

(19)



(10)

LT 4605 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4605**

(51) Int. Cl.⁶: **G01N 27/30**
G01N 33/487

(21) Paraiškos numeris: **99-032**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 04 07**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 11 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2000 01 25**

(72) Išradėjas:

Valdas-Stanislovas Laurinavičius, LT
Bogumila Kurtinaitienė, LT
Klemensas Bernotas, LT
Rolandas Meškys, LT
Remigijus Šimkus, LT
Virginijus Liauksminas, LT
Terje Skotheim, US
Leonid Boguslavsky, US

(73) Patento savininkas:

Biochemijos institutas, Mokslininkų g. 12, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Fermentinis gliukozės sensorius ir jo gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas apima fermentinį, gliukozės nustatymui skirtą biosensorių, jo sukūrimą, biosensoriaus gamybai skirtų polimerų parinkimą ir jų gavimą. Gliukozės sensorius gali būti panaudotas medicinoje diagnostikos tikslams, nustatant cukraus kiekį kraujyje, maisto kokybės kontrolėje, nustatant gliukozės kiekį maisto produktuose, mikrobiologinėje pramonėje, nustatant gliukozės kiekį mikrobiologinėse terpėse, arba moksliniams tyrimams, nustatant gliukozės koncentraciją įvairiuose biologiniuose skysčiuose ir mikrobiologinėse terpėse, taip pat gamybinių procesų kontrolei.

Išradimas realizuojamas sensoriaus konstrukcija, susidedančia iš anglinio elektrodo, fermento dehidrogenazės ir elektrochemiškai aktyvių redoks polimerų. Aprašomi polimerai yra originalios elektrochemiškai aktyvios medžiagos vienu metu atliekančios mediatoriaus, fermentą imobilizuojančios struktūros ir difuziją kontroliuojančio sluoksnio sensoriaus paviršiuje funkciją. Jie gaunami veikiant atitinkamus monomerus fermentu lakaze. Naudojant išradime siūlomą sensorių galima matuoti gliukozės koncentraciją nuo 0,1 mmol/l iki 22 mmol/l, o deguonies koncentracijos pokyčiai nedaro įtakos sensoriaus parodymams gliukozės nustatymo metu.

Išradimas priskiriamas medžiagų analizei fermentų pagalba, kurios metu nustatomi elektrocheminiai parametrai. Išradimas apima fermentinį, gliukozės nustatymui skirtą biosensorių, jo sukūrimą, biosensoriaus gamybai skirtus polimerus ir jų gavimą. Gliukozės sensorius gali būti panaudotas medicinoje diagnostikos tikslams (pvz., nustatant cukraus kiekį kraujyje), maisto kokybės kontrolėje (pvz., nustatant gliukozės kiekį maisto produktuose), mikrobiologinėje pramonėje (pvz., nustatant gliukozės kiekį mikrobiologinėse terpėse) arba moksliniams tyrimams, nustatant gliukozės koncentraciją įvairiuose biologiniuose skysčiuose ir mikrobiologinėse terpėse, taip pat gamybinių procesų kontrolėje.

Gliukozės fermentinis nustatymo būdas remiasi reakcija:



kurioje E (fermentas) yra katalizatorius, selektyviai atpažįstantis β -D-gliukozę ir katalizuojantis jos oksidaciją, o oksidatoriaus redukuota forma (O_{red}) registruojama koku nors būdu: pvz., elektrochemiškai arba spektrofotometriškai. Tirpale šios reakcijos atliekamos paprastai panaudojant gliukozės oksidazę, arba β -nikotinamido adenino dinukleotidą (NAD) turinčią gliukozės dehidrogenazę ir tirpų vandenyje, dažnai spalvotą oksidatorių.

Naudojant gliukozės oksidavimą katalizuojantį fermentą imobilizuotame būvyje, ir komponuojant katalitinį sluoksnį kartu su atitinkamu oksidatoriumi ant elektrocheminių daviklių paviršiaus, gaunami fermentiniai elektrodai (sensoriai).

Elektrocheminiai biosensoriai, kurių sudėtyje yra įvairios biologinės medžiagos – sparčiai besivystanti tyrimų sritis [J. Davis, D.H. Vaughan, M.F. Cardosi Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17, 1030-1035]. Šių biosensorių veikimo principai yra panašūs, tačiau biosensorių konstrukcijos pasižymi plačia įvairove. Ši įvairovė gali būti aiškinama remiantis kai kuriais elektrocheminių sensorių konstrukciniais elementais: tai sensorinė medžiaga – fermentas, polimerai, kurie naudojami sensorinės medžiagos imobilizavimui ant elektrodo paviršiaus ir dirbtiniai mediatoriai, pernešantys elektronus tarp

fermento ir elektrodo. Pastarieji yra reikalingi, nes tiesiogiai vykdyti elektronų apykaitą tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus būna labai sunku. Dėl aukšto NADH viršvoltažio mediatoriai yra būtini konstruojant biosensorius, turinčius nuo β -nikotinamido adenino dinukleotido (NADH) kofaktoriaus priklausančias dehidrogenazes [P. Leduc, D. Thevenot Bioelectrochem. Bioenerg., 1974, 1, 96-107. J. Moiroux, P.J. Elving Anal. Chem., 1979, 51, 346-350]. Kiti žinomi kofermentai, pavyzdžiui, flavinadenindinukleotidas (FAD) ir pirolochinolinchinonas (PQQ) yra baltymo globulės viduje, kas dar labiau apsunkina elektronų pernešimą [R. Wilson, A.P.F. Turner Biosensor & Bioelectronics 1992, 7, 165-185]. Konstruojant daugiakartinio naudojimo elektrocheminius biosensorius, ir biosensorius naudojamus *in vivo* yra būtina naudoti vandenyje netirpius mediatorius, arba imobilizuoti juos ant elektrodo paviršiaus. Patikimais mediatoriaus imobilizavimo būdais galima laikyti jų kovalentinį prijungimą prie polimero matricos arba prie paties fermento. [J. Davis, D.H. Vaughan, M.F. Cardosi Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17, 1030-1035] Teoriniu požiūriu kovalentinis mediatorių surišimas su polimerine matrica ir /arba fermentu būtų tinkamas problemos sprendimas, tačiau praktiškai mediatorių pririšimas prie polimerų ir šiems tikslams tinkamų polimerų sintezė yra sunkiai išsprendžiamas uždavinys.

Patentinėje literatūroje yra plačiai aprašyti fermentinių sensorių konstrukcijų su oksidazėmis ir dehidrogenazėmis variantai, skirti gliukozės nustatymui įvairiuose biologiniuose skysčiuose. Dažniausiai tai – sudėtingos membraninės sistemos, kurių sudėtyje esančios stambiamolekulinės medžiagos atlieka arba mediatorių arba fermentą imobilizuojančios medžiagos funkciją, pavyzdžiui, aprašytos paraiškose WO 90/12889, EP-A- 0194 578, EP-A- 0 206 471.

JAV patente 4, 545, 382 ir paraiškoje EP-A- 0 078 636 aprašyti sensoriai gliukozės nustatymui *in vivo*, panaudojant gliukozės oksidazę ir gliukozės dehidrogenazę, sudaryti iš metalinio arba anglies strypo, mediatoriaus sluoksnio ir fermento (oksidazės arba dehidrogenazės), juos sulaikančio gelio sluoksnio ir apsauginės, laidžios vandeniui ir gliukozei membranos.

Konstrukcijoje aprašomos polimerinės medžiagos, pavyzdžiui poliviologenai, polivinilferocenas, atlieka mediatoriaus funkciją. Šio sensoriaus konstrukcija ir jos sukūrimas – sudėtingi technologiniu požiūriu, nes reikia panaudoti keletą skirtingas funkcijas atliekančių polimerų. Paraiškoje EP-A-01770743 aprašytas membraninis elektrodas, skirtas gliukozės nustatymui kraujyje ir kituose biologiniuose skysčiuose, kuriame fermentas dalinai imobilizuojamas, arba užnešamas ant pagrindo (rišančios medžiagos), kuriuo gali būti stambiamolekulinės medžiagos, impregnuotos elektronų mediatoriais. Išradime rišančia medžiaga naudojami poliacetilenai, polipirolai, poli-fenilsulfidai ir kiti polimerai. Sensorius dengiamas dar viena, substratui pusiau laidžia, polimerine membrana.

Žinomų elektrodų (sensorių) kūrime naudojamos įvairios stambiamolekulinės medžiagos skirtingoms funkcijoms atlikti sąlygojo sudėtingos konstrukcijos sensorių, gaunamų naudojant sudėtingas technologijas, pateikimą patentinėje literatūroje. Todėl nesudėtingų ir greitai pagaminamų sensorių gavimas, kuriuose redoks polimeras vienu metu atliktų mediatoriaus, fermentą imobilizuojančios medžiagos ir apsauginio sluoksnio funkciją – aktualus, sudėtingas ir iki šiol neišspręstas uždavinys.

Išradimo tikslas - elektrocheminio sensoriaus, skirto gliukozės nustatymui sukūrimas, kuriame redoks polimerai atliktų visas aukščiau paminėtas funkcijas. Kitas šio išradimo tikslas - elektroaktyvių redoks polimerų, tinkamų naudoti biosensoriaus konstrukcijoje gavimas.

Išradimas realizuojamas sensoriaus konstrukcija, susidedančia iš anglinio elektrodo, fermento – dehidrogenazės ir elektroaktyvių redoks polimerų. Naudojant išradime siūlomą sensorių galima matuoti gliukozės koncentraciją nuo 0.1 mmol/l iki 22 mmol/l. Šie dydžiai apima visą fiziologinę gliukozės koncentracijų sritį. Gliukozės nustatymo metu nereikia pridėti papildomų reagentų, o analizė atliekama įmerkus sensorių į analizuojamąjį skystį arba užlašinus lašelį tiriamo skysčio ant darbinio elektrodo paviršiaus.

Sensorius yra gaunamas formuojant redoks polimero plėvelę ant anglinio elektrodo paviršiaus. Gliukozės sensoriaus konstravimas gali būti atliktas keliais būdais:

- 1) ant anglinio elektrodo paviršiaus formuojant atskirus sluoksnius, susidedančius iš fermento dehidrogenazės ir redoks savybes turinčio polimero,
- 2) anglinis elektrodas dengiamas plėvele, suformuota iš fermento ir redoks polimero,
- 3) fermento imobilizavimas atliekamas po anglinio elektrodo padengimo polimerine plėvele.

Sensoriaus konstrukcijoje naudojamos NADH, FAD kofaktorių turinčios dehidrogenazės, gautos iš Sigma firmos. Pagal geriausią sensoriaus konstrukcijos realizavimo variantą naudojama dehidrogenazė, turinti kofaktorių pirolochinolinchinoną (PQQ), išskirta iš *Erwinios* 34-1 ir aprašyta Biochemijos institute [Biotechnol Lett t 21, 187-192, 1999]. Išradime aprašomai PQQ dehidrogenazei išskirti kamienas *Erwinios* 34-1 kultivuojamas skystoje terpėje. Terpė gali būti sudaryta iš įprastinių anglies šaltinių tokių kaip gliukozė, glicerolis, manitolis, arabinozė, fruktozė, galaktozė, manozė, sacharozė, ksilozė, trehalozė, melasa. Azoto šaltiniu gali būti peptonas, mielių ekstraktas, mėsos ekstraktas, kukurūzų ekstraktas, neorganiniai junginiai amonio druskos, neorganinės magnio druskos, fosfatai, geležies sulfatas. PQQ priklauso dehidrogenazė, kurią būtų galima panaudoti pramoniniuose gliukozės oksidacijos procesuose, kuriant biosensorius, gaunama valant įprastiniais fermentų gryninimo metodais [G. Jagow, H. Schagger A practical guide to membrane protein purification. 1994, Academic press, New York].

Naujai išskirta PQQ kofaktorių turinti dehidrogenazė pasižymi šiomis charakteristikomis: optimalus pH 7.5 - 8.5; optimali temperatūra nuo 20 iki 60 °C; stabili prie 40 °C, molekulinė masė nustatyta natrio dodecilsulfato poliakrilamidinės gel elektroforezės būdu ir lygi 88 kDa, Michaelio konstantos *D*-maltozei, *L*-arabinozei, *D*-gliukozei, 2-dezoksigliukozei atitinkamai lygios - 5.77, 2.46, 0.185, 0.69 mmol/l. Fermento aktyvumo ir stabilumo priklausomybė nuo pH ir temperatūrinis stabilumas duoti Fig. 1-4. Šios dehidrogenazės katalitinės

savybės nepriklauso nuo deguonies koncentracijos tiriamajame skystyje, dėl to deguonies koncentracijos pokyčiai neturi įtakos sensoriaus parodymams.

