

ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ

Принцип действия и устройство ферментных электродов

Основой ферментных электродов являются электрохимические датчики (электроды):

- 1) Амперометрические (платиновые, золотые, угольные электроды, кислородный электрод Кларка (из платинового катода, серебряного анода, электролита и газопроницаемой полимерной мембраны))
- 2) Потенциометрические (ионоселективные электроды, например стеклянный электрод для измерения рН, газовый мембранный электрод)

Датчик и фермент объединяют в единую конструкцию растворимый Е или Е, иммобилизованный на растворимом носителе, помещают в приэлектродный слой, который отделен от остального пространства полупроницаемой мембраной.

Е иммобилизуют непосредственно на поверхности электрода

к поверхности электрода прикрепляется мембрана (целлюлозная, поликарбонатная) с ковалентно иммобилизованным Е.

к поверхности электрода прикрепляется Е в полимерной или гелевой пленке альбумина, желатина, коллагена, гидроксида алюминия.

Общий вид работы ферментного электрода:
молекулы субстрата диффундируют из раствора в
реакционный слой



подвергаются химическим превращениям под
воздействием фермента.



изменение исходной концентрации вещества, к
которому селективно чувствителен электрод



изменения потенциала или тока

На первой стадии происходит выравниванию
локального градиента концентрации



устанавливается *стационарное состояние*
(скорость ферментативной реакции равна скорости
диффузии, а сигнал электрода постоянен и
пропорционален скорости реакции).



Если электрод чувствителен к Р– сигнал будет
увеличиваться. Если на S -сигнал будет
уменьшаться

Амперометрические электроды

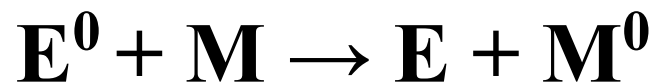
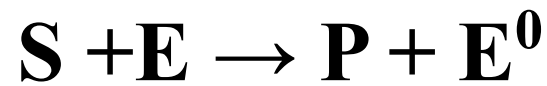
При использовании амперометрического способа регистрируется ток, проходящий через ячейку, где находятся электрод с ферментом и электрод сравнения, на которые накладывается заданное электрическое напряжение.

Между током (i) и концентрацией определяемого компонента (C_x) существует вполне определенное соотношение:

$$C_x = f(i).$$

В амперометрических ферментных электродах часто применяют, E класса оксидаз (окисление различных S кислородом).

Е в режиме **амперометрического биосенсора** ускоряет процесс обмена электронами между **S** и **электродом** : 1. Перенос электронов с помощью медиатора – диффузионно-подвижного промежуточного низкомолекулярного переносчика электронов, к-рый выбирается из числа специфических субстратов фермента, проявляющих электрохимическую активность на электроде:



где **E**, **E⁰** – окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; **M**, **M⁰** – окисленная и восстановленная формы медиатора

2. Прямой электрокаталитический перенос электронов между электродом и активным центром фермента:

Пример : лакказа (Cu-содержащая оксидаза), сорбированная на электроде.



3. Перенос электронов между активным центром фермента и доменами в полупроводнике при включении ферментов в органические полупроводники.

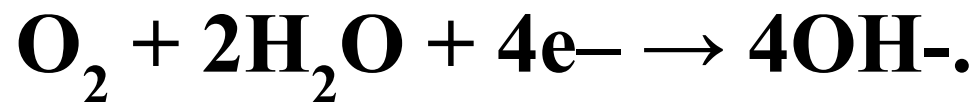
Амперометрические ферментные электроды применяют в медицине, в микробиологической и пищевой промышленности для опре-я концентрации глюкозы.

Принцип действия ферментного электрода для измерения концентрации глюкозы амперометрическим методом:

Платиновый катод отделен от окружающей среды двухслойным покрытием.

Первый слой представляет собой мембрану с иммобилизованной **глюкозооксидазой**.

Второй слой сформирован тефлоновой мембраной, проницаемой для кислорода (O_2 свободно диффундирует через эту мембрану и восстанавливается на катоде):



Восстановление каждой молекулы кислорода сопровождается переносом 4 электронов.

