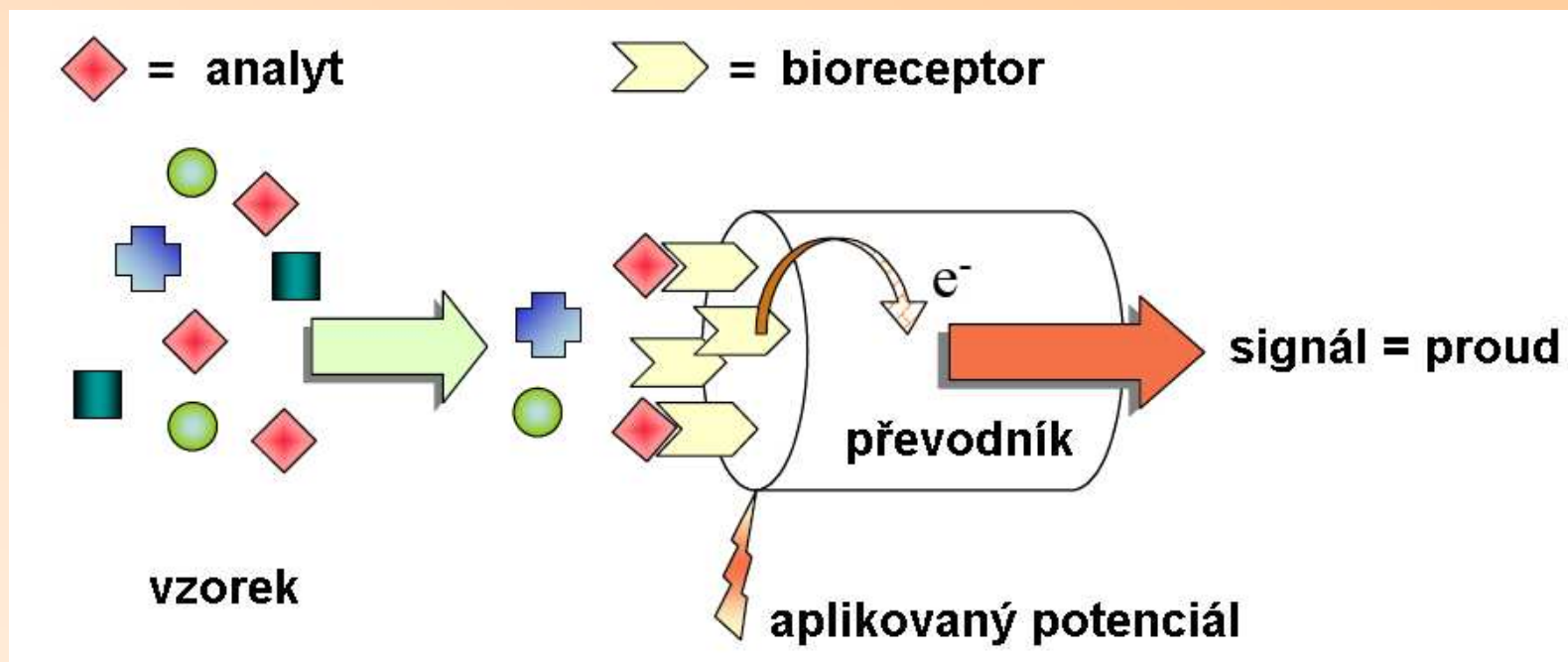


MEMBRÁNY AMPEROMETRICKÝCH SENSORŮ

Literatura:

Petr Skládal: Biosensory (elektronická verze)

Zajoncová L. Pospíšková K.(2009) Membrány
Amperometrických biosensorů. *Chem. Listy*



Belluzo 2008

upravila Pospošková K. Diplomová práce 2009

Měření peroxidu vodíku

Anodická oxidace peroxidu vodíku
potenciál: +600 mV



Proud na pracovní elektrodě:

- ❖ vyšší než odpovídá analytu
- ❖ nižší než odpovídá analytu

INTERFERENCE

- ❖ přítomnost oxidabilních látek v analytu
- ❖ usazování látek na elektrodě
- ❖ přítomnost těže látky v analytu, která vzniká během katalytické reakce

Oxidabilní látky v analytu

Snadno se oxidují na elektrodě, čím zvyšují proud (signál)

kys. askorbová, kyselina močová, močovina, cystein atd.

léčiva (paracetamol, acetaminofen, ampicilin, mannitol, digoxin, dopamin, penicilin, salicylát atd.