Sensoriaus konstrukcijoje redoks polimerais naudojami elektroaktyvūs polifenolio dariniai, pavyzdžiui, poli-3,4-dihidroksibenzaldehidas, poli-hidrochinonas, taip pat polimeriniai, feroceno grupę turintys dariniai, pavyzdžiui, poli-feroceniloksietilenas. Šios medžiagos vienu metu realizuoja elektronų mediatoriaus, fermentą imobilizuojančios struktūros ir difuziją kontroliuojančio sluoksnio funkcijas. Aprašomų polimerų elektrocheminis aktyvumas, apsprendžiantis jų mediatorines savybes, įrodytas ciklinės voltamperometrijos pagalba. Iš ciklinės voltamperogramos duomenų, (žiūrėti Fig. 7,13,16) seka, kad polimerai pasižymi grįžtamais oksidacijos - redukcijos virsmis. Fermento imobilizavimas vyksta mechaniškai juos įterpiančiam polimeriniam sluoksniui, arba sudarant ant elektrodo atskirą polimerinį sluoksnį, kuris sulaiko fermento globules ant elektrodo paviršiaus. Sensoriaus konstrukcijoje naudojama polimerinė plėvelė leidžia gliukozei difunduoti prie imobilizuoto fermento ir įvykti katalitinei reakcijai, ir tuo pačiu metu, riboja gliukozės difuziją prie fermento. Šie požymiai išplečia biosensoriaus signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tiesinį diapazoną. Difuziją kontroliuojančio sluoksnio efektas parodytas Fig. 20.

Išradime aprašomų polichinoninių polimerų sintezė atliekama chemofermentinės arba organinės sintezės metodais.

Žinoma, kad fermentas lakazė oksiduoja ir polimerizuoja daugybę fenolių ir aromatinių aminių [R. B Brown. Oxidative coupling of phenols. New York, 1967, 167]. Daugeliu atveju susidaro elektrochemiškai aktyvūs chinonai, o taip pat chinonines grupuotes turintys oligomerai bei polimerai. Taigi, galima tikėtis, kad iš kai kurių lakazės substratų įmanoma susintetinti redoks oligomerus ir polimerus, tinkančius biosensoriams. Šiame išradime pateikiamas polimerų, parinktų šio sensoriaus realizavimui, gavimo būdas, kai fenolines grupes turinčius monomerus veikiant lakaze gaunami elektrochemiškai aktyvūs, mediatoriaus ir difuziją ribojančio sluoksnio funkcijas atliekantys polimerai. Šias savybes turintys redoks polimerai su feroceno grupe gali būti gaunami ir

organinės sintezės metodais, prijungiant elektrochemiškai aktyvius komponentus prie oligomerų, pavyzdžiui, poli-feroceniloksietilenas gaunamas, laisvų radikalų metodu prijungiant ferocenilmetantiolą prie etilenglikolio vinilglicidilo diesterio oligomero 75 °C temperatūroje, esant azobisisosviesto rūgšties dinitrilui.[Л. Богуславский и др; Доклады РАН, 1996, № 12].

Išradimas yra iliustruojamas grafikais ir pateiktais eksperimentiniais pavyzdžiais.

Fig. 1 PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės aktyvumo priklausomybė nuo buferio prigimties ir pH.

Fig. 2 PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės aktyvumo priklausomybė nuo pH.

Fig. 3 PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės temperatūrinis stabilumas.

Fig. 4 PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros.

Fig. 5. Poli-dihidroksibenzaldehido sotaus tirpalo BMR ^1H (90 MHz) spektras metanolyje.

Fig. 6. (A) Poli -3,4-dihidroksibenzaldehido, susintetinto lakazės pagalba IR spektras KBr tabletėje. (B) IR spektras poli - benzochinono, susintetinto lakazės pagalba.

Fig. 7. A - Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-DBA, ciklinė voltamperinė kreivė 0.05 mol/l fosfatiniame buferyje su 0.1 mol/l KCl, pH 6.7. Skleidimo greitis 10 mV/s. B - Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-DBA, pusiausvyrinio potencialo priklausomybė nuo pH.

Fig. 8. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-DBA, anodinės srovės priklausomybė nuo NADH koncentracijos. 1, 2 - dvi to paties elektrodo kalibracinės kreivės.

Fig. 9. Poli-hidrochinono sintezės schema.

Fig. 10. Pakitimai UV ir matomos srities arbutino spektre ($100 \mu\text{mol/l}$) oksiduojant jį lakaze (25 ng/ml). Spektrai užrašyti be lakazės (1) ir pridėjus lakazę kas 8 min (2 - 6), po 2, 4 ir 24 valandų (atitinkamai 7 - 9).

Fig. 11. Poli-hidrochinono, gauto hidrolizuoiant poliarbutiną (A) ir hidrochinono (B) IR spektrai KBr tabletėse.

Fig. 12. Hidrochinono (1) ir poli-hidrochinono, gauto hidrolizuoiant susintetintą poliarbutiną (2) UV ir matomos srities spektrai, užrašyti metanolyje (10 mg/l).

Fig. 13. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-hidrochiononu, ciklinė voltamperinė kreivė (1). 2 - To paties elektrodo CV kreivė, pridėjus 12 mmol/l NADH. Skleidimo greitis 10 mV/s , terpė - fosfatinis buferis, pH 7.0.

Fig. 14. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-hidrochiononu, pusiausvyrinio potencialo priklausomybė nuo pH.

Fig. 15. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-hidrochiononu, atsakas į NADH 0.05 mol/l fosfatiniame buferyje su 0.1 mol/l KCl, pH 7.0, potenciostatinėse sąlygose, $E = 200 \text{ mV}$, Ag/AgCl atžvilgiu.

Fig. 16. Anglinio elektrodo, padengto poli-Fc sluoksniu iš 12 mg/ml tirpalo cikloheksanone ciklinė voltamperinė kreivė. Matavimai atlikti 0.05 mol/l fosfatiniame buferyje su 0.1 mol/l KCl, pH 7.0. Skleidimo greitis 10 mV/s.

Fig. 17. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-DBA ir PQQ-GDH, atsakas į gliukozę. Elektrodo potencialas 300 mV Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu. 0.05 mol/l Glicininis buferis, pH 7.0 su 0.1 mol/l KCl. 1 ir 2 - dvi nuoseklios kalibracinės kreivės su tuo pačiu elektrodu.

Fig. 18. Anglinio elektrodo, modifikuoto poli-hidrochiononu, atsakas į gliukozę. Matuota 0.05 mol/l fosfatiniame buferyje, pH 7.0, potenxiostatinėse sąlygose, E=550 mV, Ag/AgCl atžvilgiu.

Fig. 19. Anglinio elektrodo, padengto poli-Fc sluoksniu atsakas į gliukozę. Matavimai atlikti 0.05 mol/l fosfatiniame buferyje su 0.1 mol/l KCl, pH 7.0, esant tirpale 1.5 vnt. PQQ-GDH. Elektrodo potencialas 550 mV.

A - sluoksnis suformuotas iš koncentruoto (120 mg/ml) poli-Fc tirpalo cikloheksanone;

B - polimerinis sluoksnis suformuotas iš praskiesto (24 mg/ml) poli-Fc tirpalo cikloheksanone.

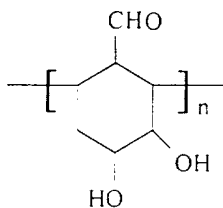
Fig. 20. Anglinių elektrodų, kurių paviršius padengtas poli-Fc ir adsorbuota PQQ-GDH (0.06 vnt.) kalibracinės kreivės.

1 - elektrodas, padengtas plėvele iš koncentruoto polimero tirpalo (120 mg/ml) cikloheksanone;

2 - elektrodas, ant kurio suformuota plėvelė iš praskiesto poli-Fc tirpalo (60 mg/ml).

Eksperimentinė dalis

1 Pavyzdys. Poli - 3,4-dihidroksibenzaldehido (poli-DBA) gavimas lakazės pagalba ir produkto charakteristika



Poli - 3,4-dihidroksibenzaldehydas gaunamas iš pirktinio reagento 3,4-dihidroksibenzaldehido (firmos "Sigma" produktas), veikiant jo vandeninį tirpalą lakaze. 690 mg substrato ir 1 mg lakazės vandeninis tirpalas buvo maišomas 24 valandas atvirame inde. Tamsiai rudas reakcijos mišinys paskleidžiamas ant 1 m² celuloido plėvelės ir toliau iš lėto džiovinamas ore. Išdžiūvęs, netirpus vandenyje produktas buvo naudojamas tyrimuose.

Poli-3,4-dihidroksibenzaldehido spektrinės charakteristikos duotos Fig. 5 ir Fig. 6.

Ištirpinto metanolyje poli-DBA BMR ¹H spektre (Fig. 5) stebimi signalai aromatinių ir/arba dvigubos jungties protonų srityje (7.24 , 6.84 m.d.) ir signalas alifatinių protonų srityje (3.48 m.d.).

Polimero, ištirpinto D - dimetilsulfoksido, C¹³ BMR spektre signalas su cheminiu postūmiu apie 138.2 ir 126 m.d., priskirtas aromaticinei grupei, ir signalas su cheminiu poslinkiu 67.55 m.d., priskirtas alifatinei grupei.

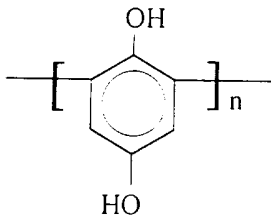
Poli-DBA IR spektras KBr tabletėje pateiktas Fig. 6, kreivėje A. Pikas spektre ties 1200 cm⁻¹ atitinka fenolinės hidroksilo grupės absorbcijos juostą.

Poli-3,4-dihidroksibenzaldehido elektrocheminės savybės tirtos ciklinės voltamperometrijos būdu. Iš ciklinės voltamperogramos duomenų, pateiktų Fig. 7 A, seka, kad polimeras pasižymi grįžtamu oksidacijos - redukcijos virsmui, kurio pusiausvyrinis potencialas prie pH 7.0 yra 185 mV. Pusiausvyrinio potencialo priklausomybė nuo pH parodyta Fig. 7 B. Tiesės nuolinkio kampas (-

51 mV/pH) rodo, kad elektrodiniame procese dalyvauja 2 protonai ir 2 elektronai.

Ant anglinio elektrodo buvo suformuotas poli - DBA sluoksnis, išgarinant 3 μ l sotaus etanolinio polimero tirpalo. Anglinis elektrodas su poli - DBA sluoksniu, poliarizuotas 200 mV Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu, atsako į nedideles reduktoriaus - nikotinamidadenindinukleotido (NADH) koncentracijas. Anodinės srovės padidėjimas registruojamas saviraščio pagalba. Kalibracinis grafikas parodytas Fig. 8, kreivėje 1. Tiesinė grafiko dalis siekia 1.5 mM NADH. Polimerinis oksidatorius stabiliai išsilaiko ant elektrodo paviršiaus ir redoks savybės neprarandamos plaunant elektrodą ir vartojant jį pakartotinai. Iš Fig. 8, 2 kreivės matyti, kad antrą kartą matuojant NADH koncentraciją tuo pačiu elektrodu, signalai yra panašūs, kaip ir pirmos kreivės. Tai rodo, kad redoks polimeras ant elektrodo paviršiaus oksiduoja esantį tirpale biologinį reduktorių - NADH, ir gali perduoti elektronus elektrodui.

2 Pavyzdys. Poli-hidrochinono sintezė ir charakteristika



Medžiagos sintezė atlikta pagal modifikuotą metodiką [J.S. Dordick et al., J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 12885-12886] iš pirktinio arbutino ("Sigma", JAV). Sintezė vykdoma dviem stadijom: pirma, polimerizuojant arbutiną fosfatiniame buferyje pH 5.25, (lakazė yra šio proceso katalizatorius) ir, hidrolizuojant gautą poliarbutiną rūgštinėje terpėje. Reakcijų schema pateikta Fig. 9. Gautas produktas - netirpios vandenyje rudos spalvos nuosėdos plaunamas ant filtrinio popieriaus destiliuotu vandeniu.

Fig. 10 iliustruoja 0.1 mM arbutino tirpalo spektro pakitimus lakazės katalizuojamos oksidacijos metu. Matyti, kad procesas lydimas UV absorbcijos

intensyvėjimu, po 24 h praktiškai baigiasi. Poliarbutinas yra tirpus vandenyje, rudos spalvos, sugeriantis šviesą ties 400 nm banga.

Gauto galutinio produkto poli-hidrochinono IR spektras (KBr tabletė) pateiktas Fig. 6, kreivėje B ir Fig. 11, A. Polimero spektre stebimos panašaus dažnio juostos kaip ir monomero spektre, kuris parodytas Fig. 11, B.

