrody do oznaczania glutaminy w roztworze stosując immobilizowaną, homogenną glutaminazę, żywe komórki szczepu *Sarcina flava*, mitochondrialną frakcję z nerki i skrawki tejże nerki wieprzowej. Materiał biologiczny zamykano na elektrodzie błoną do dializy. Podstawą oznaczenia była reakcja zachodząca:



z wydzieleniem amoniaku określającego potencjał elektrody. Okazało się, że najgorsze parametry, z wyjątkiem selektywności, miała elektroda z homogennym enzymem, zaś najlepsze — elektroda z cienkim, o grubości 0,1 – 0,3 mm skrawkiem nerki. O ile np. trwałość pierwszej elektrody wynosiła dzień, to trwałość drugiej — 30 dni. Selektywność elektrody z tkanką nerkową okazała się bardzo dobra. Jedynie asparagina dawała niewielki sygnał zakłócający, praktycznie natomiast żadnego: mocznik, alanina, arginina, histydyna, walina, seryna, kwas asparaginowy. Zaletami elektrod z wycinkami tkanki oprócz dobrej trwałości jest także stosunkowo łatwa dostępność, mały koszt, prostota ich przygotowania. Wzrasta zatem zainteresowanie takimi elektrodami, trwają poszukiwania odpowiednich materiałów zwierzęcych i roślinnych, którymi mogą być np. płatki kwiatów, skórki owoców itp. Dla przykładu przytoczymy zbadane elektrody (14):

| Zastosowana tkanka | Oznaczany substrat |
|----------------------|-------------------------|
| nerka wieprzowa | glutamina |
| cienkie jelito myszy | adenozyna |
| mięsień królika | monofosforan adenozyiny |
| miąższ dyni | glutaminian |
| wątroba królika | guanina |
| ziarno kukurydzy | pirogrońian |
| liść ogórka | cysteina |

8. Elektrochemiczne oznaczanie immunologiczne z zastosowaniem enzymów

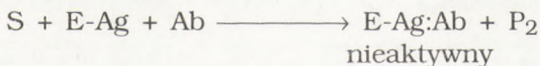
Do oznaczanego antygenu (Ag) lub przeciwciała (Ab) dodaje się koniugatu oznaczanego składnika i odpowiedniego enzymu E, tj. Ag-E lub Ab-E. Znakowany enzymem składnik, np. Ag-E konkuruje z oznaczanym, nieznakowanym Ag o związanie z przeciwciałem Ab. Miarą ilości związanego, znakowanego antygenu jest ilość elektrochemicznie aktywnego produktu reakcji przemiany odpowiedniego substratu, katalizowanej enzymem. Istnieje kilka metod przeprowadzenia takiego oznaczenia (15).

W metodach heterogenicznych związany z przeciwciałem antygen Ag odziera się w określonym etapie oznaczenia.

W metodach homogenicznych, prostszych eksperymentalnie, takiego rozdziału nie ma. Wykorzystuje się tu zjawisko silnej inhibicji enzymu związanego w kompleksie Ab:Ag-E w porównaniu z aktywnością koniugatu Ag-E niezwiązanego. Kolejność oznaczania np. przeciwciała jest następująca: w pierwszym etapie mierzy się sygnał elektryczny elektrody zanurzonej do roztworu zawierającego koniugat (E-Ag) i substrat enzymu (S), przekształcający się w czynny elektrochemicznie produkt (P).



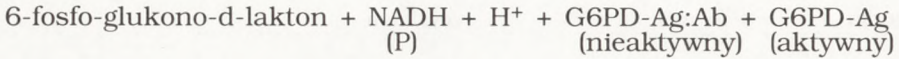
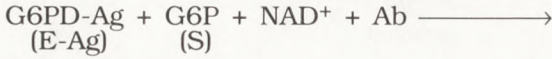
Następnie do roztworu wprowadza się oznaczane przeciwciała, specyficzne dla danego antygenu, wiążące koniugat E-Ag w kompleksy E-Ag:Ab, w których enzym praktycznie traci swą aktywność. Zmniejsza się zatem szybkość tworzenia produktu P i zarazem sygnał elektryczny elektrody



Stężenie tworzącego się produktu jest teraz znacznie mniejsze niż w nieobecności przeciwciała $[P]_2 \ll [P]_1$.