Usazování látek na elektrodě

biologické tekutiny: biomolekuly
nános elektroneaktivních látek
vysoké mol. hmotnosti na pracovní elektrodě

signál se snižuje

Přítomnost těžé látky v analytu, která vzniká během katalytické reakce

Eliminace glukosy:

Příklad: stanovení disacharidů v analytech obsahujících glukosu pomocí **pyranosaoxidasy**

Eliminace: 1) glukosu spotřebovat fosforylací ATP pomocí hexokinasy:



2) antiinterferenční vrstva (glukosaoxidasa + katalasa) peroxid vodíku, který vzniká se rozkládá pomocí katalasy, funguje do 2 mM koncentrace

Eliminace amoniaku

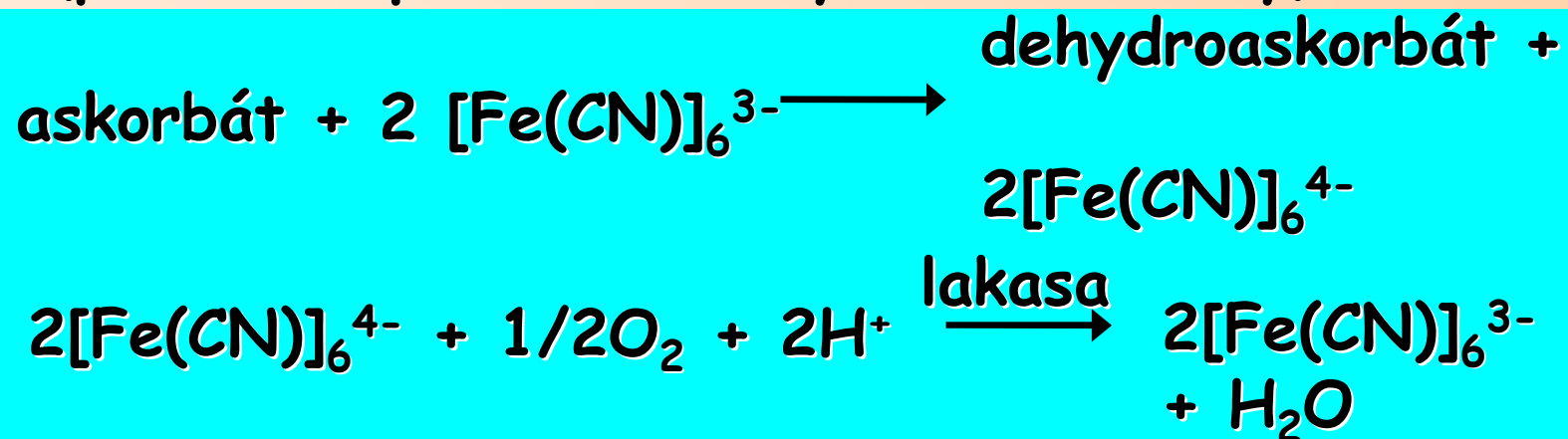
amoniak = produkt a současně
přítomen volný ve vzorku (sérum, moč)

Eliminace: pomocí glutamátdehydrogenasy:



eliminace kyseliny askorbové

- ✓ předřazení membrány s askorbátoxidásou (neprodukuje peroxid vodíku)
- ✓ použití ferrikyanidu ve spojení s lakasou (bez lakasy by vadil vzniklý ferrokyanid)
- ✓ provedení elektrooxidace askorbátu ještě před příchodem do biokatalytické vrstvy (přeřazení platinové sít'ky nebo trubičky)



eliminace kyslíku z blízkosti elektrody
při oxidaci glukosy glukosaoxidase

ŘEŠENÍ INTERFERENCÍ

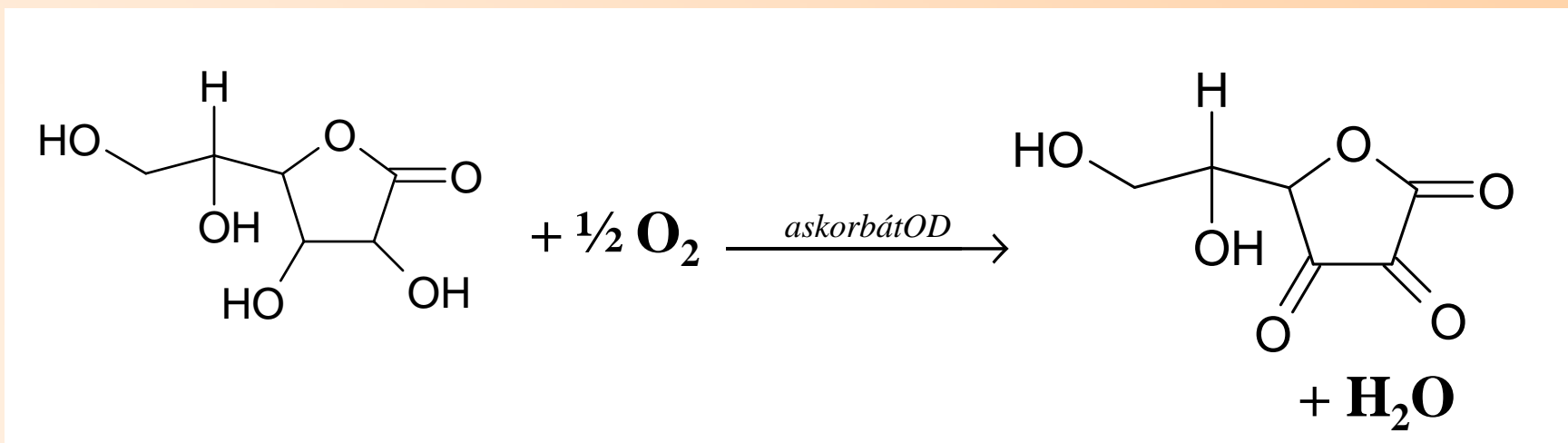


1. způsob:

převedení rušivé složky na formu, která není elektroaktivní

Příklady:

1) kys. askorbová - membrána s askorbátóidasou



2) glukosa při stanovení disacharidů (sacharosa)
membrána: hexokinasa + ATP + MgCl₂

glukosa → glukosa-1-fosfát



2. způsob

překrytí pracovní elektrody membránou

- imobilizační
- ochrannou

Imobilizace biorekogniční vrstvy

tvorba membrán:

- význam pro upevnění enzymu k povrchu elektrody
- dostatečně hustá membrána zabraňuje přístupu interferujících látek k povrchu elektrody

Provedení immobilizace má vliv na:

- ✓ operační stabilitu biosensoru
- ✓ životnost biosensoru
- ✓ dobu odezvy biosensoru

Způsoby vzniku immobilizačních membrán:

- ✓ fyzikální
- ✓ chemické
- ✓ elektropolymerace

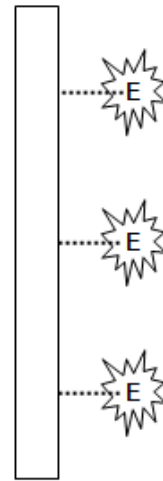
Způsoby imobilizace enzymů

zachycení ve struktuře gelu



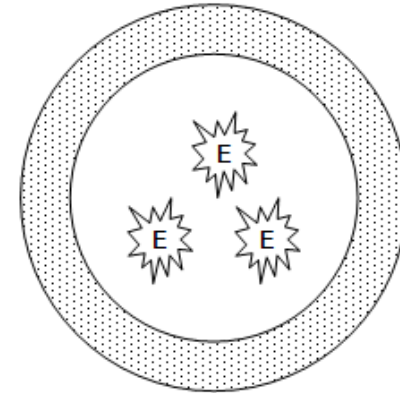
a

adsorpce



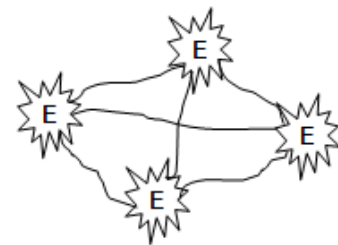
b

enkapsulace



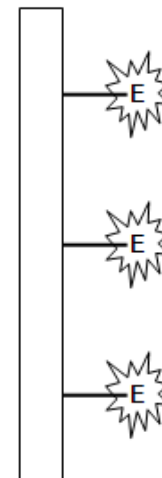
c

d



zesíťování

e



kovalentní vazba

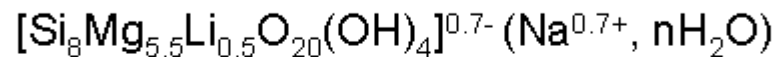
Fyzikální způsoby imobilizace

- ❖ **mechanické -dialyzační membrána**
celulosa, acetylcelulosa, polykarbonáty
celofán, polyamidová síťka
řez z rostlin, mikrobiální pasta
- ❖ **adsorpce na převodník**
van der Waalsovy síly, iontové,
vodíkové vazby, hydrobní interakce
kontaminace adsopčního povrchu
- ❖ **zachycení enzymu ve struktuře matrice či gelu**
enzym v roztoku, pohyb omezen
strukturou matrice
porovitost materiálu = kontakt se
substrátem