Monomero (hidrochinono) ir polimero UV bei matomos srities spektrai sugretinti Fig. 12. UV srityje stebima juosta polimero atveju (kreivė 2) yra pasislinkusi į ilgujų bangų pusę, kas yra būdinga polimerams.

Polimero elektrocheminės savybės tirtos vandeniniuose buferiniuose tirpaluose, analizuojant modifikuotų polimero sluoksnių anglinių elektrodų ciklines voltamperometrines kreives. Tipinė tokia kreivė fosfatiniame buferyje parodyta Fig. 13. Matyti, kad polimerinė medžiaga pasižymi grįžtamu oksidacijos - redukcijos virsmu (kreivė 1), kurio pusiausvyrinis potencialas prie pH 7.0 yra 57 mV. Pusiausvyrinio potencialo priklausomybė nuo pH yra tiesė, kuri parodyta Fig. 14. Tiesės nuolinkio kampas (-56 mV/pH) rodo, kad elektrodiniame procese dalyvauja 2 protonai ir 2 elektronai.

Poli-hidrochinono gebėjimas oksiduoti redukuotą nikotinamidadenindinukleotidą (NADH) atspindėtas anodinės srovės padidėjimu pridėjus 12 mM NADH (Fig. 14, kreivė 2). Potenciostatinėse sąlygose esant potencialui 200 mV, modifikuoto poli-hidrochinonu anglinio elektrodo atsakas į NADH yra tiesinis iki 5 mM NADH (Fig. 15).

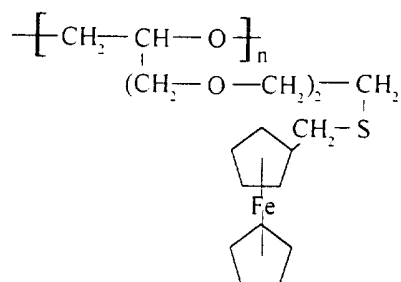
3 Pavyzdys. Poli-feroceniloksietileno (poli-Fc) sintezė ir polimero charakteristika

Medžiagos sintezė atlikta pagal metodiką [Л Богуславский и др; Доклады РАН, 1996, № 12] , prijungiant ferocenilmetantiolą prie etilenglikolio vinilglicidilo diesterio 75 °C temperatūroje, esant azobisisosviesto rūgšties dinitrilui.

Poli-Fc spektrinės charakteristikos, įrodančios medžiagos struktūrą, sutampa su literatūroje nurodytomis charakteristikomis.

Medžiagos IR spektrai KBr tabletėse rodė juostas, charakteringas feroceno žiedui (dvigubas pikas 480 ir 500 cm^{-1}) srityje. Viniloksigrupėi charakteringos juostos (1605, 1625 cm^{-1}) sintezės eigoje išnykdavo.

Struktūrinė oligomero formulė:



Poli - ferocenioksietileno (poli-Fc) elektrocheminės savybės tirtos tiesiog ant anglinio elektrodo paviršiaus išgarinant 2 μl cikloheksanoninio polimero tirpalo. Poli-Fc ciklinė voltamperinė kreivė parodyta Fig. 16. Stebimas grįžtamas vienelektroninis oksidacijos-redukcijos procesas, kurio pusiausvyrinis potencialas yra apie 450 mV Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu.

Fermentinių elektrodų, pagamintų panaudojant aukščiau aprašytus polimerus veikimas aprašytas šiuose pavyzdžiuose.

4 Pavyzdys. Gliukozės sensorius su poli-DBA ir PQQ-GDH.

Ant anglinio elektrodo paviršiaus sorbuojamas sluoksnis iš 0.05 vnt. fermento PQQ-gliukozės dehidrogenazės ir išgarinama 3 μl sotaus etanolinio poli-DBA tirpalo.

Toks elektrodas potenciostatinėse sąlygose (300 mV) atsako į gliukozės pridėjimą į buferinį tirpalą (Fig. 17.). Sensoriaus jautrumas yra apie 0.2 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Jautrumas nepakito, atliekant matavimus antrą kartą su tuo pačiu elektrodu (kreivė 2), tai rodo, kad fermento ir redoks polimero savybės nepakito, ir imobilizavimas įvyko efektyviai.

5 Pavyzdys. Gliukozės elektrodo su PQQ-GDH ir polihidrochinonu gamyba.

Fermentinis elektrodas gaminamas formuojant ant anglies elektrodo du sluoksnius: adsorbuoto fermento sluoksnį iš 0.06 vnt fermento PQQ-gliukozės dehidrogenazės ir polimero plėvelę. Plėvelė susidaro išgarinus ant elektrodo paviršiaus 2 μ l polimero tirpalo dimetilsulfoksido.

Gliukozės matavimai atliekami 0.4 ml tūrio gardelėje su 0.05 M fosfatinio buferiniu tirpalu, kurio pH 7.0, poliarizuojant paruoštą elektrodą 550 mV Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Pridedant į tirpalą gliukozės, registruojami anodinės srovės pokyčiai. Rezultatai, atspindintys signalo priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos, parodyti **Fig. 18**. Elektrodo jautrumas - 0.08 μ A/mM gliukozės.

6 Pavyzdys. Gliukozės elektrodo su poli - Fc gamyba

Ant anglinio elektrodo paviršiaus suformuota polimerinė plėvelė išdžiovinant 3 μ l poli-Fc tirpalo cikloheksanone. Elektrodas su polimeriniu sluoksniu merkiamas į 0.2 ml tūrio gardelę su 1.5 vnt. PQQ-gliukozės dehidrogenazės buferiniame tirpale (pH=6) ir nustatoma foninė elektrodo srovė, poliarizuojant jį 550 mV Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Į gardelę įnešama po 2 μ l 0.1 M gliukozės tirpalo ir registruojami anodinės srovės pokyčiai. Gliukozės matavimai, naudojant poli-Fc padengtą elektrodą, kai poliferoceninis sluoksnis tarnauja sistemos oksidatoriumi, o fermentas yra tirpale, iliustruojamas **Fig. 19**. Elektrodo, kurio paviršiuje suformuota plėvelė iš 120 mg/ml poli-Fc tirpalo, jautrumas gliukozei buvo 0.04 μ A/mmol·l ir kalibracinio grafiko tiesinė dalis siekė iki 8 mmol/l (**Fig. 21, A kreivė**). Elektrodo, kurio paviršiuje suformuota plėvelė iš 24 mg/ml poliFc tirpalo, jautrumas buvo 0.25 μ A/mmol·l, o kalibracinio grafiko tiesiškumas siekė 6 mmol/l (**Fig. 19, B kreivė**). Iš gautų rezultatų matyti, kad esant 5 kartus mažesniai polimero kiekiui, elektrodo jautrumas gliukozei

yra 6 kartus didesnis, tačiau toks Biosensorius turi trumpesnę kalibracinio grafiko tiesinę dalį.

7 Pavyzdys. Gliukozės sensoriaus su poli-Fc ir PQQ GDH gamyba.

Polimero pagalba ant elektrodo paviršiaus imobilizavome fermentą. Tam konstravome dviejų sluoksnių fermentinį elektrodą. Vidiniame sluoksnyje buvo fermentas PQQ-GDH (0.06 vnt), adsorbuotas ant anglinio elektrodo paviršiaus. Išorinį sluoksnį sudarė polimerinė plėvelė iš 2 μ l poli-Fc tirpalo cikloheksanone. Tokia konstrukcija turi kelis privalumus. Pirma, polimerinė plėvelė, būdama mažai tirpi vandenyje, apsaugo fermentą nuo išsiplovimo į tirpalą. Antra, plėvelė sukelia difūzinius apsunkinimus gliukozės patekimui iš tirpalo į fermentinį sluoksnį, dėl ko pailgėja kalibracinio grafiko tiesinė dalis.

Į paruoštą 0.4 ml tūrio gardelę įvedama 0.008 ml 0.1 mol/l gliukozės tirpalo ir išmaišoma. Galutinė gliukozės koncentracija gardelėje 2 mmol/l. Matavimai atliekami gardelėje su 0.05 M fosfatinu buferiniu tirpalu, kurio pH 7.0, polarizuojant paruoštą elektrodą 550 mV Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Registruojami anodinės srovės pokyčiai šešis kartus iš eilės, merkiant fermentinį elektrodą į tą patį 2 mmol/l gliukozės tirpalą ir po kiekvieno matavimo elektrodą nuplaunant destiliuotu vandeniu. Fermento sluoksnio stabilumą ir katalitinio aktyvumo išlikimą, panaudojus elektrodą kelis kartus, iliustruoja šie rezultatai. Užregistruoti signalai sudarė : 0.16; 0.25; 0.15; 0.15 0.14 ir 0.24 μ A. Reikšmių vidurkis $x = 0.18 \mu\text{A}$,. Variacijos koeficientas $CV = 11.6\%$ rodo, kad gautos reikšmės yra eksperimento paklaidos ribose.

Elektrodo, kurio paviršius modifikuotas dviem sluoksniais - PQQ-GDH ir poliFc plėvele, jautrumas gliukozei pateiktas Fig. 20.

Iš 1 kreivės matyti, kad esant polimerinei plėvelei suformuotai, iš 120 mg/ml poliFc tirpalo, elektrodo jautrumas buvo 62 nA mmol^{-1} l, o kai polimerinė plėvelė gauta iš dvigubai mažesnio poli-Fc kiekio (Fig. 20, 2 kreivė), tai elektrodo jautrumas gliukozei buvo didesnis ir siekė apie 98 nA/mm mol l. Tai leidžia manyti, kad esant mažesniai polimero kiekiui susidaro plonesnis sluoksnis, kuriame

feroceno darinys turi didesnį judrumą ir gali efektyviau sąveikauti su aktyviu fermento centru. Taip pat gauti rezultatai patvirtina, kad polimerinė plėvelė apsunkina gliukozės difuziją katalitiniame sluoksnyje, nes kalibracinio grafiko tiesinė dalis pailgėja iki 24 mmol/l.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Biosensorius (fermentinis elektrodas), skirtas gliukozės nustatymui biologiniuose skysčiuose, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš anglinio elektrodo, fermento dehidrogenazės ir polimerinės plėvelės, kuri vienu metu atlieka mediatoriaus, fermentą imobilizuojančios struktūros ir difūziją kontroliuojančio sluoksnio funkciją.
2. Biosensorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentu dehidrogenaze yra β -nikotinamido adenino dinukleotido (NADH), flavinadenindinukleotido (FAD) arba pirolochinolinchinono (PQQ) kofaktorių turinčios dehidrogenazės.
3. Biosensorius, kuriame fermentu dehidrogenaze yra pirolochinolinchinono (PQQ) kofaktorių turinti dehidrogenazė pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirolochinolinchinono (PQQ) kofaktorių turinčią dehidrogenazę išskiria iš mikroorganizmo kamieno *Erwinia sp* 34-1.
4. Biosensorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje esanti polimerinė plėvelė yra polichinoninės struktūros redoks polimerai.
5. Biosensorius pagal 1 ir 4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje esančius polichinoninių struktūrų redoks polimerus gauna chinoninės struktūros monomerus polymerizuojant fermento lakazės pagalba.
6. Biosensorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje esanti polimerinė plėvelė yra feroceno grupę turintys dariniai.
7. Biosensoriaus pagal 1 punktą gavimo būdas dengiant fermentą ir redoks polimero plėvelę ant elektrodo paviršiaus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentą imobilizuoja nekovalentiniais ryšiais įterpiant į polimerinį sluoksnį.
8. Biosensoriaus gavimo būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polimerą dengia ant elektrodo sudarant atskirą, fermentą sulaikantį, sluoksnį.
9. Biosensoriaus gavimo būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad elektrodą dengia plėvelė, suformuota iš fermento ir redoks polimero.
10. Biosensoriaus gavimo būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, fermentas imobilizuojamas po elektrodo padengimo polimeru.

