

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

2015

Ing. Vojtěch Polan

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra analytické chemie

ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY

DISERTAČNÍ PRÁCE

2015

AUTOR:
ŠKOLITEL:

Ing. Vojtěch Polan
prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Analytical Chemistry

ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

DOCTORAL THESIS

2015

AUTHOR: Ing. Vojtěch Polan
SUPERVISOR: prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 21.06. 2015

Vojtěch Polan

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. Ing. Karlu Vyřasovi, DrSc., za zadání zajímavého tématu a cenné rady a připomínky během studia. Také chci poděkovat své rodině za podporu a povzbuzení při studiu.

ANOTACE

Předložená disertační práce se zabývá porovnáním testovaných sloučenin rhodia a redoxních enzymů v amperometrických biosenzorech a jejich využitím. Podstatná část práce je věnována optimalizaci pracovních podmínek jednotlivých systémů, biosenzorů, a jejich následné využití při stanovení biologických látek. Taktéž byly studovány interference při analýze reálných vzorků.

Teoretická část popisuje jednotlivé typy biosenzorů, jejich rozdělení, biochemii enzymů a jejich imobilizaci. Dále je uveden přehled typů mediátorů a heterogenních uhlíkových materiálů.

V experimentální části byly zkoumány katalytické vlastnosti vybraných sloučenin rhodia (Rh, RhO₂, Rh₂O₃, chlorobis(2-fenyl-pyridin)rhoditý dimer) sloužících jako mediátory elektronového přenosu. Těmito sloučeninami byly modifikovány uhlíkové tištěné elektrody. Takto modifikované elektrody byly následně testovány při stanovení peroxidu vodíku, glukózy (elektrody modifikované enzymem glukóza oxidáza) a NADH pomocí amperometrické detekce ve spojení s průtokovou analýzou. Práce se dále zabývala výběrem imobilizace enzymu glukóza oxidázy různými imobilizačními technikami a látkami - zachycení v polymeru (acetát celulóza nebo nafion), zesílení biomolekul (glutaraldehyd) a elektropolymerizace (pyrrol nebo m-fenylendiamin).

Na závěr pak byly na základě zjištěných poznatků zkonstruovány amperometrické biosenzory s imobilizovanými enzymy - glukóza dehydrogenázou, alkohol dehydrogenázou a kofaktorem NAD⁺ a použity pro stanovení glukózy v reálných vzorcích, respektive stanovení etanolu ve vzorcích alkoholických nápojů.

KLÍČOVÁ SLOVA

biosenzor, enzym, mediátor, imobilizace

TITLE

Electrochemical biosensors

ANNOTATION

The subject of this work deals with the comparison of test rhodium compounds and redox enzymes in amperometric biosensors and its usage. A significant part of the work is devoted to optimizing the working conditions of individual systems, biosensors, and their subsequent use in the determination of biological substances. Interference in the analysis of real samples were also studied.

The theoretical part describes different types of biosensors, their division, biochemistry of enzymes and their immobilization. Further is mentioned an overview of the types of mediators and heterogeneous carbon materials.

In the experimental part catalytic properties of rhodium compounds (Rh, RhO₂, Rh₂O₃, chlorobis(2-phenylpyridine)rhodium(III) dimer) were tested which served as mediators of electron transfer on screen printed carbon electrodes used for determination of hydrogen peroxide, glucose (electrodes modified by glucose oxidase) and NADH. Measurements were made in flow injection system.

Subsequent part of work was focused on various techniques of immobilization of glucose oxidase - immobilization in polymer (cellulose acetate or Nafion), cross-linking immobilization of glutaraldehyd, electropolymerisation (m-phenylenediamine or pyrrol). According to new gained knowledge, new amperometric biosensors were constructed with immobilized enzyme glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase with cofactor NAD⁺. These biosensors were used for determination of glucose in the real samples and ethanol in samples of alcoholic beverages.

KEYWORDS

biosensor, enzyme, mediator, immobilization

OBSAH

1	Úvod	10
2	Teoretická část.....	10
2.1	Definice biosenzoru.....	10
2.2	Rozdělení biosenzorů podle biologické složky	10
2.2.1	<i>Biokatalytické senzory</i>	10
2.2.2	<i>Imunosenzory</i>	11
2.2.3	<i>DNA senzory</i>	11
2.2.4	<i>Biomimetické senzory</i>	12
2.3	Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně–chemického převodníku.....	12
2.3.1	<i>Optické biosenzory</i>	12
2.3.2	<i>Kalorimetrické biosenzory</i>	12
2.3.3	<i>Hmotnostní (piezoelektrické) biosenzory</i>	13
2.3.4	<i>Elektrochemické biosenzory</i>	13
2.4	Elektroanalytická měření v průtokových systémech.....	16
2.5	Objem a geometrie průtokové cely	18
2.6	Elektrody používané v amperometrii	18
2.6.1	<i>Pomocné elektrody</i>	18
2.6.2	<i>Referentní elektrody</i>	18
2.6.3	<i>Pracovní elektrody</i>	19
2.7	Heterogenní uhlíkové elektrody	19
2.7.1	<i>Uhlíkové pastové elektrody</i>	19
2.7.2	<i>Uhlíkové tištěné elektrody</i>	20
2.8	Enzymy.....	21
2.8.1	<i>Obecná charakteristika</i>	21
2.8.2	<i>Klasifikace enzymů</i>	22
2.8.3	<i>Struktura kofaktorů</i>	23
2.8.4	<i>Enzymová kinetika</i>	26
2.9	Imobilizace enzymů	27
2.9.1	<i>Chemická imobilizace</i>	28
2.9.2	<i>Fyzikální imobilizace</i>	29
2.10	Mediátory	31
2.10.1	<i>Obecná charakteristika mediátorů</i>	31
2.10.2	<i>Typy používaných mediátorů</i>	32
2.11	Uhlíkové nanotrubic (CNTs).....	34
2.11.1	<i>Struktura a vlastnosti uhlíkových nanotubic</i>	34
2.11.2	<i>Funkcionalizace</i>	35
2.12	Možnosti a využití amperometrických biosenzorů	35
3	Experimentální část, výsledky a diskuze.....	36
3.1	Sloučeniny rhodia jako mediátory.....	36
3.2	Imobilizace enzymu	36
3.3	Stanovení glukózy	37
3.3.1	<i>Enzym glukóza oxidáza</i>	37
3.3.2	<i>Enzym glukóza dehydrogenáza</i>	38
3.4	Stanovení etanolu	38
3.4.1	<i>Enzym alkohol oxidáza</i>	38
3.4.2	<i>Enzym alkohol dehydrogenáza</i>	39

3.5	Další použité enzymy	39
3.5.1	<i>Galaktóza oxidáza</i>	39
3.5.2	<i>Cholin oxidáza</i>	40
3.5.3	<i>Xantin oxidáza</i>	40
	Publikace č. 1	
	Rhodium and Its Compounds in Amperometric Biosensors Based on Redox Enzymes	41
	Publikace č. 2	
	Využití sloučenin rhodia v amperometrických biosenzorech	47
	Publikace č.3	
	Biosensor for determination of glucose	52
	Publikace č. 4	
	Screen-Printed Carbon Electrodes Modified by Rhodium Dioxide and Glucose Dehydrogenase	57
	Publikace č. 5	
	Biosenzory využívající dehydrogenázové enzymy a jejich využití	62
	Publikace č. 6	
	Tištěné uhlíkové elektrody modifikované RhO ₂ a glukóza dehydrogenázou	69
	Publikace č. 7	
	Determination of ethanol in alcoholic drinks using an enzyme biosensor containing alcohol dehydrogenase	74
	Publikace č. 8	
	Simple and Rapid Determination of Ethanol Content in Beer Using an Amperometric Biosensor	79
	Publikace č. 9	
	Využití tištěných uhlíkových elektrod modifikovaných RhO ₂ ke stanovení biologických látek v potravinách a klinických vzorcích	85
4	Závěr	91
5	Seznam literatury	92