materiál matrice: anorganický
 organický

anorganický materiál matrice

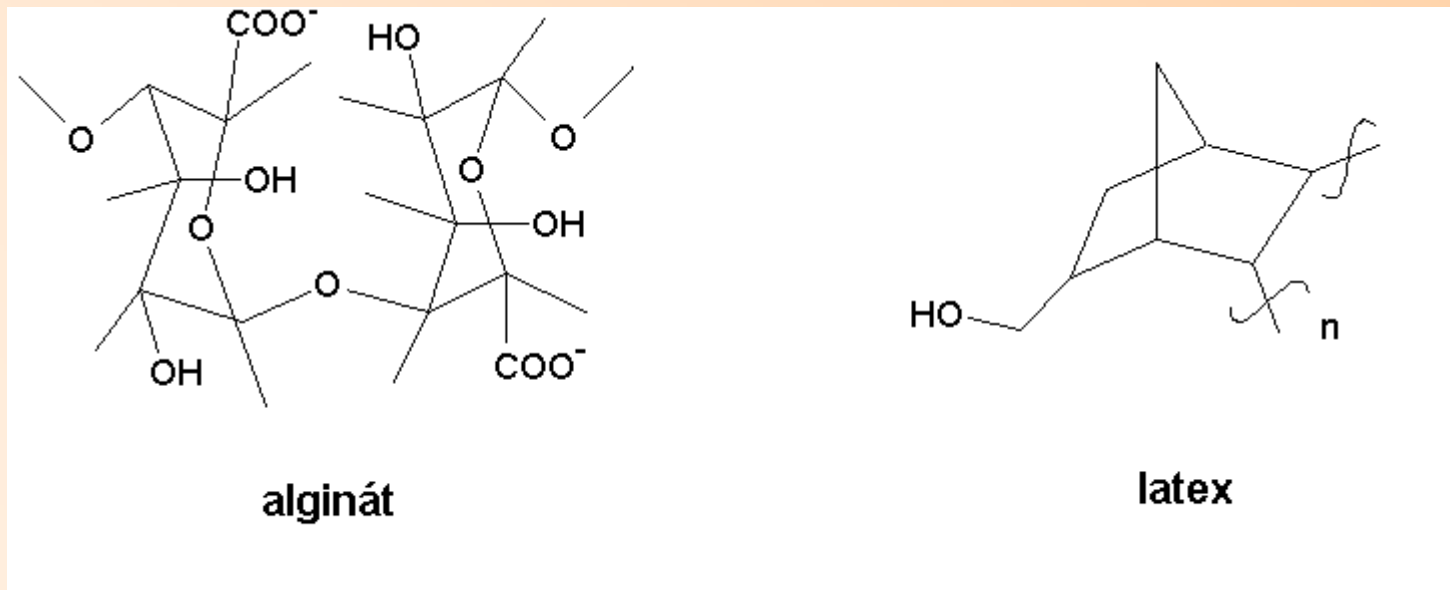
- koloidní zlato
- křemičitanové sklo
- V_2O_5
- laponit
- Al_2O_3 boemit (C nebo Pt elektroda)



laponit

organický materiál matrice

- ❑ alginát (1,4-vázané β -D-manuronové a α -L-guluronové kys.zbytky)
vznik v přítomnosti Ca^{2+} nebo Mg^{2+}
zachycení, enkapsulace
imobilizace *Rhodococcus* sp. - enzym alkyhalidohydrolasa
[EC 3.8.1.1]
- ❑ latex latex+enzym= nerozpustná matrice
- ❑ polyvinylová pryskyřice Formvar



Chemické postupy imobilizace

- ❖ přímo na převodník
- ❖ na membránu

Membrány:

- nylonová síťka (aktivace dimethylsulfátem)
- celuloacetátová membrána
- polyvinylalkohol
- polyvinylalkohol s 1,3% styrylbipyridinových skupin (PVA-SbQ)
aktivace UV světlem

imobilizační činidla:

- glutaraldehyd
- karbdiimidy

Elektropolymerace

- oxidace monomeru elektrochemicky při vhodném potenciálu
- za vzniku volných radikálů
- radikály jsou adsorbovány na povrchu elektrody
- vzniká polymerní síť

elektropolymerace:

- ✓ potenciostaticky
- ✓ amperostaticky
- ✓ potenciodynamicky

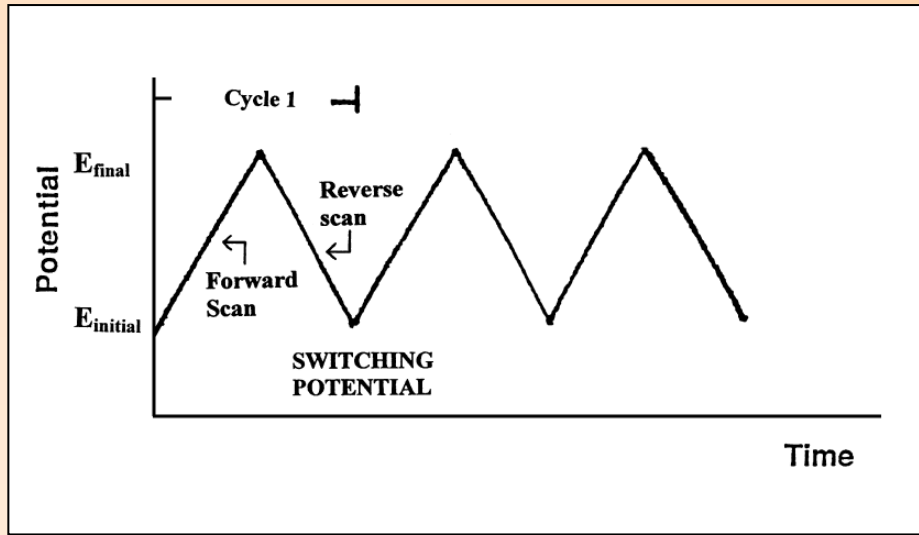
dynamické změny:

- ✓ lepší adheze povrchu
- ✓ hladké filmy

statické změny:

- ✓ lepší kontrola tloušťky filmu

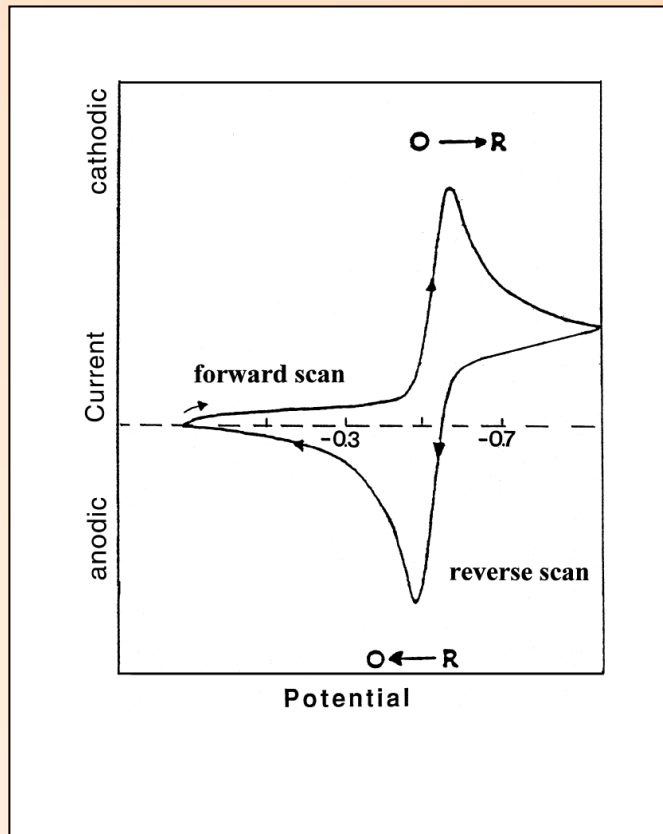
Cyklická voltametrie



lineární skenování potenciálu
stacionární pracovní elektrody
s využitím trojúhelníkového
průběhu potenciálu v čase

Cyklická voltametrie

potenciál se mění z výchozí hodnoty ke zlomovému potenciálu pak následuje zpětný běh

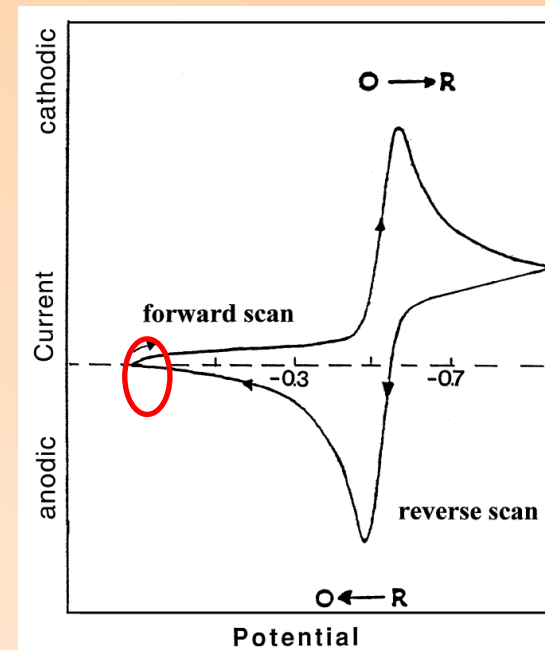
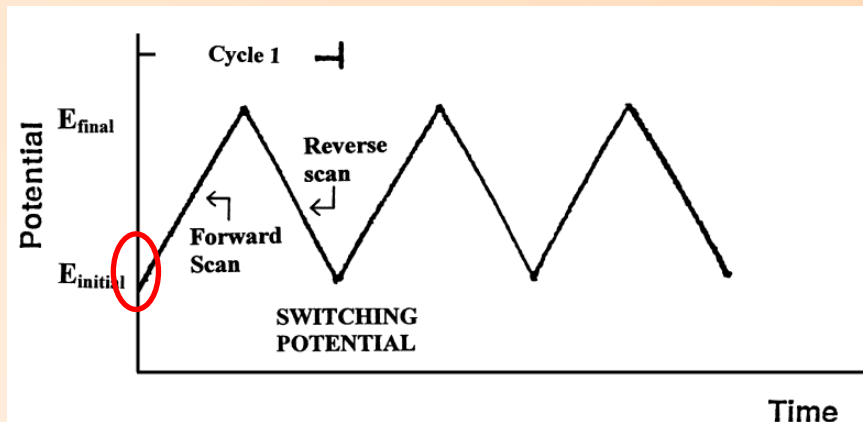