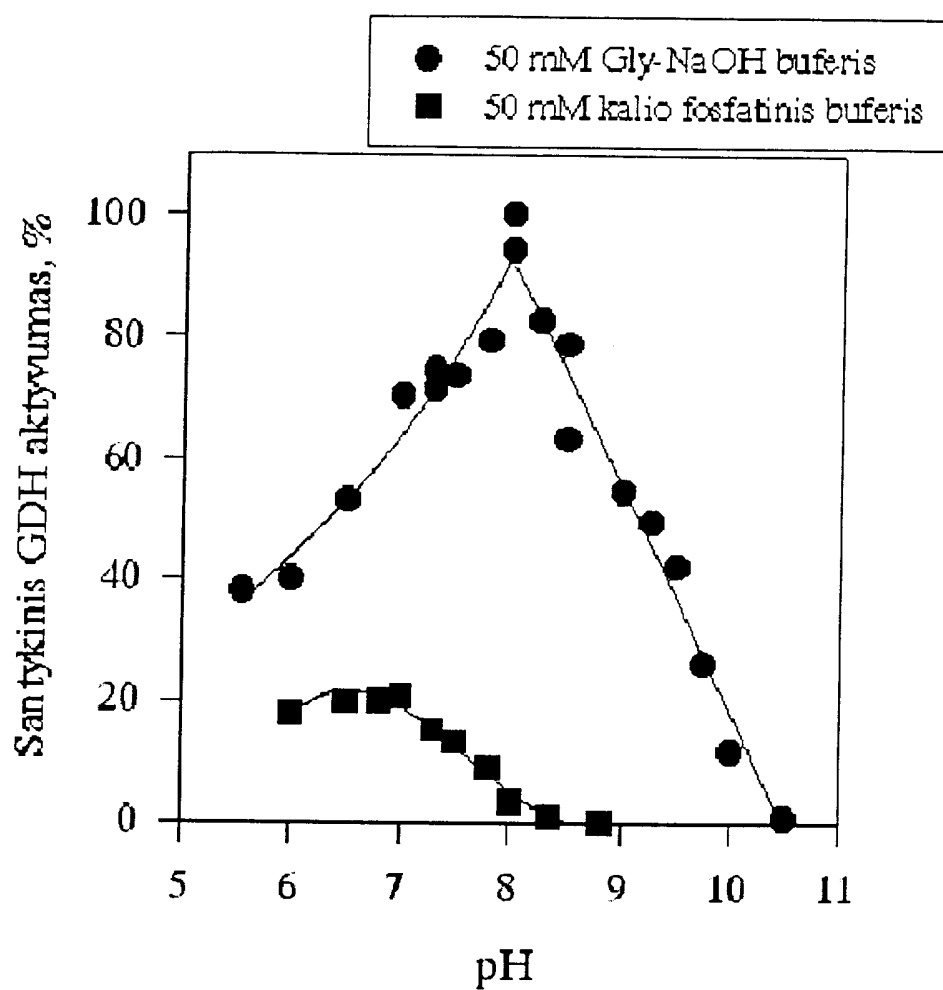


Fig.1

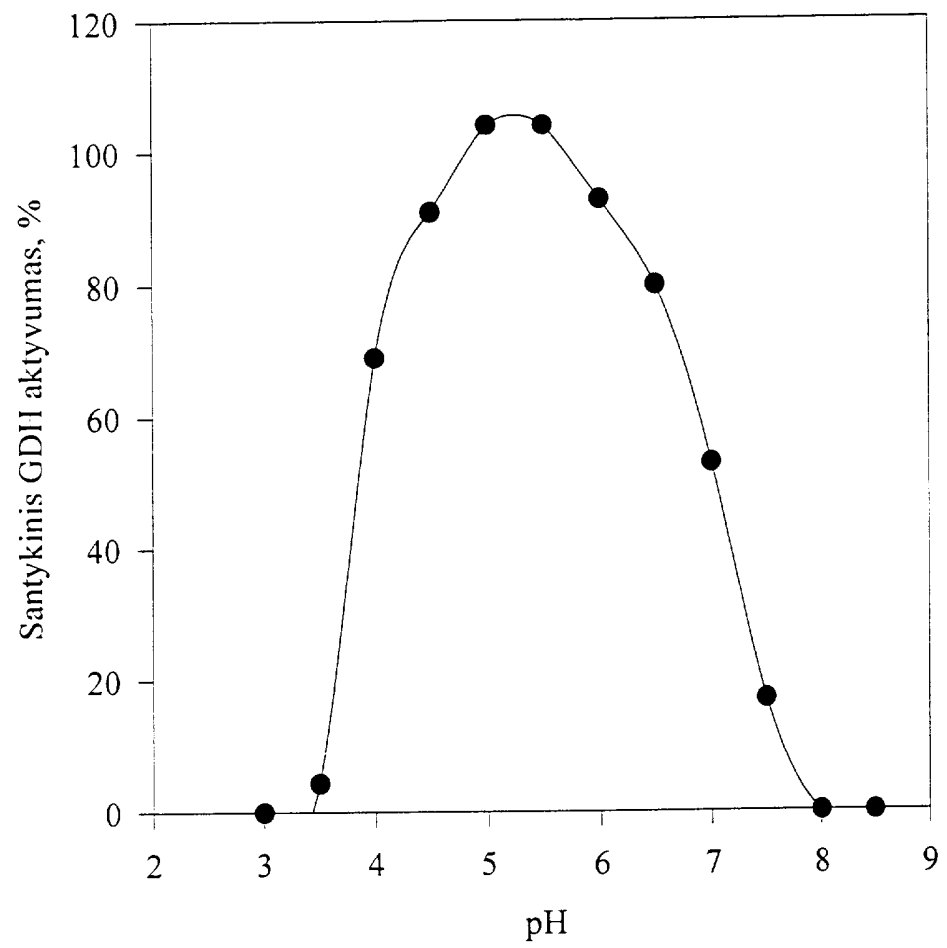


Fig. 2

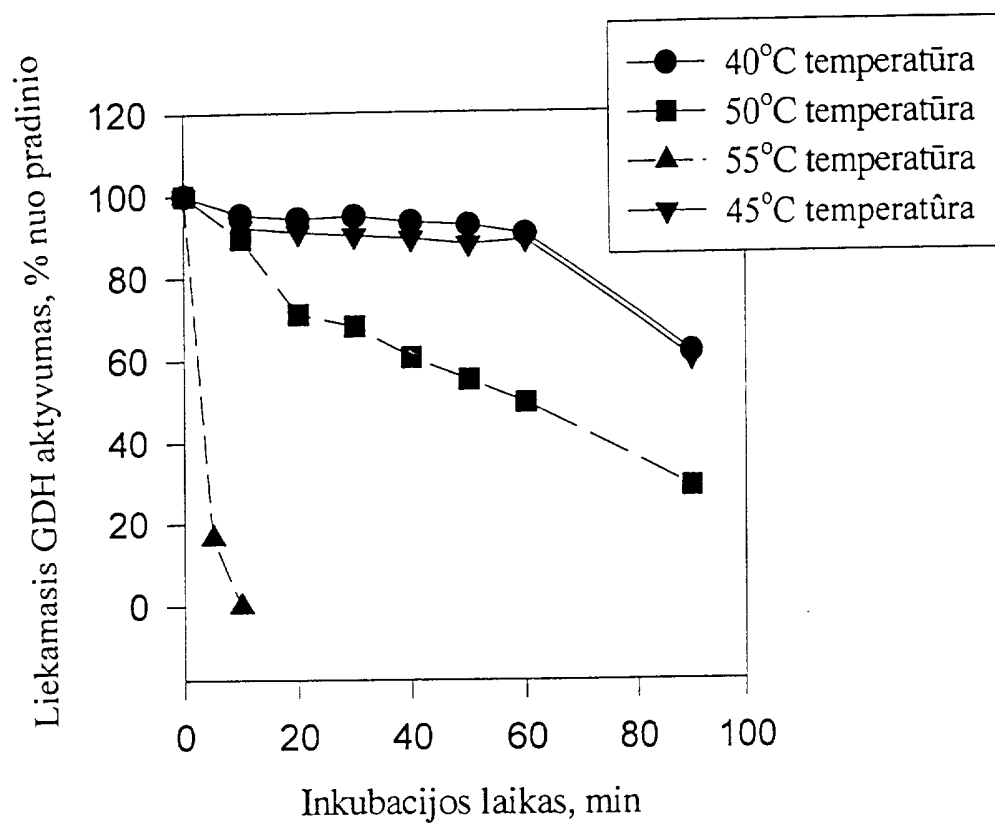


Fig. 3

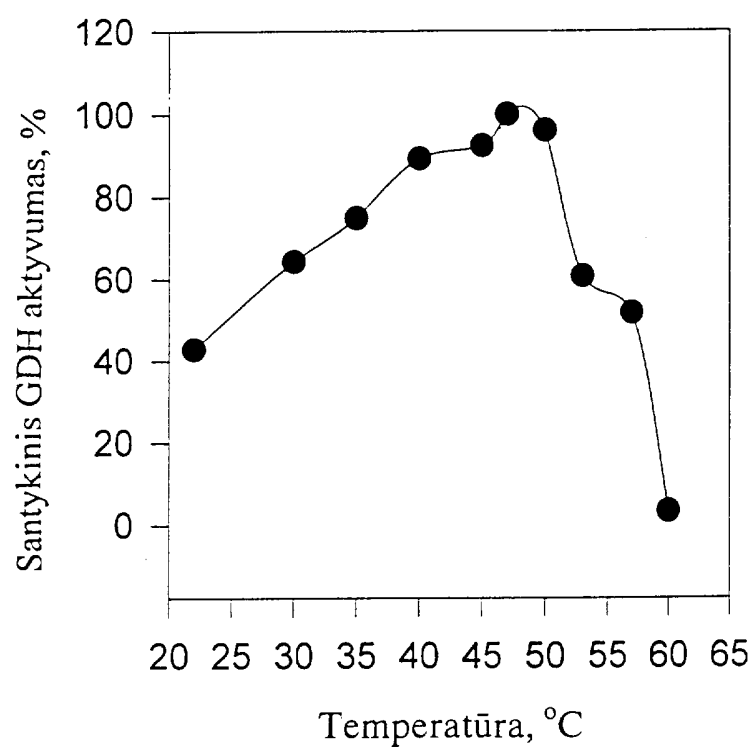