1 ÚVOD

V současné době se stále více zvyšuje poptávka po rychlých, selektivních, spolehlivých a hlavně levných analytických metodách. Velká řada potravinářských výrobků mnohdy svou nízkou cenou vypovídá o použití ne zcela kvalitních surovin a zanedbané technologii. Pro ochranu spotřebitelů je nezbytné neustále kontrolovat produkované výrobky, zda-li nedošlo k jejich mikrobiální či jiné kontaminaci, zda byly dané technologické postupy dodrženy a byly použity uvedené suroviny. To klade na analýzu takových vzorků velmi vysoké nároky. Samotná analýza by měla být rychlá, dostatečně citlivá a přesná, ale také levná. Dobrou alternativou pro splnění těchto kritérií je využití biosenzorů, zejména těch elektrochemických.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice biosenzoru

Biosenzor je analytický přístroj, který je schopný poskytovat specifickou kvantitativní nebo semikvantitativní analytickou informaci, obsahující citlivý prvek biologického původu (bioelement) nebo od biologie odvozenou složku (receptor), který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem [1]. Bioelement plní rekogniční funkci, rozpoznává analyt až na molekulové úrovni, což zaručuje vysokou citlivost, specifickou a možnost optimalizace senzoru pro daný analytický problém.

2.2 Rozdělení biosenzorů podle biologické složky

Biosenzory lze rozdělit podle bioelementu nebo převodníku, popř. jejich kombinací. Výběr biologického materiálu a převodníku závisí na typu měřené fyzikální veličiny a vlastnostech vzorku, typ biokomponenty pak určuje stupeň selektivity nebo specifické biosenzoru. Tak lze čidla v biosenzorice rozdělit do čtyř skupin na biokatalytické, DNA, biomimetické senzory a imunosenzory.

2.2.1 Biokatalytické senzory

Biokatalytické systémy obsahují bioelement přeměňující analyt chemickými reakcemi. Mohou obsahovat jeden nebo více enzymů, celé buňky [2],[3], mikroorganismy jako bakterie, plísně, kvasinky, rostlinou nebo živočišnou tkáň [4], [5].

Enzymové biosenzory využívají čistěných enzymů, které umožňují až několikanásobné zvýšení selektivity. V podstatě všechny enzymové senzory jsou schopny fungovat po

imobilizaci enzymu na jakýkoliv převodník. Z komerčně dostupných enzymů jsou nejčastěji používány oxidázy a dehydrogenázy. Naproti tomu u mikrobiálních a tkáňových elektrod je enzym ve svém přirozeném biologickém prostředí, což příznivě ovlivňuje jeho aktivitu a stabilitu, navíc zde odpadá nutnost izolovat ho složitými čisticími kroky. Místo jediného enzymu tak je možno využít celé metabolické reakční sekvence, optimalizované přirozenou cestou [6], navíc může docházet i k částečné spontánní obnově využívané enzymové aktivity. Cena těchto biosenzorů je také velice nízká, nevýhodou je však dlouhá doba odezvy a nízká selektivita. Tento typ senzorů se uplatňuje zejména při detekci organických sloučenin vstřebávaných mikroorganismy, monitorování změn při respiraci během metabolismu a také v analýze potravin, zejména na základě biologické spotřeby kyslíku (BSK).

2.2.2 Imunosenzory

Imunosenzory poutají analyt selektivními interakcemi s protilátkou [7], nukleovou kyselinou [8] nebo chemoreceptorem za tvorby termodynamicky stabilního komplexu. Imunosenzory jsou díky reakci antigenu s protilátkou vysoce specifické, selektivní a v závislosti na detekci velice citlivé. Pro usnadnění detekce se antigeny nebo protilátky značí enzymy, fluorescenčními sloučeninami, elektrochemicky aktivními substráty, radioaktivními nuklidy nebo avidin-biotin komplexy. Komplexu protilátka-antigen je tak možno využít ve všech typech senzorů; nejčastějšími převodníky imunosenzorů jsou však piezoelektrické a optické systémy.

2.2.3 DNA senzory

DNA senzory obsahují definovanou sekvenci jednoho polynukleotidového řetězce imobilizovanou na pevný nosič. Pokud je DNA senzor ponořen do neznámého vzorku DNA nebo RNA a nastane hybridizace s neznámou nukleovou kyselinou párováním komplementárních bazí, je detekován a identifikován vzorek. Tyto senzory nacházejí uplatnění v analýze potravin, v určování příbuzenských vztahů, detekci onkogenů, dědičných chorob a genetických modifikací. Jsou také nejcitlivější metodou pro stanovení mikroorganismů jako *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* [9],[10],[6].

Analýzy toxických látek v životním prostředí mohou být také prováděny pomocí elektrody modifikované vrstvou dvouřetězcové dsDNA. Pokud je takto modifikovaná vrstva vystavena vlivu toxické látky, dojde k její vazbě na imobilizovanou vrstvu dsDNA, což se projeví změnou oxidačního proudu guaninu.

2.2.4 Biomimetické senzory

Tento poměrně málo zmiňovaný typ senzorů v podstatě kopíruje výše uvedené typy s tím rozdílem, že jako bioelement obsahuje umělé receptory. Výhodou těchto receptorů je jejich vyšší stabilita, selektivita a také nižší cena ve srovnání s přírodními látkami [11],[12]. Mohou to být např. oligopeptidy, oligosacharidy, peptidové nukleové kyseliny PNA (analogie DNA: cukr-fosforečnanový řetězec je substituovaný N-(2-aminoethyl)-glycinem), dále aptaméry (oligonukleotid nebo peptid, který váže specificky cílovou molekulu), ribozymy (RNAzy, které katalyzují štěpení vláken RNA), imprinty (syntetické polymery s funkčními skupinami), synzymy (syntetické enzymy), atp.

2.3 Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně–chemického převodníku

Aktivita biologické složky může být monitorována podle spotřeby kyslíku, tvorby peroxidu vodíku, změny koncentrace NADH, fluorescence, absorpce, změny pH, vodivosti, teploty nebo hmotnosti. Biosenzory tak můžeme klasifikovat podle použitého převodníku na:

- elektrochemické (potneciometrie, amperometrie, konduktometrie, voltametrie)
- optické (fotometrie, fluorometrie, luminometrie, nelineární optika)
- piezoelektrické a akustické
- kalorimetrické

2.3.1 Optické biosenzory

Principem optických biosenzorů je interakce světelného záření s chemickými látkami. Měří se intenzita absorpce nebo emise světelného záření jako následek biochemické reakce odehrávající se na povrchu biosenzoru. Světelné vlny jsou řízeny prostřednictvím optického vlákna ke vhodnému detektoru [13]. Zdrojem světla jsou lasery, světloemitující diody, výbojky či lampy. Technikami optických biosenzorů a jejich možnostmi se v přehledovém referátu zabýval Ramsden. Jsou zde popsány reflektivní techniky, absorpční spektroskopie, fluorescence, luminiscence apod. [14].

2.3.2 Kalorimetrické biosenzory

Změnu teploty v průběhu enzymatických reakcí využívají kalorimetrické biosenzory. Převodníkem je obvykle termistor, jehož odpor závisí na teplotě [15]. Protože nelze přesně určit, kolik tepla bylo uvolněno (část tepla se spotřebuje zářením, vedením apod.), má tento typ biosenzorů svá omezení. Je zde mimo jiné vyžadováno sledování teploty v rozlišení 0,0001°C, což vyžaduje náročné přístrojové vybavení.