Křivka závislosti proudu na napětí
voltamogram

důležitý parametr:
rychlost změny potenciálu
5 mV/s až 200 mV/s

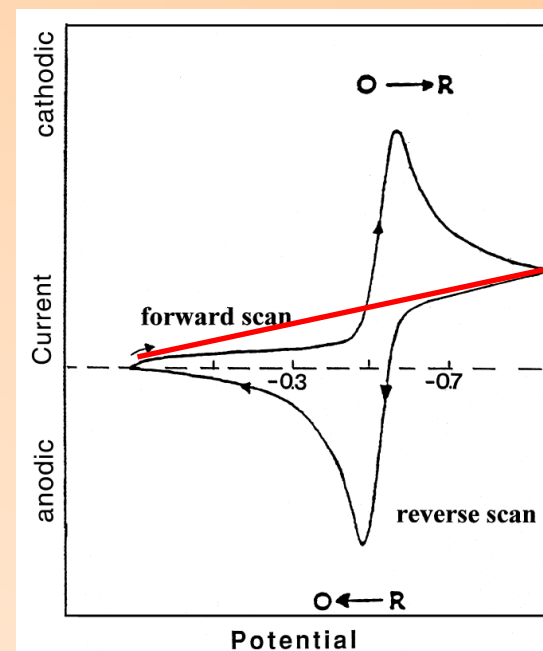
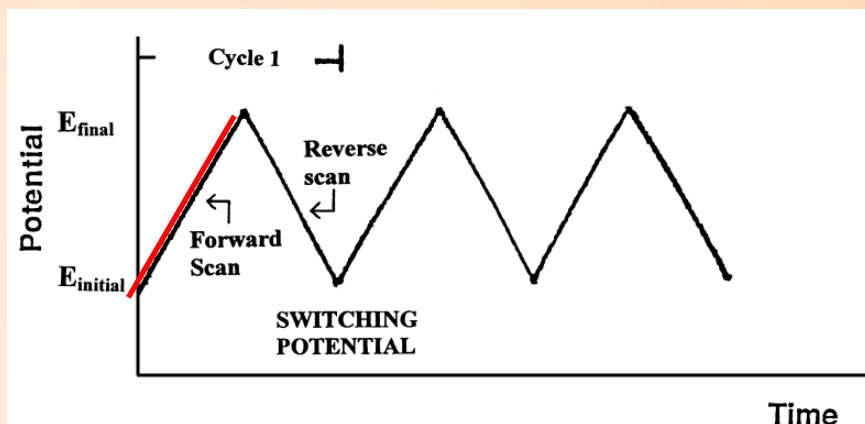
na počátku:

neprobíhá žádný děj
velikost potenciálu je daná tak, aby systémem tekla
pouze malý proud



redukční děj:

hodnoty I se zvyšují (oxidace redukované formy)
oxidovaná forma látky se spotřebovává
při určitém E je $\max. I$, pak dochází k poklesu I
katodický proud



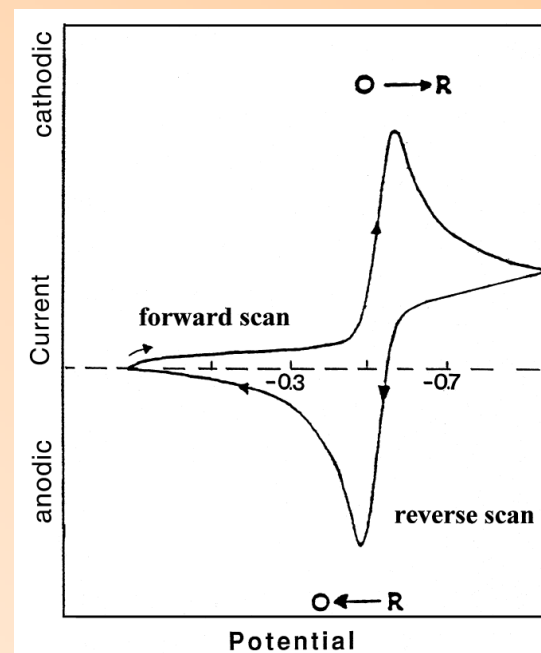
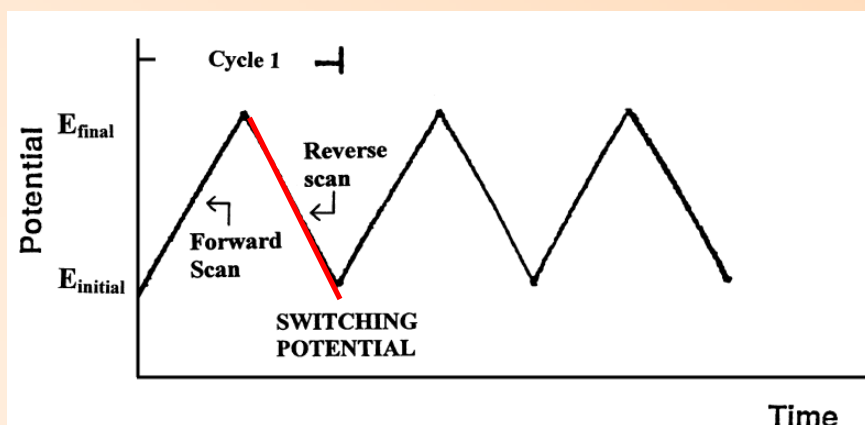
oxidační děj:

dochází k oxidaci redukované formy látky

roste **anodický proud**

proud roste do určité hodnoty E , pak klesá

až do vyčerpání red. formy látky, dojdeme do výchozího stavu



z hlediska vodivosti:

- ✓ vodivé
- ✓ nevodivé

kombinace různých polymerů - **kopolymery**
více vrstev na sobě (různé monomery)

Vodivé polymery

π elektrony na povrchu polymerů

- ✓ vodivost
- ✓ nízký ionizační potenciál

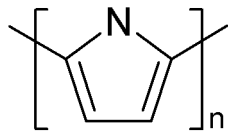
do polymeru lze zachytit:

- ✓ enzym
- ✓ protilátky
- ✓ fragmenty DNA
- ✓ živé buňky
- koenzymy
- mediátory
- stabilizátory

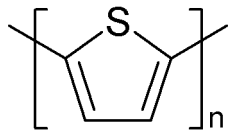
elektrody

- ✓ Pt
- ✓ skelný uhlík
- ✓ zlato
- ✓ uhlíkové vlákno
- ✓ TiO_2 nebo SnO_2

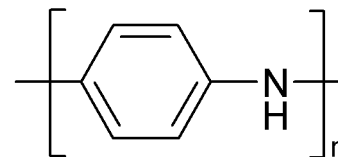
Příklady vodivých polymerů



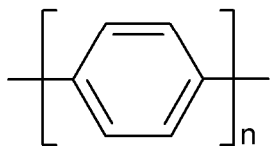
polypyrrol



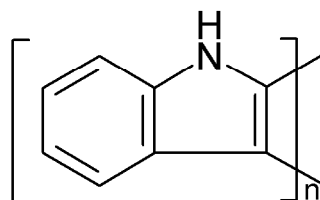
polythiofen



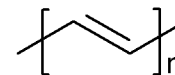
polyanilin



poly(p-fenylen)



polyindol



polyacetylen

Imobilizace enzymu na povrch polymeru

- adsorpčními silami
- zesíťením
- kovalentní vazby
 - monomer s funkčními skupinami
 - zavedení funkčních skupin do polymeru

Nevodivé polymery

nepoužívají se pro imobilizace
obvykle se využívají jako selektivní membrány

Ochranné membrány

Cíl:

- ✓ snížení vlivu elektroaktivních látek (zvyšují signál)
- ✓ ulpívání makromolekul na povrchu elektrod (snižují s.)

Dva typy ochranných membrán:

- ✓ polymerní selektivní membrány
- ✓ elektropolymerací vzniklé nevodivé polymery

Polymerní selektivní membrány

- ❖ celuloacetátová membrána
hustá membrána (snižuje signál H_2O_2 , vliv pH)
- ❖ celuloacetátová membrána upravená hydrolýzou
lepší vlastnosti (lepší signál H_2O_2)
- ❖ polykarbonát
- ❖ polyuretan
- ❖ polyethersulfonát

Nevodivé polymery vzniklé elektropolymerací

- ✓ eliminují vliv elektroaktivních látek na povrchu Pt elektrody
- ✓ nesnižují signál vznikající H_2O_2

Vlastnosti nevodivých membrán:

- selektivita
- reprodukovatelnost
- matrice pro imobilizaci enzymu
- zabraňují ulpívání makromolekul na povrchu elektrod

Charakterizace nevodivých membrán

- ✓ vysoký měrný odpor
- ✓ růst polymerů je limitován
- ✓ tenčí membrány než vodivé (v řádech desítek nm)
(lepší difúze H_2O_2 , substrátu a produktů)

Polymerace:

- ❖ fenolů
3-nitrofenol, pyragallol, 4-hydroxybenzensulfonové k.,
bromfenové modři, 3-aminofenolu
- ❖ fenylendiaminů (DAB)
1,2-DAB, 1,3-DAB, 1,4-DAB, p-chlorfenylamin
- ❖ naftalenů (NAF)
2,3-NAF, 1,5-NAF, 1,8-NAF, 5-amino-1-naftol
- ❖ oxidací pyrrolu
pyrrol je vodivý, jeho další oxidací vznikají nevodivé fil
„overoxidized pyrrol
- ❖ eugenol

Difuzní- vnější membrány

- Substrát k membránovému systému -konvenční difuzí (způsob míchání, rychlost průtoku analytu celou)
- Substrát do prostoru enzymové matrice -difuzí (konc. analytu v enzymové matrici je odlišná od konc. v měřeném roztoku)

na výsledný analytický signál má vliv:

- ✓ enzymová reakce
- ✓ difúze (určí jaká část analytu bude enzymově přeměněna)

Kompatibilita vnější membrány s prostředím

- ✓ vodné roztoky
- ✓ živý organismus

živý organismus:

- zánětlivá reakce - poškození zdraví člověka, zvířete
- znehodnocení vlastního stanovení

význam vnější membrány:

- zabraňuje ulpívání makromolekul na povrchu elektrody
- zabraňuje růstu mikroorganismů
- zlepšuje linearitu stanovení
- zlepšuje životnost biosensoru
- preventivní ochrana před interferencemi

typy difuzních membrán

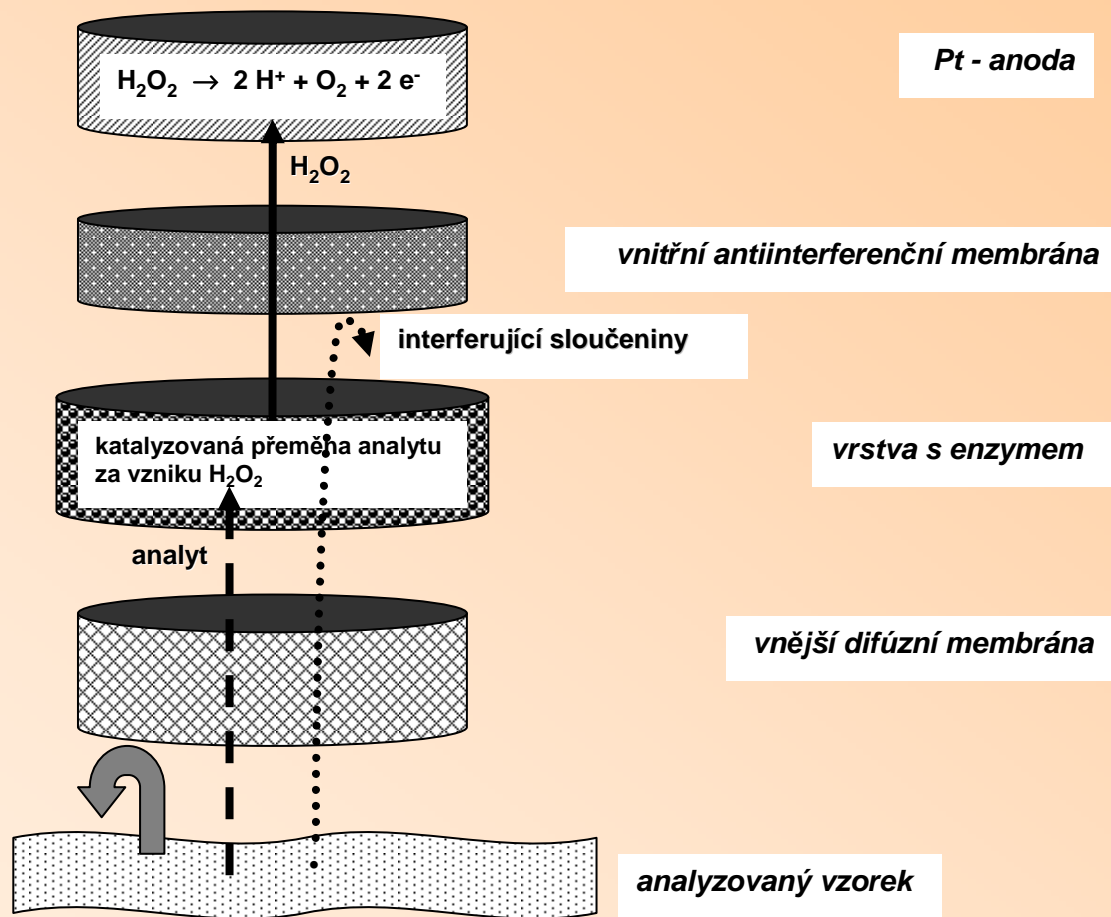
- polyuretan
- hydrofilní polyuretan
- nafion
- polykarbonát
- silikonový kaučuk
- perfluorkarbonát

SHRNUTÍ

Anodická oxidace H_2O_2 při +600 mV



- proud:**
- vyšší** - přítomnost produktu v analytu
 - oxidabilní látky
 - nižší** - biomolekuly
- přítomnost produktu**
- převedení na jinou látku (reakcí, membránou)
- oxidabilní látky**
- převedení na jinou látku
 - membrána (zábrana přístupu)
- biomolekuly**
- eliminace difuzní membránou
 - eliminace jinou membránou (ochranná imobilizační)



membrány:

- ❖ ochranné vnitřní
- ❖ imobilizační s enzymovou vrstvou
- ❖ difúzní vnější

dobrá imobilizační membrána může nahradit ochranou

ochranná membrána:

- ✓ polymerní
- ✓ elektropolymerační
 - vodivá (spíše pro imobilizaci)
 - nevodivá (ochranná, vhodná i pro imobilizaci)

difúzní:

- ✓ ochranné (zabraňují přístupu biomolekul)
- ✓ řídí množství analytu k enzymové vrstvě
- ✓ částečně chrání před přístupem oxidabilních látek