Fig. 4

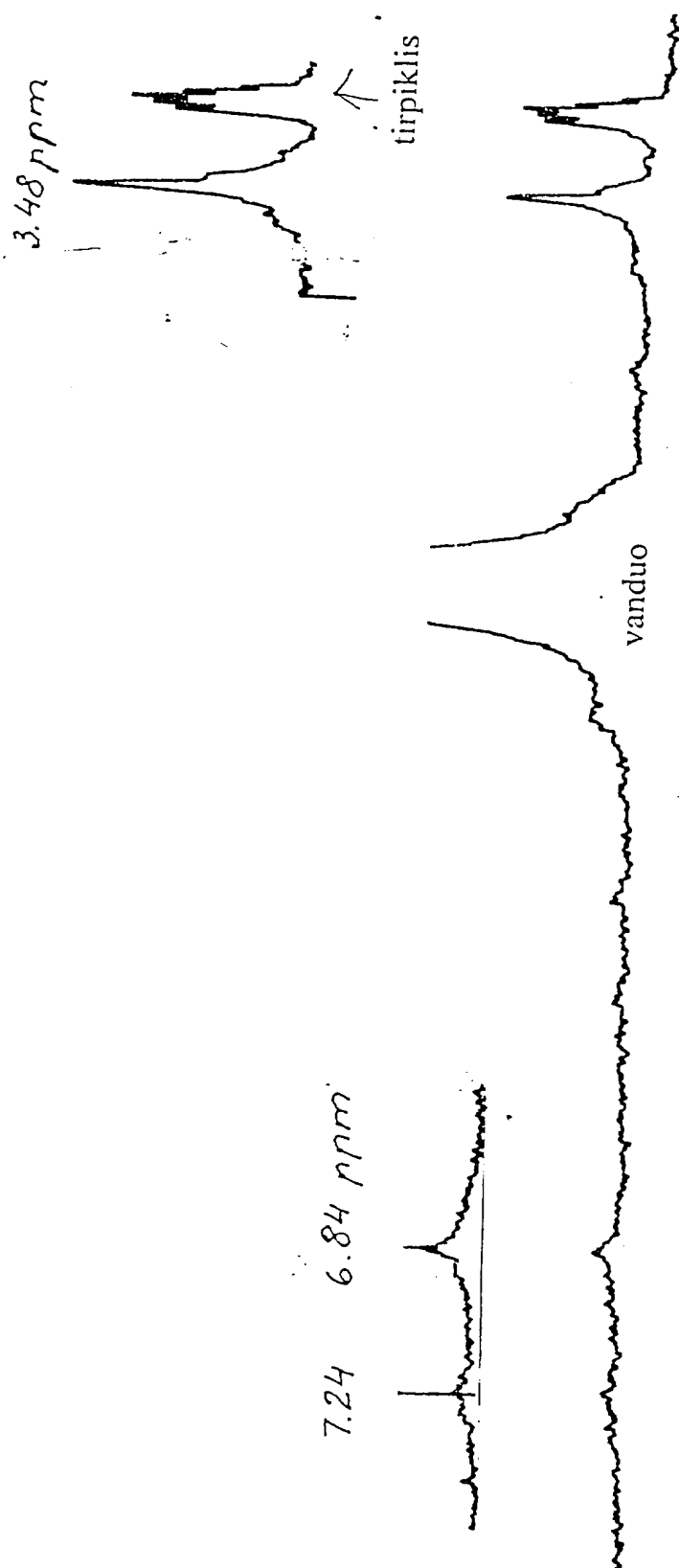


Fig. 5

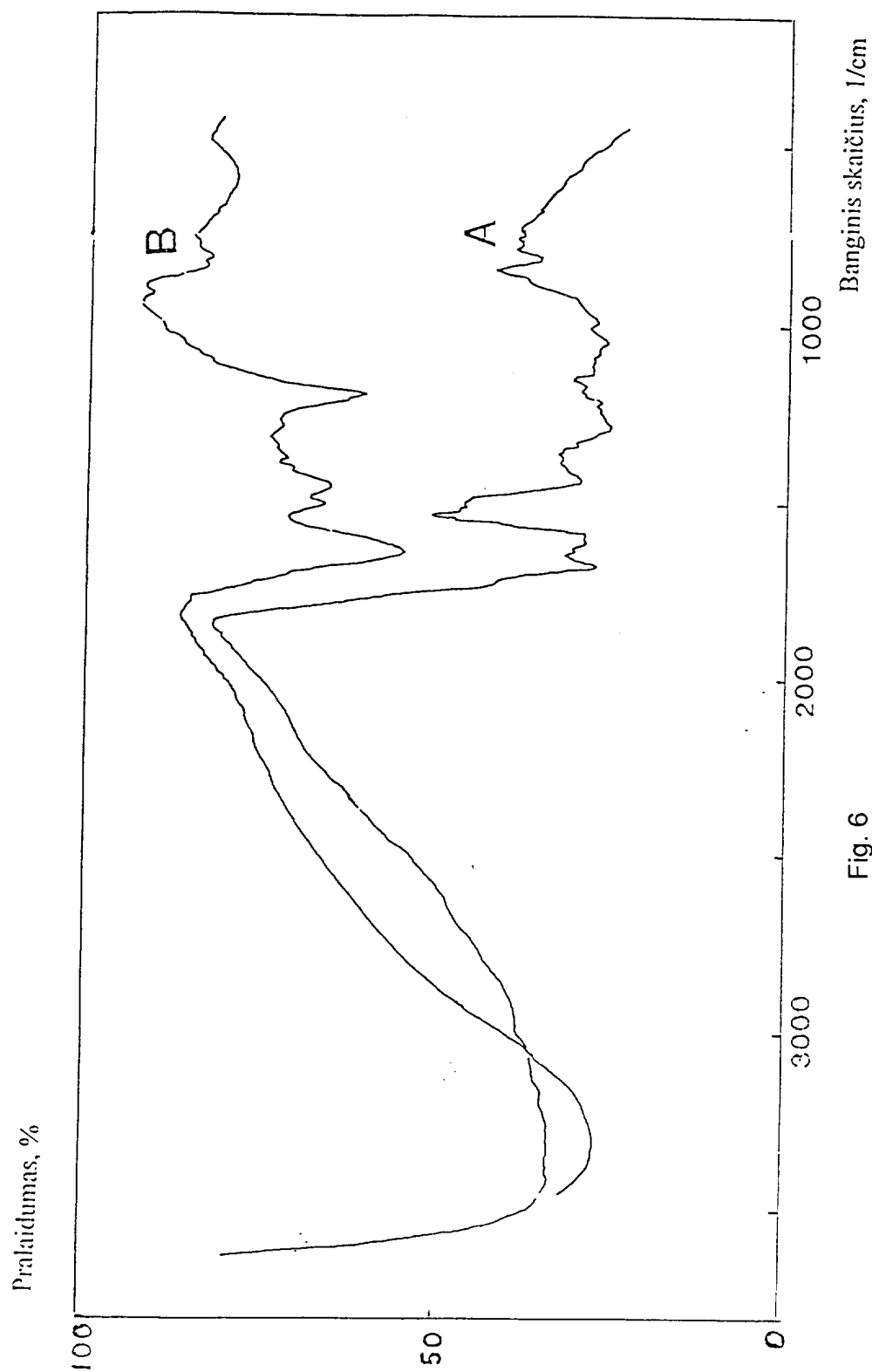


Fig. 6

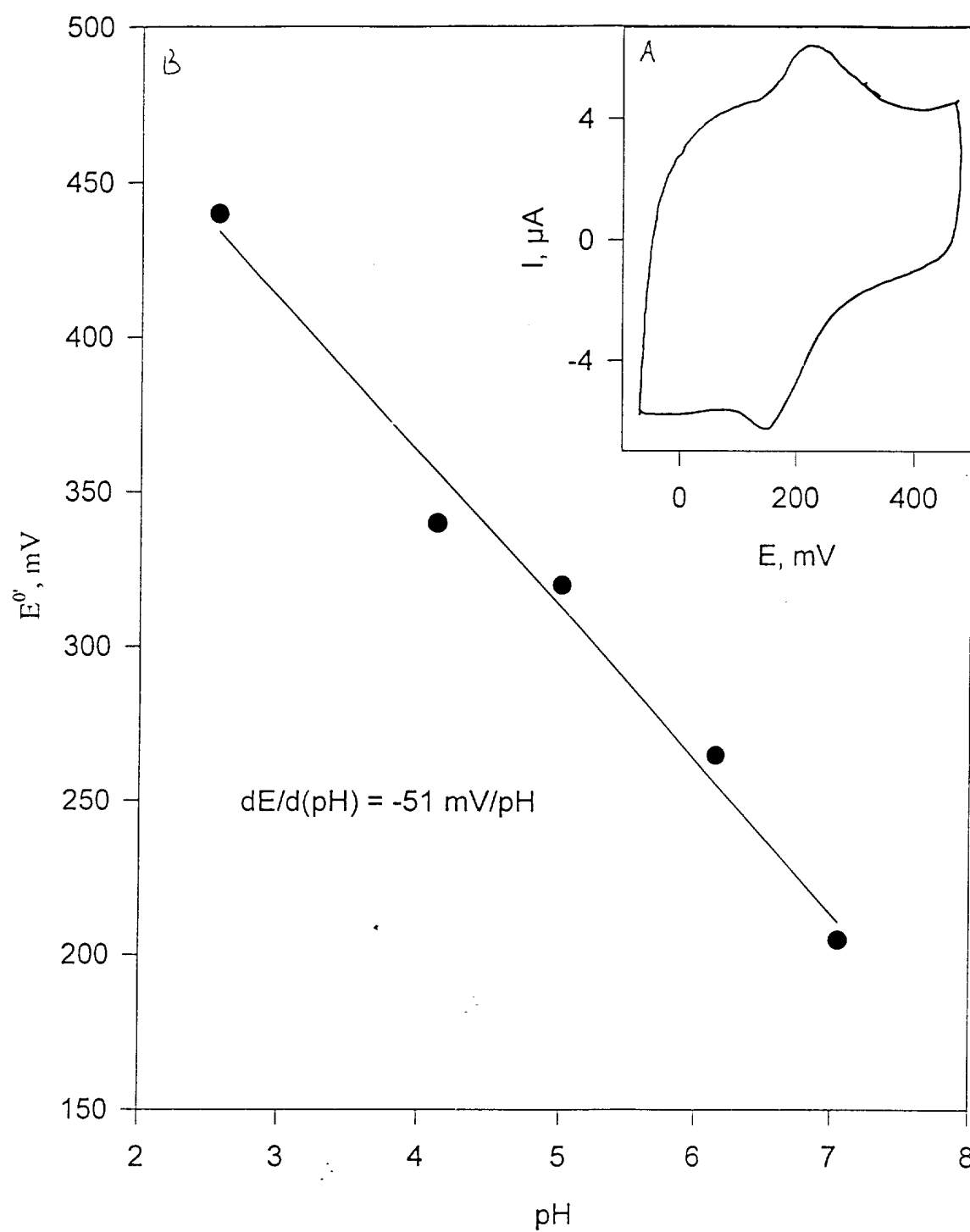


Fig. 7