2.3.3 Hmotnostní (piezoelektrické) biosenzory

Piezoelektrický jev byl objeven koncem 19. století jako elektrický potenciál, vznikající při mechanickém tlaku na povrchu různých krystalů (křemen, turmalín). Každý krystal má přirozenou vibrační frekvenci; pokud je piezoelektrický, vibrací vzniká oscilující elektrické pole o stejné frekvenci. Naopak, pokud je piezoelektrický krystal zapojen do oscilujícího obvodu, začne vibrovat. Stabilní vibrace však nastává pouze při přirozené rezonanční frekvenci, když je umožněn efektivní přenos energie z elektrického pole. Specifičnost stanovení se dosáhne potažením povrchu krystalu vhodnou vrstvou bioelementu. Adsorpcí analytu na aktivní povrch krystalu dojde ke změně rezonanční frekvence tohoto krystalu, která je úměrná hmotnosti navázané látky [16],[17]. Piezoelektrické biosenzory se využívají hlavně na poli imunosenzorů.

2.3.4 Elektrochemické biosenzory

K neznámějším, vývojově nejstarším a stále nejvíce využívaným biosenzorům patří enzymové elektrody, které vynikají zejména příznivou pořizovací cenou, nízkými provozními náklady a z hlediska analýzy obvykle vykazují rychlou odezvu. Mohou být dále rozděleny podle techniky měření na potenciometrické, konduktometrické a nejvíce rozšířené amperometrické biosenzory [18].

2.3.4.1 Potenciometrické převodníky

Základem potenciometrických měření je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. Lze měřit změny v koncentraci iontů za použití iontově selektivních elektrod – „ISE“, kterých existuje několik druhů [19]:

- skleněná pH elektroda
- pevné ISE tvořené tenkou vrstvou iontového vodiče z monokrystalů, ale také taveniny nebo výlisky prášků pevných solí polykrystalické povahy
- kapalně ISE, kde jsou použity membrány s kapalnými elektroaktivními látkami rozpuštěnými ve vhodném netěkajícím a s vodou se nemísícím rozpouštědle
- elektrody s přídatnými membránami. Mohou to být např. elektrody s membránou zhotovenou z tenkého silikonového kaučuku nebo teflonu, umístěnou na povrchu ISE (nejčastěji pH elektroda), která je propustná pro plyny, např. CO₂ a NH₃.

Moderní a přitom sériově vyráběné jsou v současnosti miniaturní potenciometrické senzory, vycházející z tranzistorů řízených polem, označované IS-FET (z angl. „*Ion-Sensitive Field Effect Transistor*“), CHEMFET (citlivé na sloučeniny nebo ionty), ENFET (využívající

biokatalyzátorů-enzymů) a celé řady dalších. Jedná se o polem řízené tranzistory, které mají na řídicí elektrodě umístěnu vrstvičku látky selektivně reagující s analytem. Jako selektivně reagující látky se využívají v podstatě stejné vrstvy jako v iontově-selektivních elektrodách s kapalnou membránou a i jejich vlastnosti jsou podobné. Výhodou IS-FETů, CHEMFETů, ENFETů aj. je, že neobsahují vnitřní elektrolyt, a proto mohou pracovat i v nakloněné poloze.

2.3.4.2 Konduktometrické převodníky

Konduktometrie je založena na schopnosti roztoku elektrolytu vést elektrický proud. Sledování změn vodivosti při biochemických reakcích vyžaduje produkci či spotřebu iontů nebo jiné změny, např. změny velikosti nabitých částic. Mezi enzymy je produkce iontů spojena s účinkem hydroláz a amidáz, změnu velikosti nabitých částic pak ovlivňují fosfatázy, sulfatázy nebo nukleázy. Velmi pohodlně tak lze např. provádět stanovení neutrálních lipidů, které po naštěpení lipázou poskytují ionty H^+ . Klasickým příkladem je také reakce ureázy při stanovení močoviny.

2.3.4.3 Amperometrické převodníky

Amperometrické biosenzory poskytují jako signál proud vzniklý elektrochemickou reakcí při konstantním napětí pracovní elektrody. Ten je úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Biosenzor vyniká rychlou odezvou a vyšší citlivostí, selektivita je pak řízena redox potenciálem analyzovaných látek přítomných ve vzorku.

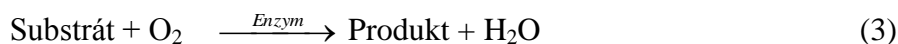
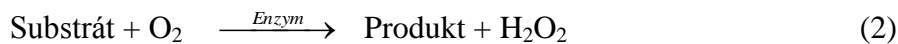
Bioelement při oxidaci substrátu odevzdává elektrony pracovní elektrodě, na jejímž povrchu dochází k elektrochemické regeneraci celé transportní kaskády, čímž se celý redoxní koloběh uzavře [20]. Základním předpokladem tohoto tvrzení je skutečnost, že elektrodová reakce probíhá mnohem rychleji než transport analytu k elektrodě. Rychlost určujícím stupněm je potom transport elektroaktivní látky k elektrodě, přičemž rychlost tohoto transportu se s rostoucí tloušťkou difúzní vrstvy zpomaluje podle druhého Fickova zákona. Pokud se po dobu měření zajistí konstantní tloušťka difúzní vrstvy, zaznamenává se limitní difúzní proud i_d (1):

$$(i_d)_t = nFAD \frac{(c - c_0)}{l} \quad (1)$$

kde c je koncentrace analytu ve stanovovaném roztoku, c_0 koncentrace analytu na povrchu pracovní elektrody a l tloušťka difúzní vrstvy.

Amperometrické převodníky dnes spojujeme s různými enzymy nebo s jinými bioelementy. Při reakcích katalyzovaných enzymy se tvoří peroxid vodíku (mimo oxidáz

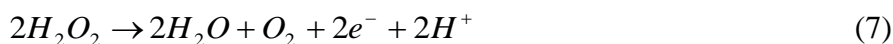
tvořících vodu) nebo spotřebovává kyslík (u všech oxidáz). Dehydrogenázy produkují (nepřímo) redukovanou formu β -nikotinamidadeninukleotidu(fosfátu) (NAD(P)H). Tvorbu nebo spotřebu těchto látek lze popsat těmito obecnými rovnicemi (2-4):



První amperometrický biosenzor pro stanovení glukózy pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody [21],[22] byl založen na spotřebě kyslíku (rovnice (5) a (6), kdy byl na platinovou katodu vložen potenciál v rozmezí -0,6 až -0,9 V vs. Ag/AgCl.

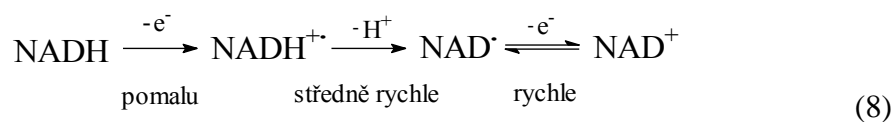


Dnes se častěji používají amperometrické biosenzory na bázi měření tvorby peroxidu vodíku. Oproti kyslíkovým amperometrickým biosenzorům vykazují vyšší citlivost. Konstrukce elektrod pro peroxid vodíku je téměř stejná jako u kyslíkových, liší se pouze v tom, že elektrody pro peroxid vodíku nemají membránu. Platinová nebo uhlíková elektroda ze skelného uhlíku je polarizována potenciálem 0,65-0,9V vs. Ag/AgCl, při němž dochází k anodické oxidaci peroxidu vodíku dle rovnice (7):



Oxidace H_2O_2 na uhlíkových elektrodách vyžaduje vysoké přepětí, obvykle mezi +0,65 až +0,9V. To je velmi nepříznivý jev, neboť při takovýchto potenciálech se nejvíce projevuje vliv interferentů, které se při takovém přepětí snadno oxidují. Mezi interferenty patří kyselina močová, či kyselina askorbová, paracetamol aj.