Ток, протекающий через измерительную ячейку, пропорционален концентрации O_2 .

Если поместить электрод в раствор глюкозы, на мембране, содержащей **глюкозооксидазу**:



В результате окисления глюкозы содержание кислорода в среде будет снижаться, что приведет к уменьшению стационарного тока.

Потенциометрические ферментные электроды
устроены аналогично амперометрическим.

Отличие: с реакционным слоем контактирует
ионоселективный электрод, а не электрод из
благородного металла.

В измерительной ячейке, где находятся
ионоселективный электрод с ферментом и
электрод сравнения, возникает разность
потенциалов, которая зависит от активности
потенциалоопределяющих ионов в растворе:

$$E = E_0 + (2,3RT/nF) \lg a \text{ (уравнение Нернста)}$$

• $E = E_0 + (2,3RT/nF) \lg a$ (уравнение Нернста)

E – разность потенциалов между ионоселективным электродом и электродом сравнения, мВ;

E_0 – константа, зависящая в основном от свойств электрода сравнения;

R – универсальная газовая постоянная (8.31 Дж/(моль·К))

n – заряд иона с учетом его знака;

F – постоянная Фарадея (96485,35 Кл·моль⁻¹);

T – температура, К;

a – активность соответствующего иона ($a_{\text{окис}}/a_{\text{восст}}$)

Активность – эффективная концентрация свободных ионов в растворе. Активность и концентрация связаны соотношением:

$$a = \gamma C,$$

где a – активность, C – концентрация, γ – коэффициент активности. Для очень разбавленных растворов активность ионов почти равна их концентрации.

Потенциометрические ферментные электроды:

- В качестве биокатализаторов в них выступают следующие ферменты:

оксидазы или декарбоксилазы аминокислот, уреаза, нитрит- и нитратредуктазы

- В качестве электрохимических датчиков —

стеклянный рН-электрод, а также газовые электроды для CO_2 , NH_3 и тд.

Амперометрических по сравнению с потенциометрическими электродами:

- + более высокая чувствительность
- высокий потенциал (500–900 мВ), при котором происходит детекция, что приводит к помехам определения из-за наличия других электроактивных веществ
- у кислородоселективного электрода к неточностям определения могут также привести колебания в концентрации кислорода в исследуемых образцах.

На время отклика (установление стационарного значения потенциала ферментного электрода) влияют :

- **скорость перемешивания раствора** (чем больше скорость, тем меньше время отклика);
- **концентрация субстрата** (рост концентрации приводит к уменьшению времени отклика);
- **толщина ферментного слоя** (чем толще слой, тем больше время отклика);
- **наличие полупроницаемой защитной мембраны** (увеличивает время отклика);
- **условия проведения ферментативной реакции** (температурный режим, pH).

Стабильность ферментного электрода зависит :

- способа иммобилизации фермента;**
- концентрации фермента в реакционном слое;**
 - толщиной ферментного слоя;**
- условий проведения ферментативной реакции**
(температурный режим, рН).

**Стабильность ферментных электродов— от
нескольких дней до нескольких месяцев**

Использование ферментных электродов в клинической практике

Методы (хроматографические, спектрофотометрические и др.), использующиеся в клинической практике:

- *длительные*
- *сложные*
- *непригодны для быстрого анализа большого числа образцов*
- *дорогостоящие, т.к. ферменты используются один раз и много различных реагентов.*
- Ферментные электроды решают эти проблемы.

Преимущества ферментных электродов:

- **простая методика**, не требующая значительных временных затрат;
- ВОЗМОЖНОСТЬ **ПОТОЧНОГО АНАЛИЗА**;
- **ВЫСОКАЯ СЕЛЕКТИВНОСТЬ**;
- **небольшое количество ферментов**, необходимых для проведения анализа, и возможность их многократного использования;
- **простая методика подготовки пробы.**

Недостатки ферментных электродов:

- **относительно большое время отклика**, связанное с временем, необходимым для осуществления диффузии субстрата;
- **необходимость частой градуировки электрода** в связи с зависимостью чувствительности от скорости потока и влияния посторонних химических веществ, например неорганических ионов на электродную функцию электрода.