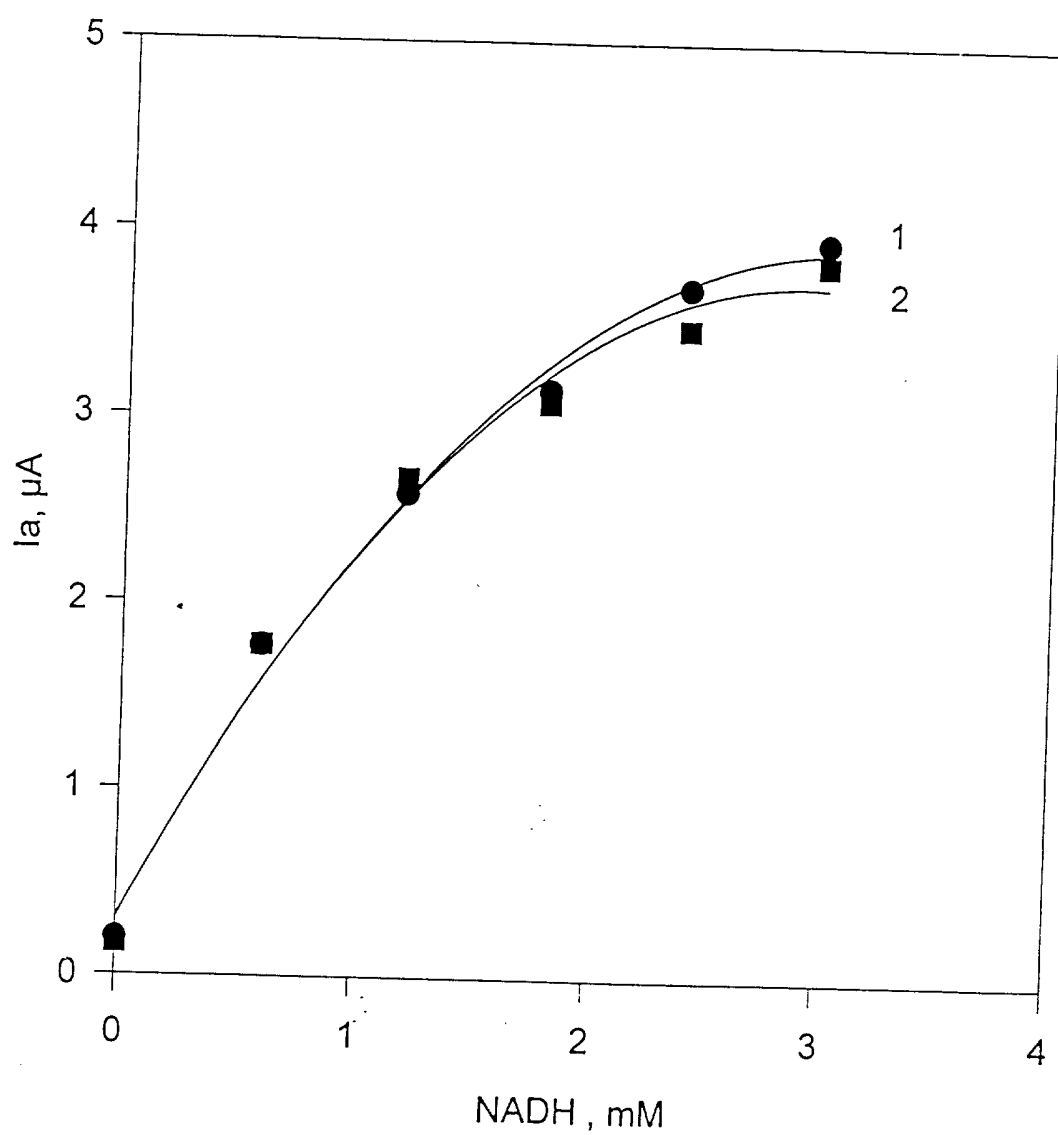


Fig. 8

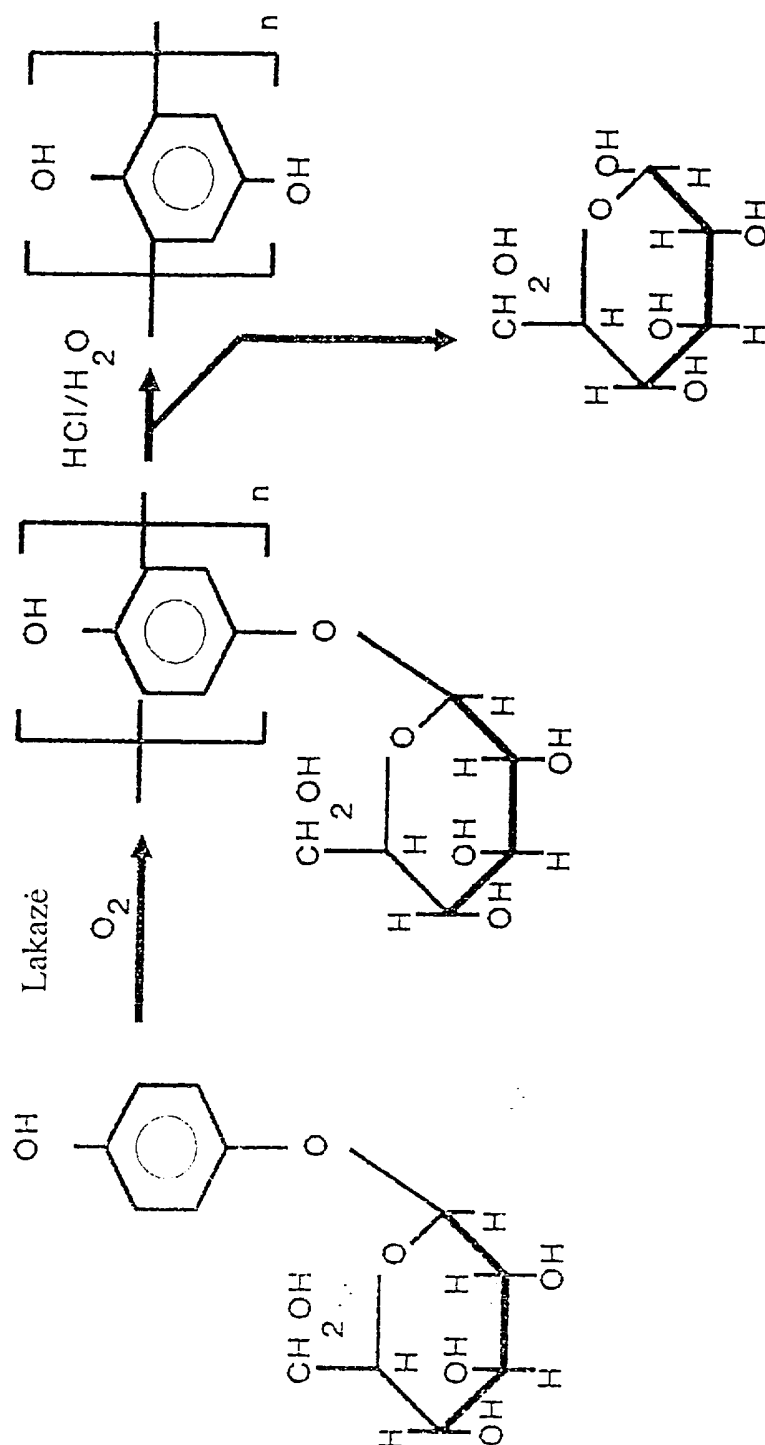


Fig. 9

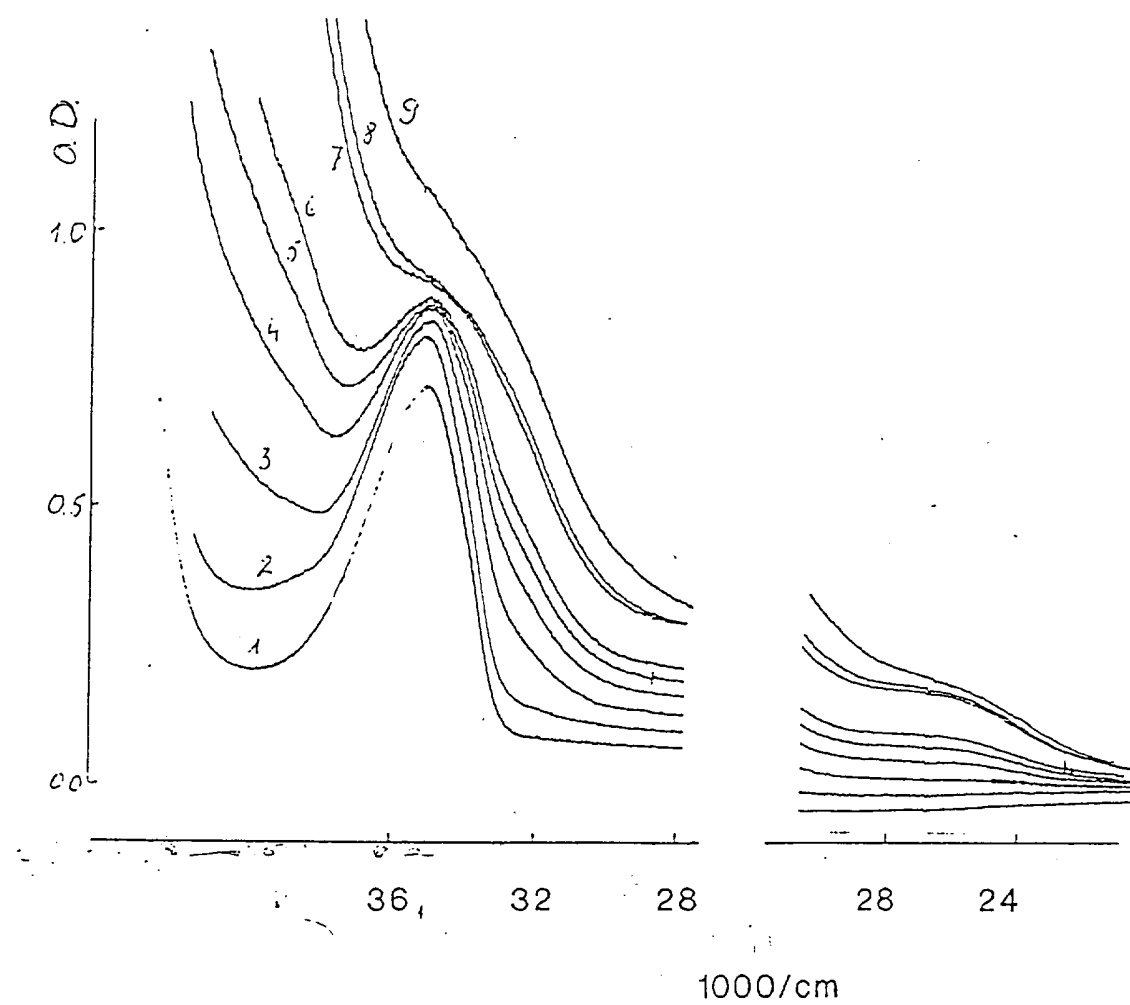
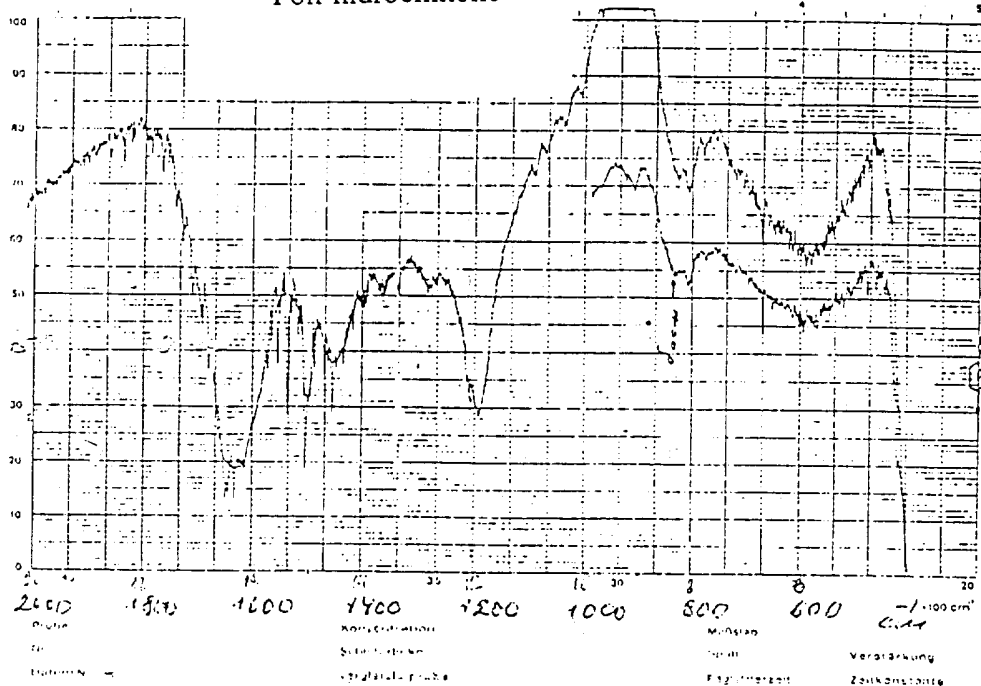