To se týká i dehydrogenázových biosenzorů, které se využívají ke stanovení koncentrace NAD(P)H. Mechanismus oxidace NADH není úplně objasněn, proto jej zapisujeme dle obecně uznávaného mechanismu [23], jak ukazuje rovnice (8):



Vysoké přepětí lze potlačit použitím tzv. mediátorů nebo katalyzátorů (kapitola 2.7). Dnes je přikládán velký význam modifikovaným amperometrickým biosenzorům, které mají měřitelný signál i při nízkém vloženém napětí. Nízké vložené napětí znemožňuje oxidaci většině interferujícím látkám, což zvyšuje specifitu.

Mnoho prací se také zabývá kombinací výhod nízkého vloženého pracovního potenciálu a/nebo předřazení polymerní membrány, která omezí přístup interferujících látek k elektrodě. Mechanismus membrán je založen na omezení přístupu částic podle velikosti (acetát celulóza), náboje (Nafion), polaritě (fosfatidylcholin), popř. jejich kombinace (acetát celulóza/Nafion). Zvýšení selektivity elektrochemických biosenzorů lze dosáhnout taktéž chemickou modifikací polymerních membrán neionickými tenzidy [24] nebo jinými změkčovadly [25].

2.3.4.3.1 Typy elektrod v amperometrii

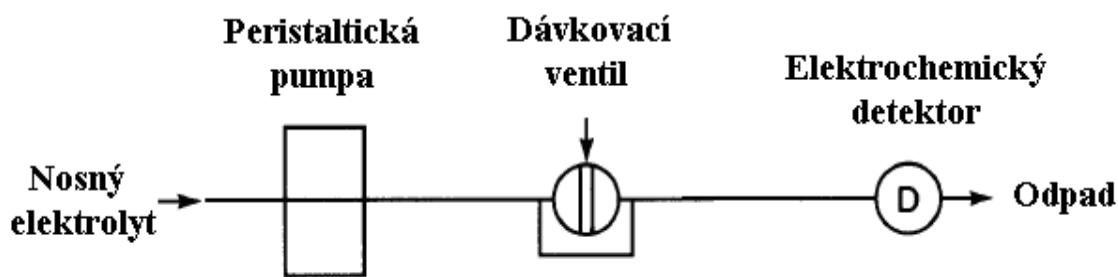
Amperometrická měření se obvykle provádějí v tříelektrodovém uspořádání (měrná, srovnávací a pomocná elektroda). Možné však je i dvouelektrodové uspořádání, tedy kombinace měrné a srovnávací elektrody, které se používá tehdy, pokud systémem protékají malé proudy a odpor roztoku není vysoký. Při použití pomocné elektrody se měří proud mezi pracovní a pomocnou elektrodou; proud protékající mezi referentní a pracovní elektrodou je minimální.

Nejpoužívanějšími referentními elektrodami jsou kalomelová elektroda ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{sat. KCl}$, $E = 0,2412 \text{ V}$) a chloridostříbrná ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$, $E = 0,2042 \text{ V}$). Pomocné elektrody musí být tvořeny z dobrého vodiče s dostatečně velkou plochou a musí být elektrochemicky neaktivní. Nejčastěji se používá platina ve formě drátku či plíšku. Jako pracovní elektrody je možno použít elektrody z ušlechtilého kovu, dále elektrody ze skelného uhlíku, elektrody založené na heterogenních uhlíkových materiálech (SPE, CPE), jejich modifikace, apod.

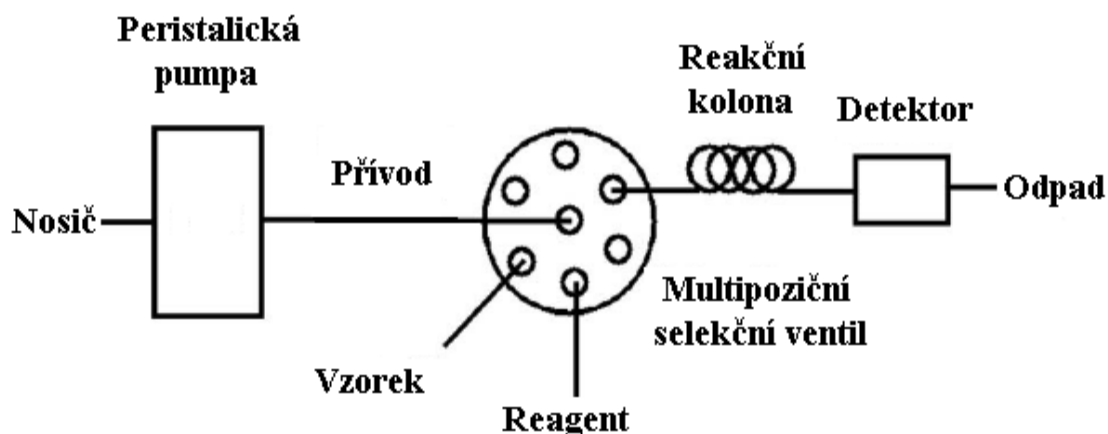
2.4 Elektroanalytická měření v průtokových systémech

Elektroanalytická měření v průtokových systémech dnes velmi usnadňují analýzu a zároveň zkracují její dobu. Provozní laboratoře musí velmi rychle a spolehlivě analyzovat

velké počty vzorků a je pro ně tedy nepohodlné používat vsádkový typ analýzy. Řešením tohoto problému je dávkování vzorku do proudu kapaliny, která jej nese analytickým systémem až k detektoru. Existují tři takové základní typy analýzy: kontinuální průtoková analýza (*continuous flow analysis*, CFA), modernější průtoková injekční analýza (*flow injection analysis*, FIA) a metoda sekvenční injekční analýzy (*sequential injection analysis*, SIA) – obr. 1 a 2. Měření v průtokových systémech je ovlivněno chováním proudícího elementu. Velký důraz je zde kladen především na detektor, protože musí být schopen co nejrychleji a co možná nejlépe reagovat na změny v protékajícím analyzovaném systému. Elektrochemické metody jsou poměrně vhodné pro detekci látek v průtokových systémech a proto je lze spojit například s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), nebo s metodou FIA atd.



Obr. 1 Schéma zařízení FIA s amperometrickou detekcí



Obr. 2 Schéma zařízení SIA

2.5 Objem a geometrie průtokové cely

Objem detekční cely závisí na rychlosti a reprodukovatelnosti transportu analytu k pracovní elektrodě. V průmyslových analyzátoch, kdy je většinou k dispozici velký objem analytu a změny koncentrace nebývají příliš rychlé, může být měřicí cely velká. Volba co nejmenšího objemu cely je výhodná z hlediska transportu analytu: dráha, kterou musí částice analytu urazit k povrchu elektrody je krátká, a protože bývá srovnatelná s tloušťkou difúzní vrstvy, je vliv konvektivní složky menší a rychlost transportu reprodukovatelnější. Malý objem cely je vhodný, pokud se pracuje s malým objemem vzorku, např. klinického původu (krev, moč). Jestliže má být detekční cely co nejmenší, je také kladen velký důraz na geometrii cely. Dobře zvolená geometrie detekční cely může také potlačit některé nežádoucí jevy během amperometrických i jiných měření. Např. během amperometrického měření v průtoku by měly být elektrody co nejbližší u sebe aby se potlačil vliv ohmické polarizace. Pozice elektrod a tvar cely by také neměly zhoršovat reprodukovatelnost toku kapaliny [26].