Zmniejszenie sygnału elektrody jest miarą ilości oznaczanego przeciwciała, gdyż ilość tworzonych kompleksów jest do niej proporcjonalna. Czułość me-

tody zależy od ilości wprowadzonych koniugatów E-Ag. Broyles i Rechnitz (16) do oznaczania przeciwciała leku lidokainy, zastosowali jako enzym skoniugowany z lekiem, dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu (G6PD-Ag), a jako substrat glukozy-6-fosforan (G6P). Aktywność enzymu była oznaczana amperometrycznie w procesie utleniania NADH na elektrodzie platynowej.



Dzięki niezwykle dużej selektywności przeciwciała względem danego antygenu oraz wzmocnieniu chemicznemu wynikającemu z zastosowania enzymu, metodą tą można oznaczać antygeny lub przeciwciała na poziomie 10^{-9} grama. Jedna czynna cząsteczka enzymu produkuje bowiem bardzo dużą liczbę cząsteczek elektrochemicznie aktywnego produktu.

Na zakończenie przeglądu podstaw i zastosowań elektrod enzymatycznych należy stwierdzić, że ta nowoczesna i perspektywiczna dziedzina analizy nie zakończyła jeszcze swego burzliwego rozwoju. Dalsze badania zmierzają w kierunku:

1) zwiększenia czułości oznaczeń, np. wykorzystując różnego rodzaju wzmocnienia chemiczne i fizyczne sygnału,

2) zwiększenie szybkości odpowiedzi elektrody,

3) miniaturyzacji elektrod, pozwalających na oznaczenia *in vivo* w tkankach mięśniowych, żyłach i tkance mózgowej.

Literatura

1. Guilbault G.G., Montalvo J., (1969), J. Am. Chem. Soc., 91, 2164.
2. Severinghaus W., Bradley A.F., (1958), J. App. Physiol., 13, 515.
3. Clark L.C., (1956), Trans. Am. Soc., Artificial Internal Organs, 2, 41.
4. Updike S.J., Hicks G. P., (1971), Nature, (London), 214, 986.
5. Guilbault G.G., (1988), Methods in Enzymology, 137, 14.
6. Carr P., Bowers L.D., (1980), Chem. Anal. (N.Y.), 56, 218.
7. Cass A.E.G., Dawis G., Francis G.D., Hill H. A. O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L. D.L., Turner A.P.F., (1984), Anal. Chem., 56, 667.
8. Turner A.P.F., (1988), Methods in Enzymology, 137, 90.
9. Przybyt M., (1991), Starch., 43, 180.
10. Pfeiffer D., Scheller F., Jänchen M., Bertermann K., Weise H., (1980), Anal. Lett., 13, 1179.
11. Scheller F.W., Renneberg R., Schubert F., (1988), Methods in Enzymology, 137, 29.
12. Renneberg D., Pfeiffer D., Scheller F., Jänchen M., (1982), Anal. Chem. Acta, 134, 359.
13. Arnold M.A., Rechnitz G.A., (1980), Anal. Chem., 52, 1170.
14. Rechnitz G.A., (1988), Methods in Enzymology, 137, 138.
15. Heineman W.R., Halsall H.B., (1985), Anal. Chem., 57, 1321 A.

16. Broyles C.A., Rechnitz G.A., (1986), *Anal. Chem.*, 58, 1241.
17. Guilbault G.G., Nagy G, Kuan S. S., (1973), *Anal. Chim. Acta*, 67, 195.
18. Guilbault G.G., Lubrano G.J., (1973), *Anal. Chim. Acta*, 64, 439.
19. Williams D. L., Doig A.R., Korosi A., (1970), *Anal. Chem.*, 42, 118.
20. Cullin L.F., Rusling J.F., Schleifer A., Papariello G. J., (1974), *Anal. Chem.*, 46, 1955.
21. Guilbault G.G., Lubrano G. J., (1974), *Anal. Chim. Acta*, 69, 183.
22. Meyerhoff M., Rechnitz G.A., (1976), *Anal. Chem.*, 85, 277.
23. Nanjo M., Guilbault G.G., (1975), *Anal. Chim. Acta*, 75, 169.

Enzyme Elektrodes

Summary

The principles of construction, function and operation of potentiometric and amperometric enzyme electrodes have been described. The range of application of these electrodes can be significantly extended by the use of more than one enzyme immobilized acting in sequences or parallelly. Bioselective membrane electrodes using tissue materials as biocatalysts have been described as well as the use of enzymes in electrochemical immunoassay.

Key words:

enzyme electrodes, potentiometric enzyme electrodes, amperometric enzyme electrodes, multienzymatic electrodes, electrodes with tissue materials.

Adres dla korespondencji:

Henryk Sugier, Instytut Podstaw Chemii Żywności, Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10, 90 - 924 Łódź.