Fig. 10

SPECORD

Poli-hidrochinono

A



B

SPECORD

Hidrochinono

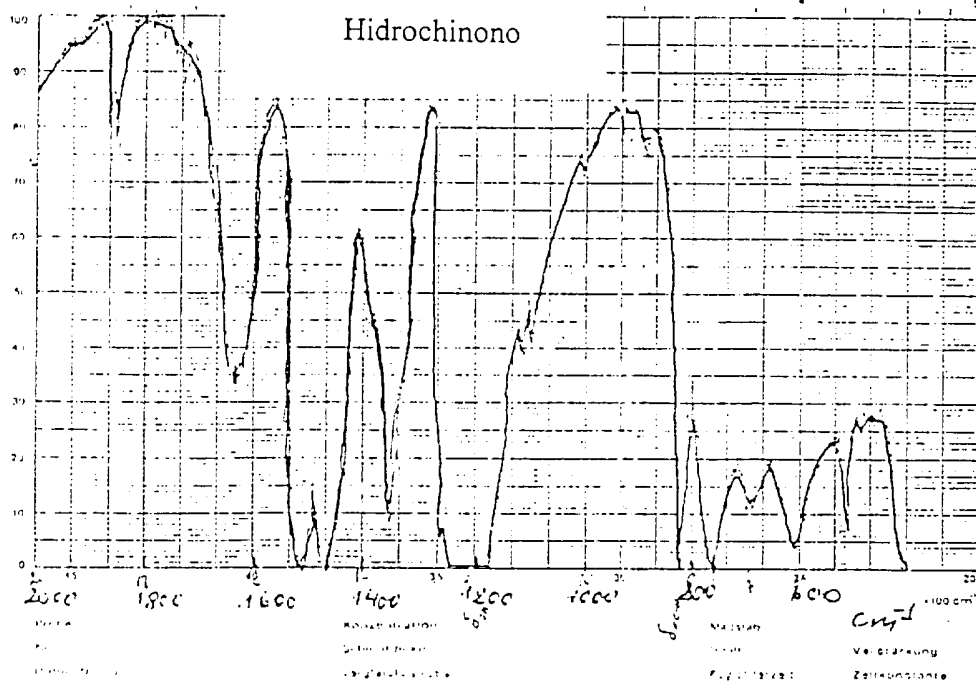


Fig. 11

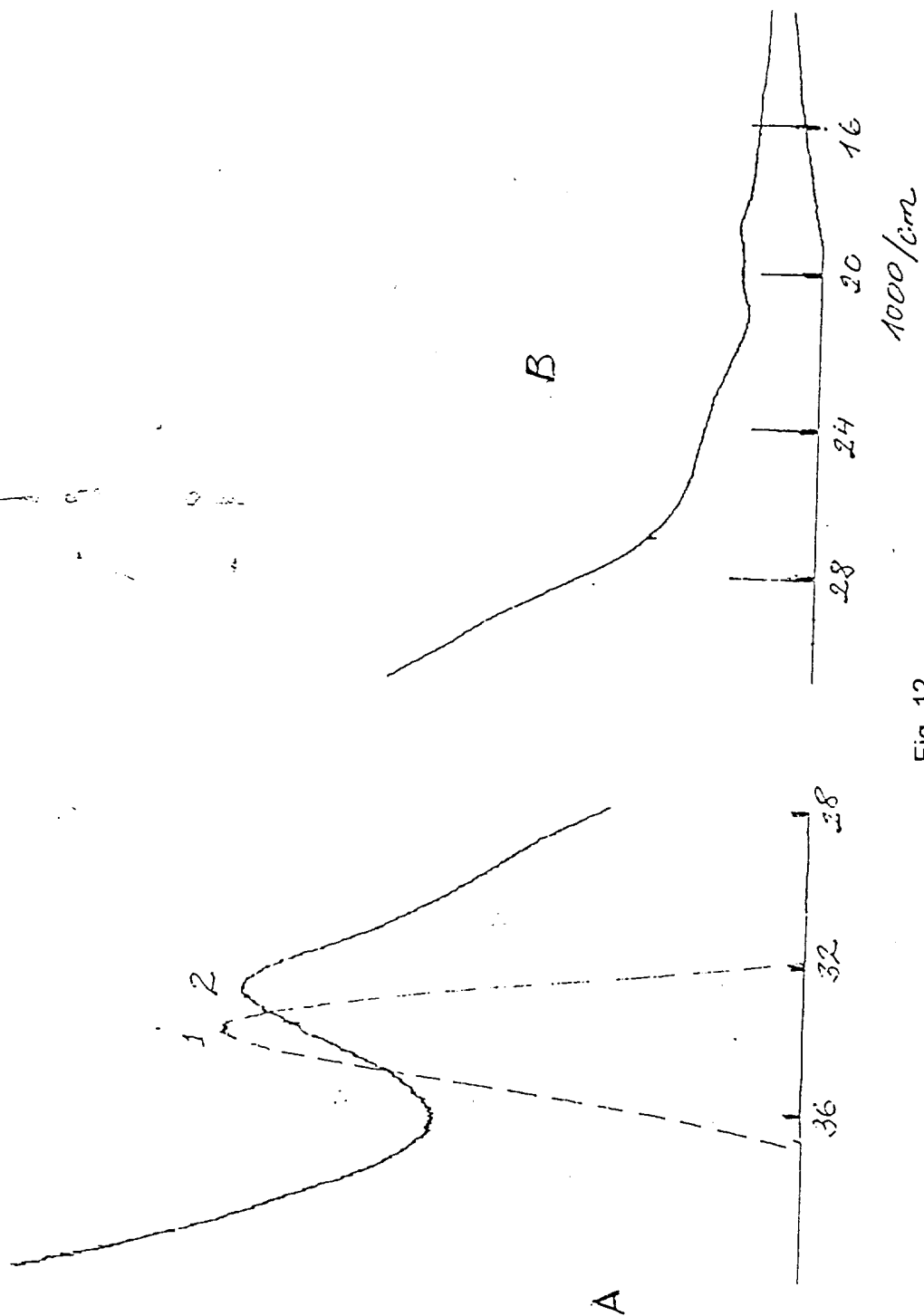


Fig. 12

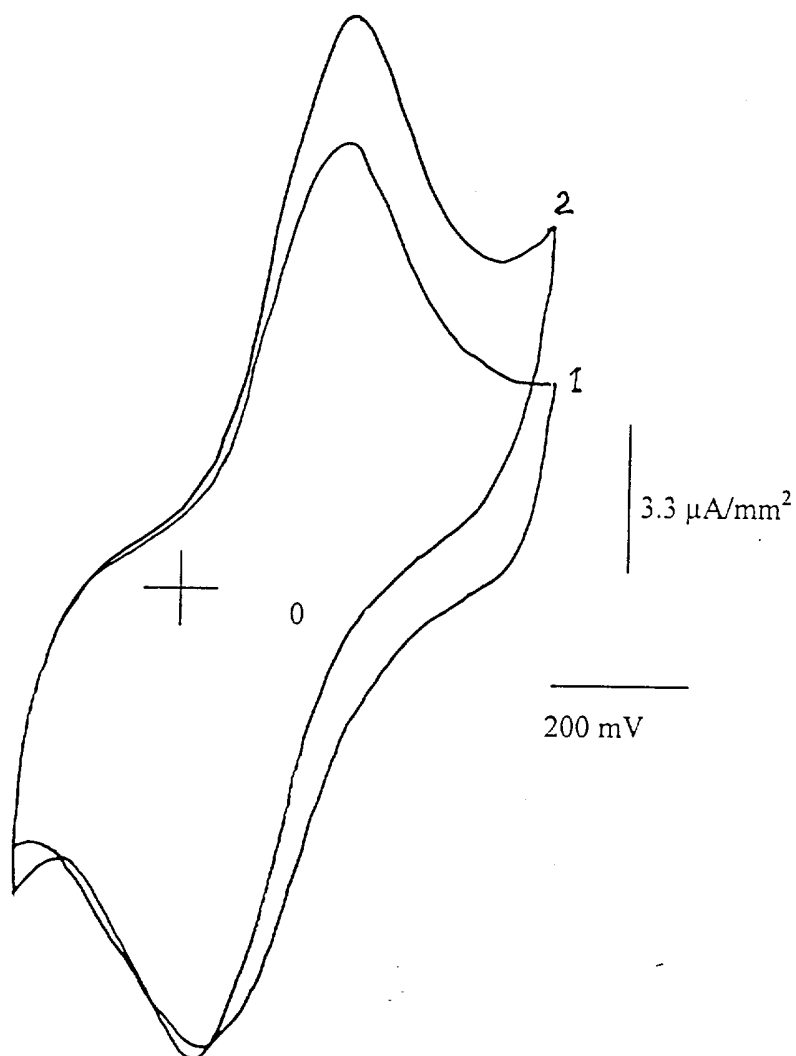


Fig. 13

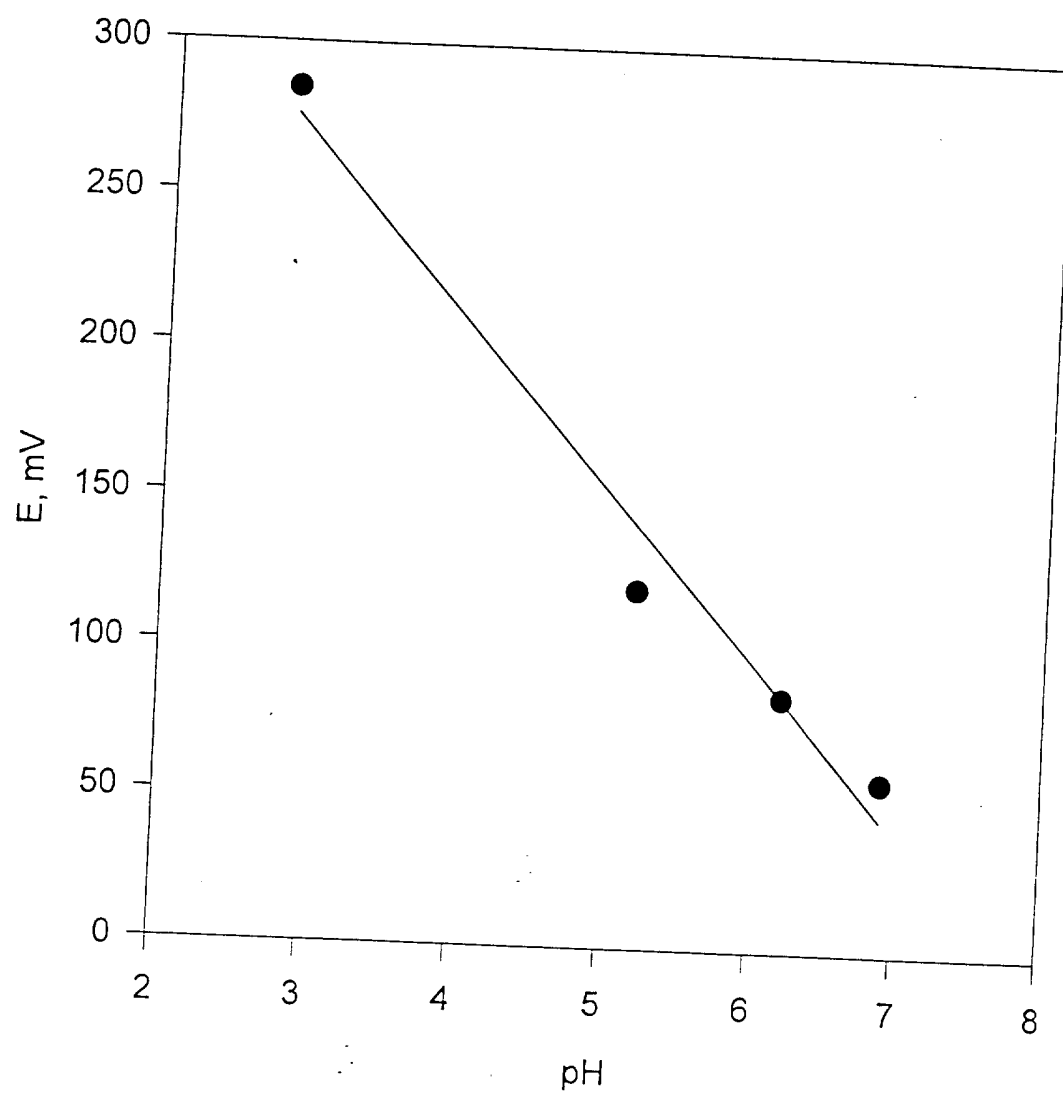


Fig. 14