2.6 Elektrody používané v amperometrii

Pro amperometrická měření se nejčastěji používá tříelektrodové uspořádání (pracovní, referentní a pomocná elektroda). Je to z toho důvodu, že je možné tyto systémy využívat při vyšších odporech roztoku, protože tento systém pomůže potlačit vliv vysokého odporu v roztoku.

2.6.1 Pomocné elektrody

Pomocné elektrody mohou mít různou podobu. Většinou bývají složeny z platinového plíšku, nebo z uhlíkové tyčinky. Jako pomocnou elektrodu lze mnohdy použít i samotný povrch měrné cely, která se používá při průtokové analýze. Je zde důležité, aby pomocná elektroda nebyla polarizovatelná. Toho dosáhneme tím, že pomocná elektroda bude mít podstatně větší povrch než elektroda pracovní.

2.6.2 Referentní elektrody

Jako referentní elektrody se používají elektrody druhého druhu, tzn. elektrody složené z málo rozpustné soli ponořené do roztoku obsahující aniont této soli. V praxi se setkáváme se dvěma základními: kalomelovou, chloridostříbrnou. První uvedená elektroda se skládá z Hg, Hg_2Cl_2 a je ponořena v nasyceném roztoku KCl, argentchloridová je složena z Ag, AgCl v roztoku KCl, nejčastěji 3M.

2.6.3 Pracovní elektrody

Materiálů pro zhotovení pracovních elektrod je celá škála, nejpoužívanější jsou však elektrody zhotovené z ušlechtilých kovů (platina či zlato). Dnes se také hojně využívají heterogenní uhlíkové materiály (tištěné elektrody z uhlíkového inkoustu, uhlíkové pastové elektrody) i homogenní uhlíkové elektrody (např. elektrody ze skelného uhlíku)

2.7 Heterogenní uhlíkové elektrody

Heterogenní uhlíkové elektrody se řadí mezi elektrochemické senzory obsahující uhlík jako elektricky vodivý materiál, který je začleněn v matrici (pojivo). Použitá pojiva mohou být kapalná (uhlíkové pastové elektrody) nebo pevná (uhlíkové tištěné elektrody). Velkou výhodou těchto typů elektrod je možnost jejich modifikace přimísením chemických nebo biologických látek k uhlíku a pojivu, čímž lze zvýšit selektivitu nebo citlivost stanovení. Dále tyto elektrody vynikají velmi nízkým proudem pozadí, širokým rozsahem pracovních potenciálů (podle typu uhlíku a prostředí od $-1,7$ V až do $+1,2$ V) a poměrně nízkou pořizovací cenou. I když jsou použita pojiva elektricky nevodivé látky, mají výsledné směsi velmi dobrou vodivost. Odpor elektrod se pohybuje mezi $3-200 \Omega$.

2.7.1 Uhlíkové pastové elektrody

Elektrody ve formě pasty („CPE“, z angl. *Carbon Paste Electrodes*) představují směs práškového uhlíku s kapalným pojivem ve vhodném poměru [27],[28]. Obvykle se připravují laboratorně důkladnou homogenizací komponent v třecí misce [29]. Takto zhotovené pasty se plní do vhodného elektrodového pouzdra, např. pístového typu (Obr. 3). Klasické pastové směsi obsahují vysoce vodivý spektroskopický grafit a elektricky nevodivou, chemicky inertní a ve vodě nerozpustnou kapalinu. Hojně používané jsou parafinové, minerální (Nujol, Uvasol) a silikonové oleje. Uhlíková část směsi je tvořena grafitovým práškem, který obsahuje různě velké částice v rozsahu cca od 10 nm po desítky μm [30]. Dále je možné použít grafitový prášek, získaný kontrolovanou pyrolytickou degradací vysokomolekulárních pryskyřic (tzv. „glassy carbon powder“) [31]. Trendem nedávné doby se staly uhlíkové nanotrubičky tzv. „carbon nanotube“ [32].

CPE se uchovává ponořená v destilované vodě, neboť organické pojivo může časem vytékat. Takto připravené elektrody jsou stabilní po několik týdnů. Fyzikálně-chemické procesy a některé elektroanalytické aplikace jsou popsány v přehledovém článku [33].

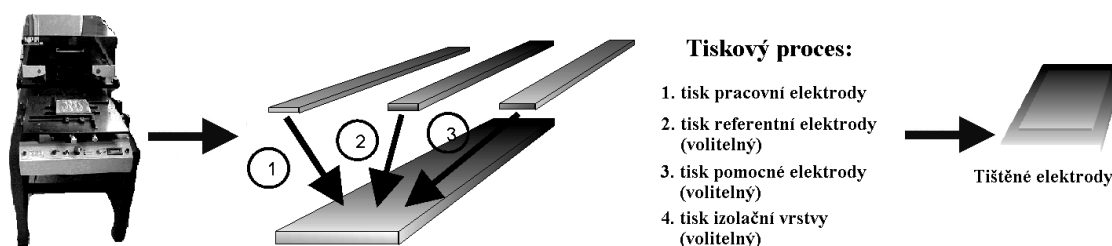


Obr. 3: Pístopvé pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu

2.7.2 Uhlíkové tištěné elektrody

Dalším typem jsou elektrody připravené sítotiskovou technikou (*SPE*, z angl. *Screen Printed Electrodes*). Pokud je jako vodič použit uhlík, pak se jedná o SPCE (z angl. *Screen Printed Carbon Electrodes*). Nejvýstižnější je však označení TFE (z angl. *Thick-Film Electrodes*), lépe charakterizující rozměry elektrody jako „tlusté“ filmy (několik desítek mikrometrů).

Na nosnou podložku se tiskem přes matrici s požadovaným vzorem nanese tisková směs (obr. 4). Po vytvrzení pojiva (vypaření rozpouštědla při pokojové teplotě nebo vyšší, zpravidla 60-120°C, popř. za použití UV-záření) je elektroda připravena k použití. Celý proces může být několikrát opakován. V další fázi se mohou nanášet další elektrody (referentní, pomocná) nebo vrstvy se speciálními funkcemi (ochranné vrstvy k vymezení povrchu elektrody, ochrana kontaktních drah, enzymové vrstvy apod.).



Obr. 4: Tisk *SPE*

Existuje celá řada komerčních tiskových směsí od firem Acheson, Dupont, Ercon (USA) nebo Gwent Electronics (GB), ale stejně tak se dají namíchat i v laboratorních podmínkách. Vhodným a nejčastějším tiskovým materiálem jsou pasty na bázi uhlíku nebo i stříbra, zlata či platiny. Jako pojivo pak slouží polymer, např. polykarbonát nebo acetát celulózy [34], který je rozpuštěn v organickém rozpouštědle jako cyklohexanon, ethylenglykol, aceton, terpineol, etylcelulóza a další. Jako podklad lze použít keramické destičky na bázi korundu [35] (obr. 5),

kteří nabízí např. firma COORS (USA), nebo různé druhy plastů jako PVC [36], polyethylen, polykarbonát [37] či polyester [38]. Klíčovým parametrem pro přípravu elektrod je povaha pasty (inkoustu), která ovlivňuje kinetiku přenosu elektronů a rozsah pracovních potenciálů [39].