Использование ферментных электродов в медицине

Объект измерений	Фермент	Преобразователь	Стабильность, сут	Скорость ответной реакции, мин	Область измерений, моль/л
Молочная кислота	Лактатдегидрогеназа (EC1.1.1.27)	Pt[Fe(CN) ₆ ⁴⁻]	7	3–10	2×10^{-3}
	Лактатоксидаза (EC1.13.12.4)	O ₂ -электрод	30	30 с	$5 - 2 \times 10^3$ мг/л
Креатинин	Креатиназа (EC3.5.2.10)	NH ₃ -электрод	—	2–10	$4 \times 10^{-2} - 9 \times 10^{-6}$
Пировиноградная кислота	Оксидаза пировиноградной кислоты (EC1.2.3.3)	O ₂ -электрод	10	2	$10^{-2} - 10^{-4}$
Пероксид водорода	Каталаза (EC1.11.1.6)	O ₂ -электрод	30	2	$3 \times 10^{-3} - 10^{-5}$
Катехины	Катехин-1,2-оксигеназа (EC1.13.11.1)	O ₂ -электрод	—	2–3	$10^{-4} - 5 \times 10^{-7}$
Холестерин	Холестерин-эстераза (EC3.1.1.13)	Pt-электрод	30	3	$10^{-2} - 3 \times 10^{-5}$
	Холестерин-оксидаза (EC1.1.3.7)	Pt (H ₂ O ₂)	—	2	$10^{-2} - 10^{-5}$
Нейтральные липиды	Липаза (EC3.1.1.3)	pH-электрод	14	1	5–50 мг/л
Фосфолипиды	Фосфолипаза (EC3.1.1.4)	Pt-электрод	30	2	$10^2 - 5 \times 10^3$ мг/л

Ферментные электроды используются:

- выявления тех или иных метаболитов;
- анализа ферментов сыворотки крови, представляющих диагностическую ценность (АлАТ, АсАТ, глутаматпируваттрансаминаза и др.)

Содержание фермента оценивается косвенно, исходя из активности фермента.

• Глутаматпируваттрансаминаза катализирует реакцию:



Кислородный электрод с иммобилизованной оксидазой ПВК, который и определяет его количество.

Иммуноферментные электроды

К кислород-проницаемой тефлоновой пленке кислородного электрода Кларка плотно прилегает мембрана *не с иммобилизованным ферментом, а с иммобилизованными антителами* к анализируемому антигену.

В раствор, содержащий анализируемый антиген, добавляют определенное количество антигенов, предварительно меченных каталазой.



Иммуноферментный электрод погружают в исследуемый раствор и выдерживают при нужной температуре в течение необходимого времени.



Меченые и немеченые антигены, *конкурируя* между собой, связываются с антителами на поверхности электрода.

Удаляют свободные антигены, путем промывки
иммуноферментного электрода



Добавляют в исследуемый раствор пероксид
водорода



По сигналу электрода определяют скорость
образования кислорода в результате
катализируемой каталазой реакции :



Строят кривую зависимости сигнала от числа
немеченых антигенов.

Аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами

Для анализа метаболитов и ферментов в клинической и лабораторной практике достаточно широко используются аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами.

Пример: определение триптофана

В колонке иммобилизованы Е: *триптофаназа и лактатдегидрогеназа*

триптофан + пиридоксальфосфат →

индол + NH_3 + ПВК;

ПВК + НАДН_2 → молочная кислота + НАД.

Детекция убыли НАДН на 360 нм

Ферментные микрокалориметрические датчики

Две идентичные колонки ,заполненных носителем с иммобилизованным на нем Е.

В нижней части каждой из колонок имеется термистор.

При пропускании через колонки простого буфера разность t° между термисторами будет равна нулю.

При введении в одну из колонок S в результате ферментативной реакции произойдет тепловыделение.

Разность t° между измерительной колонкой и колонкой сравнения будет пропорциональна количеству превращенного S.