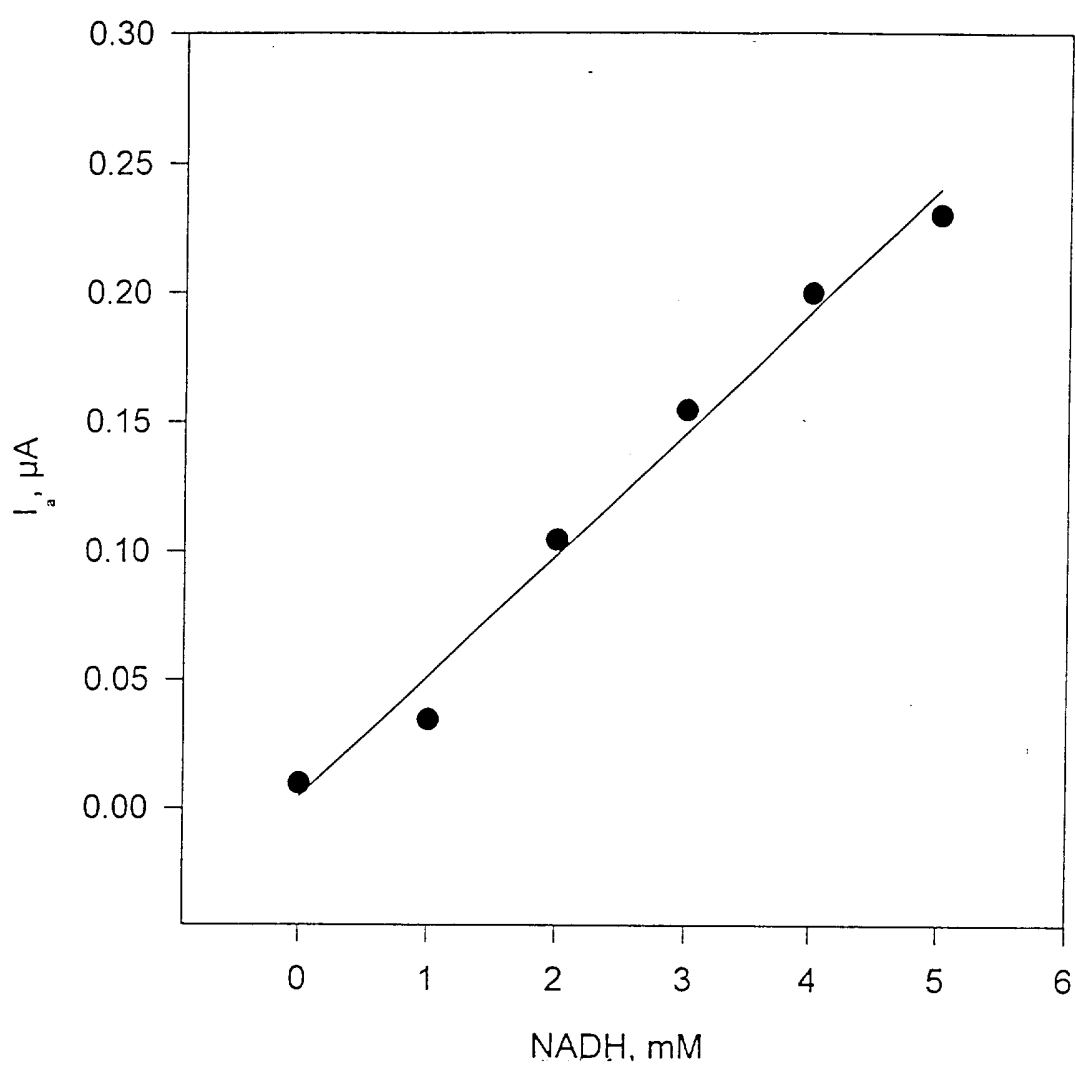


Fig. 15

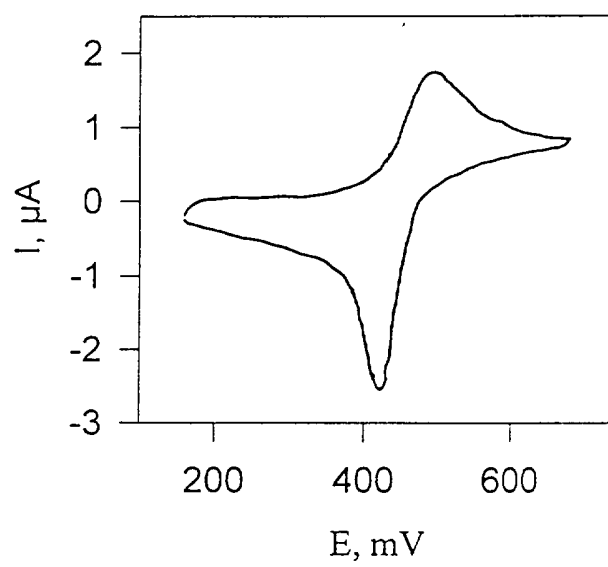


Fig. 16

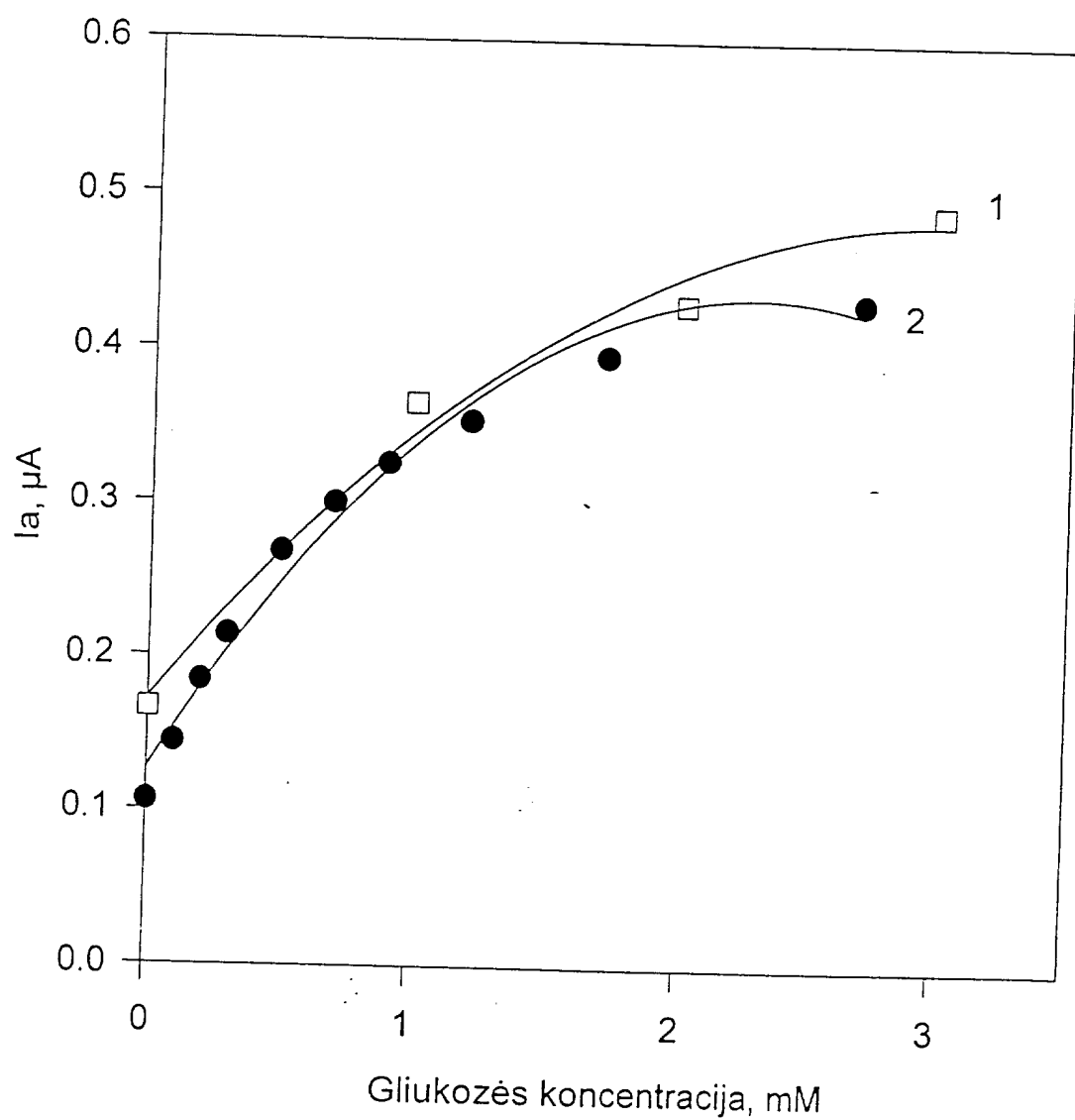


Fig. 17

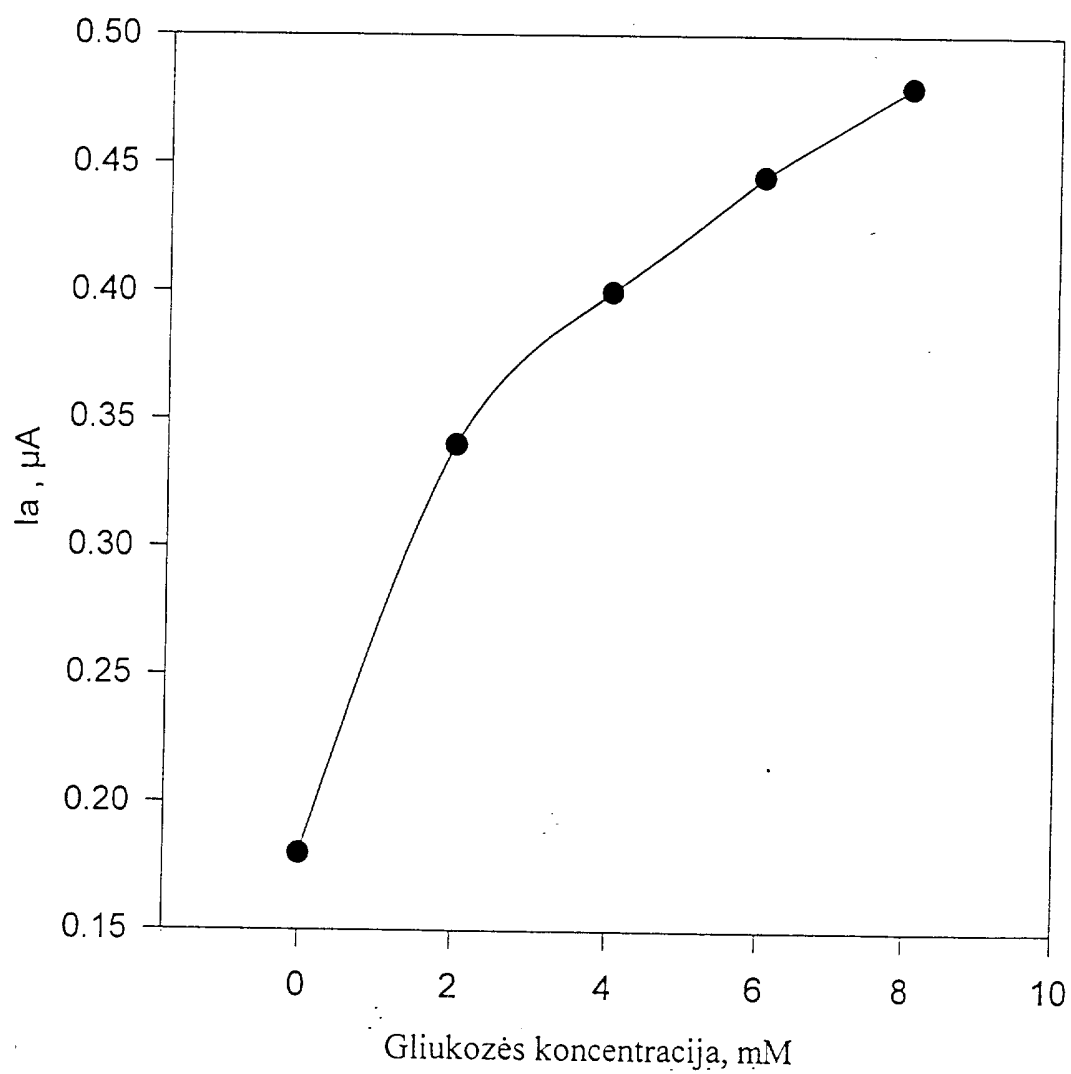


Fig. 18

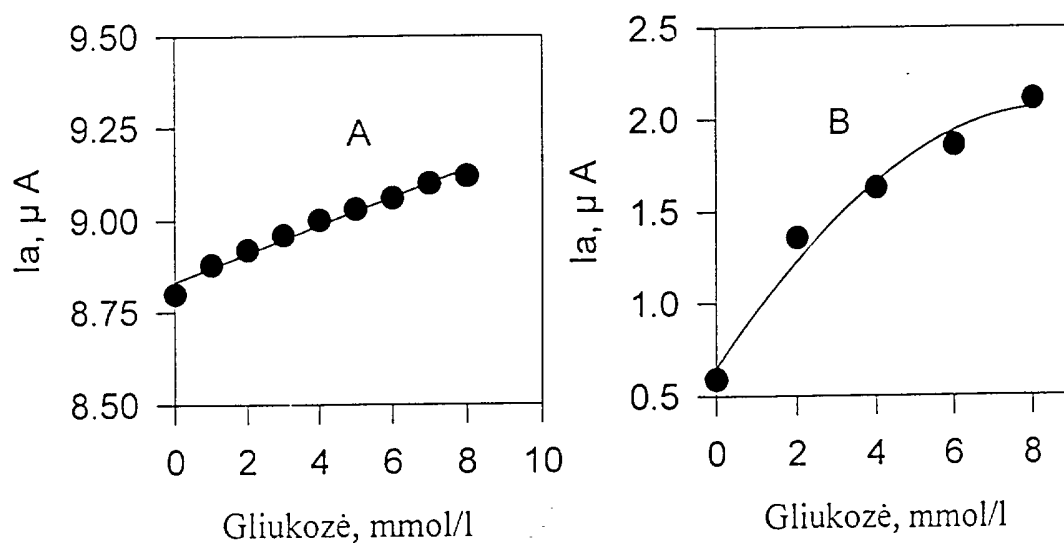


Fig. 19

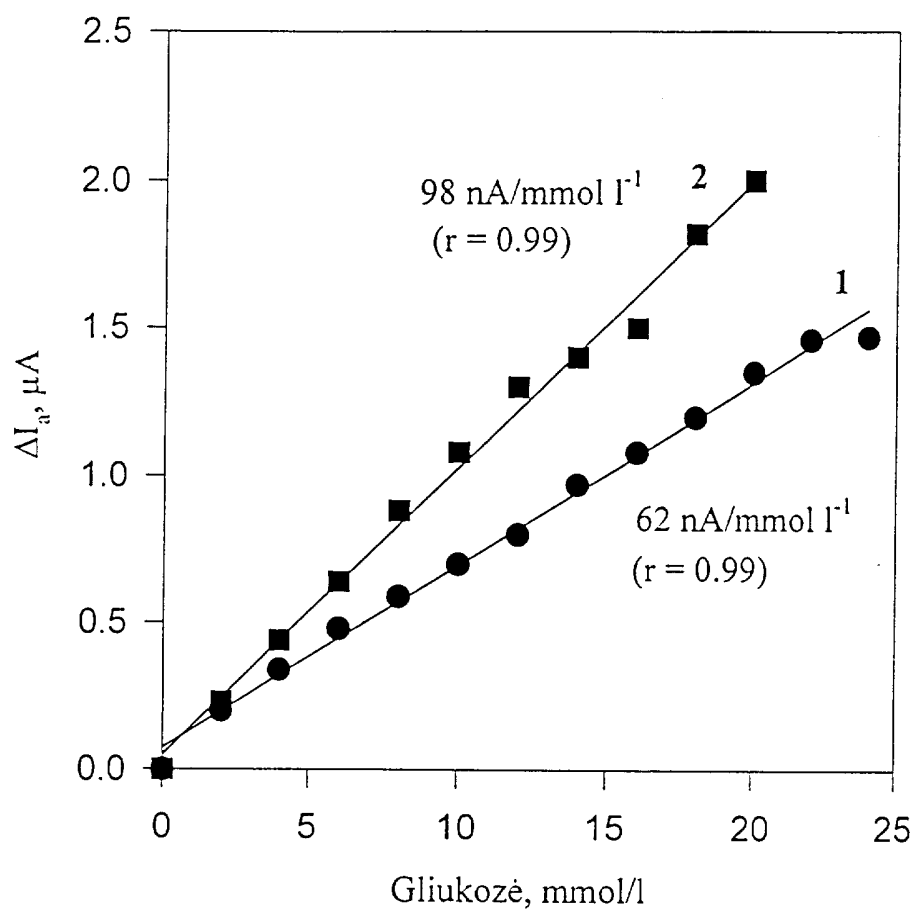


Fig. 20