SPEs jsou senzory určené zejména pro jednorázová použití. Jejich výhodou je možnost masové produkce a podobně jako u pastových elektrod levná výroba a možnost jednoduché a rychlé modifikace. Různě modifikované SPE mohou sloužit ke stopové analýze různých anorganických iontů a organických sloučenin, polutantů v životním prostředí a biologicky důležitých molekul.



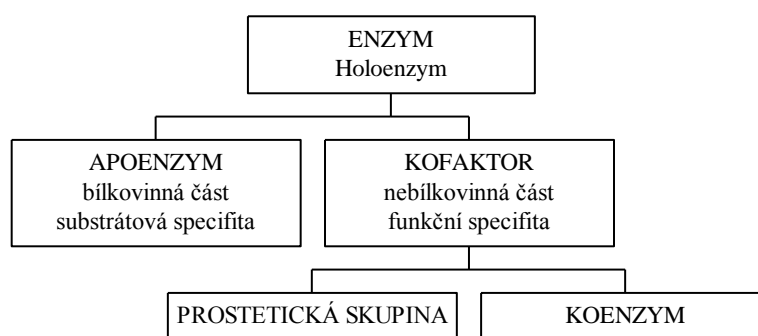
Obr. 5: *SPCE*

2.8 Enzymy

2.8.1 Obecná charakteristika

Enzymy jsou proteiny (bílkoviny) specializované na katalýzu chemických reakcí v organismech, účastní se syntézy látek nepostradatelných pro organismus a také degradace látek nežádoucích a nepotřebných. Tvoří podstatnou a významem nejdůležitější skupinu proteinů. Dnes je známo více než 2000 různých enzymů.

Součástí molekul enzymů jsou nízkomolekulové neaminokyselinové struktury nazývané kofaktory. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou složku enzymu, je tato složka nazývána prosthetická skupina. Jindy je kofaktor s bílkovinnou složkou vázán slabě a může se od ní lehce oddělovat; takový kofaktor nazýváme koenzym. Funkce kofaktorů spočívá v přenosu atomů nebo jejich skupin, nebo elektronů při biochemických reakcích, které enzymy katalyzují. Kompletní fungující enzym se nazývá holoenzym. Holoenzym se skládá z apoenzymu (protein) a kofaktoru (obr. 6).



Obr. 6: *Složení enzymu*

Aktivita enzymu se udává v jednotkách U (Unit), což je množství enzymu schopné za minutu při saturaci substrátem přeměnit 1 μmol substrátu, nebo také v jednotkách kat (katal), kde 1 kat představuje množství katalyzátoru, které za standardních podmínek přemění za 1 sekundu 1 mol substrátu.

2.8.2 Klasifikace enzymů

Základem jednotné klasifikace a nomenklatury enzymů je jejich rozdělení do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce. Dělení enzymů na hlavní třídy, soustavu podtříd a skupin (podpodtříd) umožňuje vytvoření čtyřmístného číselného kódu E.C. (z angl. „*Enzyme Classification*“) pro označení enzymu; poslední číslo je pořadové číslo enzymu ve skupině [40].

- **E.C.1.-.-.- oxidoreduktázy** – katalyzují intermolekulové oxidačně-redukční přeměny. Jsou jednou z nejpočetnějších tříd enzymů a všechny jsou povahy složených bílkovin. Oxidačně-redukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku (dehydrogenázy) nebo elektronů (transelektronázy). Pokud enzymy pomáhají zabudovat do substrátu atom kyslíku, nazýváme je oxygenázy. Oxidoreduktázy se dělí na podtřídy podle funkčních skupin, které jsou donory protonů nebo elektronů. Jsou nejvíce využívanou skupinou enzymů v amperometrických biosenzorech.
- **E.C.2.-.-.- transferázy** – realizují přenos skupin v aktivované formě z donoru na akceptor. Transferázy mají obecně povahu složených bílkovin. Na podtřídy se rozdělují podle charakteru přenášených skupin.
- **E.C.3.-.-.- hydrolázy** – štěpí hydrolyticky vazby vzniklé kondenzací (peptidázy, glykozidázy, esterázy), jsou vesměs povahy jednoduchých bílkovin dělí se na podtřídy podle typu štěpených vazeb.
- **E.C.4.-.-.- lyázy** (syntetázy) tato třída enzymů s povahou složených bílkovin zprostředkovává nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N, reakci realizují odštěpováním/adicí malých molekul z/do substrátu. Lyázy tvoří málo početnou skupinu enzymů. Na podtřídy se rozdělují podle typu štěpených nebo syntetizovaných vazeb.
- **E.C.5.-.-.- izomerázy** – realizují vnitromolekulové přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny izomerů. Je to nejméně početná skupina enzymů, většinou povahy jednoduchých bílkovin. Dělení na podtřídy je založeno na typu izomerie.
- **E.C.6.-.-.- ligázy** – katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky uvolňující energii (např. ATP). Ligázy se uplatňují hlavně při

biosyntézách probíhajících v živých systémech. Mají povahu složených bílkovin a dělí se podle typu vytvářených vazeb.

2.8.3 Struktura kofaktorů

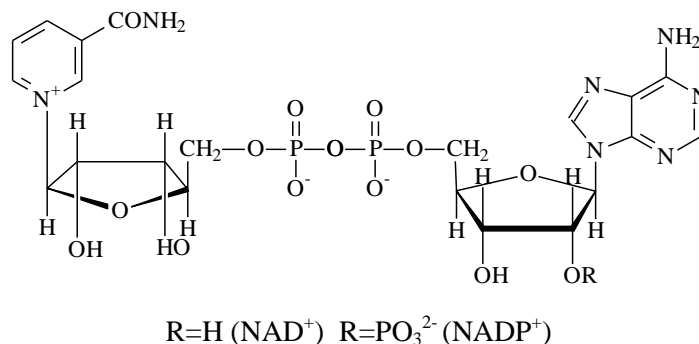
Kofaktory jsou látky různé chemické povahy, jejich molekuly většinou obsahují heterocyklus, který tvoří buď reaktivní část kofaktoru, nebo má funkci rozpoznávacího prvku pro sledovanou molekulu. Mnohé z kofaktorů mají úzký vztah k vitaminům rozpustným ve vodě (převážně skupiny B) a většinou obsahují jako podstatnou složku zbytek kyselin fosforečných, často vázaných v nukleotidu. Do této skupiny látek patří:

- a) koenzymy, které přenášejí skupiny atomů, vodík nebo elektrony od jednoho enzymu k druhému
- b) prosthetické skupiny, které jsou trvale vázány na peptidovou část enzymu (apoenzymu) a během katalytické reakce mění svou chemickou strukturu
- c) ionty kovů vázané trvale v aktivním centru enzymu (metalloenzymy, např. zinek v karboxypeptidáze, nikl v ureáze)
- d) ionty kovů účastníci se enzymové reakce, aniž by byly na enzym trvale vázány (např. vápenaté ionty jako aktivátory extracelulárních enzymů, hořečnaté ionty u enzymů štěpících ATP)
- e) další složky, které jsou pro reakci nezbytné (např. kyselina askorbová při hydroxylaci prolinu vázaného v kolagenu).

Nejdůležitější kofaktory jsou:

2.8.3.1 Kofaktory oxidoreduktáz

- a) Pyridinové (nikotinamidové) (di)nukleotidy
 - nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) (obr. 7)
 - nikotinamidadenindinukleotidfosfát ($NADP^+$)



Obr. 7: Struktura nikotinamidadenindinukleotidu

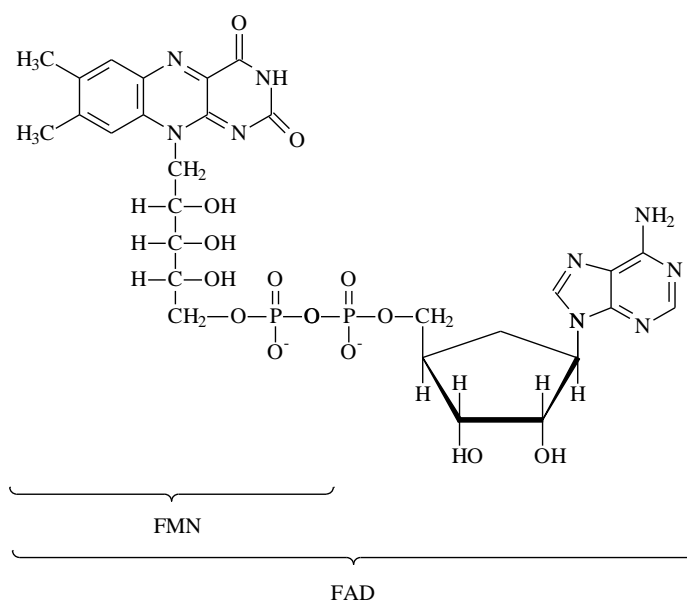
Molekuly $\text{NAD(P}^+)$ se sestávají z nikotinamidového a adeninového nukleosidu, vzájemně spojených prostřednictvím kyseliny fosforečné. Mají charakter transhydrogenáz odnímajících substrátům dvojici atomů vodíku. Je známo asi 250 enzymů, využívajících tohoto kofaktoru.

b) Flavinové nukleotidy

- *flavinmononukleotid (FMN)* (obr. 8)

- *flavinadenindinukleotid (FAD)* (obr. 8)

Flaviny jsou používány k redox reakcím s přenosem vodíku. Na rozdíl od nikotinamidů však mohou vstupovat i do reakcí, v nichž je přenášen kyslíkový atom, stejně jako do reakcí s jednoelektronovým přenosem.



Obr.8: *Strukturní vzorec FAD a FMN*

c) Biopterin

Jedním z pteridinových kofaktorů, jejichž základem je *2-amino-4-hydroxypteridin*, je biopterin. V redoxních reakcích se uplatňuje ve dvou oxidačních stavech – ve čtyřelektronové redukované formě a jako dvouelektronově redukovaný dihydropterin.

d) α -Lipoát

Jedná se o cyklický *disulfid 6,8-dithiooktanové kyseliny*, obsahující na konci postranního řetězce karboxylovou skupinu, která je vázaná na ϵ - NH_2 skupinu lyzinového zbytku bílkovinné části enzymu amidovou vazbou.

e) Benzochinony s isoprenoidním řetězcem

Mezi nejznámější zástupce této skupiny enzymů se řadí plastochinon, který se účastní světlé fáze fotosyntézy a ubichinony (koenzym Q apod.), které jsou součástí

mitochondriálního dýchacího řetězce. Mimo těchto dvou zástupců sem patří také vitaminy E a K.

f) Hem

Součástí řady oxidoreduktáz přenášejících samotné elektrony, jako je kataláza, peroxidáza a početná skupina cytochromů, je *hem*. Je to ferroporofyrinový komplex, jehož základem je porfínový skelet, tvořený čtyřmi pyrrolovými jádry spojenými čtyřmi methinovými můstky. Přenos elektronů realizují hemové transelektronázy přechodem mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} ionty železa, vázanými v hemové struktuře.

g) Ionty železa vázané přímo na bílkovinu

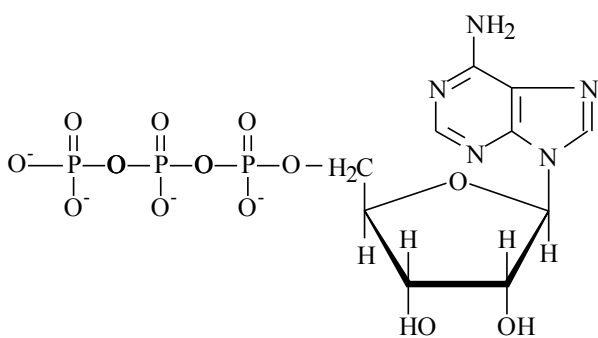
Tyto nehemové ferropoteiny jsou nazývány bílkovinami se železem a sírou. Jsou zahrnuty v metabolismu H_2 , fixaci N_2 a CO_2 , jsou součástí multienzymových komplexů respiračních řetězců a fotosyntetického aparátu, uplatňují se při některých hydroxylacích a při redukcích dusitanů a siřičitanů.

h) Glutathion

Přenos atomů vodíku realizuje vratnou přeměnou thiolové skupiny zbytku cysteinu na disulfid.

2.8.3.2 Kofaktory přenášející skupiny atomů

Do této skupiny patří zejména *adenosintrifosfát* (*ATP*, obr. 9), dále pak aktivní sulfát *3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát* (*PAPS*), kofaktory přenášející jednouhlíkaté štěpy *adenosylmethionin*, *tetrahydrofolát* (*THF*), kofaktory přenášející dvouhlíkaté štěpy *thiamindifosfát* (*TDP*), kofaktor přenášející aminoskupiny *pyridoxalfosfát* (*PLP*), kofaktory přenášející rozsáhlé struktury *uridindifosfát* (*UDP*) nebo *cytidindifosfát* (*CDP*).



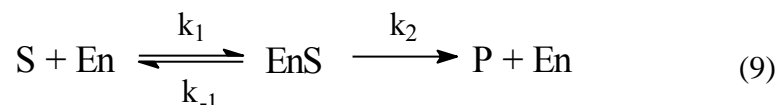
Obr. 9: Molekula ATP

2.8.3.3 Kofaktory izomeráz

Izomerázy většinou nepotřebují kofaktory. Při izomeraci sacharidů je však často nezbytný uridindifosfát nebo kovalentně vázaný NAD^+ .

2.8.4 Enzymová kinetika

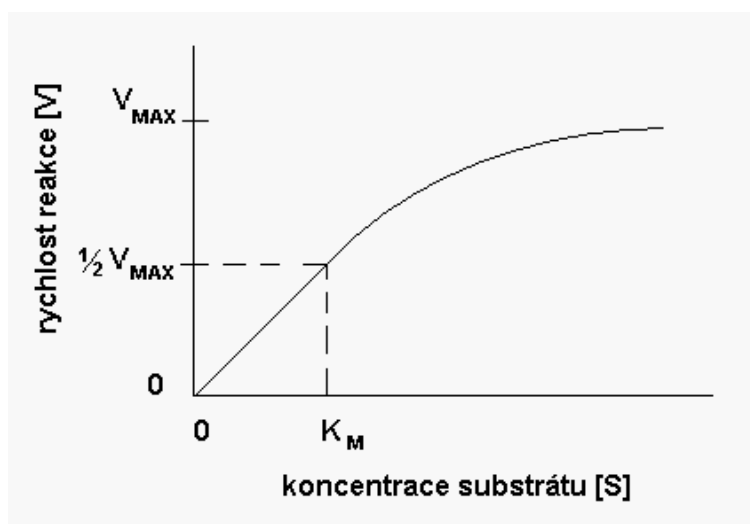
Enzymatickou reakci lze znázornit následující reakcí (9):



Substrát S reaguje s enzymem En a přechodně spolu vytvářejí komplex EnS, který se následně rozpadá buď na produkty P a volný En nebo zpět na En a S, přičemž rychlost vzniku komplexu EnS a jeho zpětného rozpadu na En a S je stejná. Je-li zachována stálá koncentrace enzymu, rychlost enzymové reakce V lze popsat rovnicí Michaelise a Mentenové (10) [41],

$$V = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

kde K_M je Michaelisova konstanta a V_{MAX} je maximální (mezní) rychlost reakce. K_M odpovídá koncentraci substrátu, při níž je rychlost reakce rovna polovině V_{MAX} (obr. 10), a charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu k příslušnému substrátu. Rychlost enzymové reakce stoupá s koncentrací substrátu pouze do určité hodnoty, nad ni už ke zvýšení rychlosti přidávkem substrátu nedochází.



Obr. 10: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu

Lineární rozsah kalibračních křivek je tedy závislý na koncentraci substrátu a K_M použitého enzymu. U amperometrických enzymových elektrod je odezva závislá i na rychlosti přenosu elektronu z enzymu k elektrodě, popř. na rychlosti difúze vzniklého produktu enzymovou vrstvou k povrchu převodníku.

Proteinová povaha enzymů způsobuje jistá omezení při práci, protože životnost biosenzoru je závislá na stabilitě enzymu. Většina enzymů je degradována vyššími teplotami (okolo 60°C), nešetrným skladováním, bakteriální kontaminací, přítomností různých konzervantů a kovových iontů (některé mohou zvyšovat aktivitu jako Mg^{+2} , zatímco Pb^{+2} , Ag^+ , Hg^{+2} aktivitu snižují) [42].

Enzym může být také hydrolyzován silnými kyselinami nebo zásadami, což způsobuje změnu v konformitě a tím i denaturaci. Pouze iontové formy aktivních částí enzymu i substrátu mohou spolu reagovat.

2.9 Imobilizace enzymů

Enzymy jsou látky rozpustné ve vodě a pro jejich další použití by bylo nutné je z roztoku opět izolovat. Tato nevýhoda byla vyřešena nalezením technik ukotvení enzymů na pevných nosičích. Výhody spojené s imobilizací enzymů lze shrnout do následujících bodů: umožnění opakovaného použití enzymu, vhodnost pro spojení s kontinuálními procesy, zvýšení stability enzymu a částečná ochrana před okolními vlivy (nepříznivé pH, teplota).

Imobilizační techniky jsou děleny na chemické a fyzikální. U chemických imobilizačních technik dochází k tvorbě nových vazeb mezi enzymem a nosičem. Fyzikální imobilizace spočívá v zachycení enzymu nosičem pomocí van der Waalsových sil, vodíkových můstků, nebo je enzym prostě obklopen jinou inertní látkou. Mezi chemické imobilizační techniky enzymů patří kovalentní imobilizace a zesítnění biomolekul („*cross-linking*“) a do fyzikálních imobilizačních technik se řadí adsorpce, zachycení v kompozitních směsích, elektropolymerizace, zachycení v sol-gel materiálu, gelu nebo polymeru a imobilizace pomocí membrán.

Výběr metody imobilizace závisí na vlastnostech enzymu, typu převodníku, na podmínkách, při nichž má biosenzor pracovat, a v neposlední řadě na fyzikálních vlastnostech analytu, popř. na velikosti stanovovaných molekul [43]. Molekuly všech velikostí mohou interagovat s enzymem adsorbovaným na povrchu elektrody. Je-li enzym zachycen pomocí membrány či gelu, lze stanovovat pouze malé molekuly, velké molekuly se difúzí k enzymu nedostanou, čehož lze využít též k odstranění interferencí.

Při imobilizaci je nutno vzít v úvahu následující faktory:

1. Zachovat aktivitu a specifickou aktivitu enzymu
2. Zabránit vzniku nespecifické vazby jako následek imobilizace
3. Práce s biosenzorem má být v ideálním případě jednoduchá a reprodukovatelná

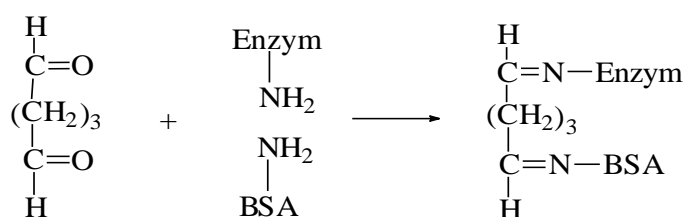
4. Vyhnout se extrémním podmínkám (pH, teplota, iontová síla atd.). Lze však poznamenat, že některé enzymy mohou být za určitých podmínek vystavovány relativně vysokým teplotám (GOx až 60°C)

2.9.1 Chemická imobilizace

2.9.1.1 Zesíťování biomolekul (cross-linking)

Enzymy a jiné proteiny mohou být imobilizovány pomocí bifunkčních činidel, kterými jsou nejčastěji glutaraldehyd [44],[45],[46], hexamethyldiisokyanát, popř. karbodiimid trichlorotriazin.

Zesíťovat je možno samotný enzym, popř. se může enzym smíchat s inertní bílkovinou, např. albuminem (BSA – „*bovine serum albumin*“) (obr. 11). Glutaraldehyd, BSA a enzym vytváří síťové uspořádání na povrchu senzoru. Tato technika je jednoduchá a rychlá, nicméně enzymy nebo protilátky mohou být zčásti deaktivovány reakcí činidla s aktivními místy enzymu.



Obr. 11: Zesíťování enzymu pomocí glutaraldehydu

2.9.1.2 Kovalentní imobilizace

Chemická vazba vznikající mezi bioelementem a povrchem převodníku poskytuje stabilní biovrstvy rezistentní k širokému rozmezí pH, teploty a iontů. Dochází zde ale k určité ztrátě bioaktivity. Jsou používány tři typy nosičů: anorganické látky, přírodní a syntetické polymery.

Před vytvořením vlastní vazby je potřeba nejdříve aktivovat inertní povrch senzoru a tím vytvořit vhodné funkční skupiny schopné vazby s bioelementem. Vhodným aktivačním postupem je silanizace na anorganických površích částečně pokrytých vrstvou oxidu (sklo, křemík, kovy) [47], nebo štěpení amidových vazeb polymerních materiálů (Nylon, Silon apod.).

2.9.2 Fyzikální imobilizace

2.9.2.1 Fyzikální adsorpce

Adsorpce je reverzní proces využívající řadu interakcí, např. hydrofobní interakce, dále iontové síly, vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, apod., které ovšem mohou velmi výrazně záviset na okolních podmínkách (pH, iontová síla, teplota). Jako substrát je možno použít grafit, heterogenní grafitové materiály [48], plasty, sklo nebo celulózu.

Takto připravené biosenzory se však vyznačují nízkou stabilitou a po čase ztrácejí enzymovou aktivitu. Během adsorpce může nadbytek bílkoviny tvořit více vrstev, které se lehce desorbují. Adsorpce na povrch elektrod jsou však schopné pouze některé biomolekuly, příkladem může být cholin oxidáza adsorbovaná na SPE [38],[49]. Výhodou metody je jednoduchá příprava biosenzoru a šetrná manipulace s bioelementem, která, zejména v případě antigenů, nedenedaturuje vazebná místa a navíc zůstává jejich orientace ve směru umožňujícím rozpoznání daného analytu.

2.9.2.2 Zachycení v kompozitních směsích tvořících elektrodu

Imobilizace biomolekuly v polymeru, uhlíkové pastě [50] nebo inkoustu [51] tvořícím elektrodu je jednoduchá metoda, podobná fyzikální adsorpci bioelementu. Enzymy, mikroorganismy nebo buňky tkání se smísí a dokonale homogenizují s kompozitní směsí. Poté se z této směsi připraví elektroda buď běžným způsobem nebo za upravených podmínek, aby nedošlo k degradaci bioelementu (např. při přípravě SPE elektrod s enzymem je nutno elektrody vysušit při nízkých teplotách, aby nedošlo k denaturaci teplotně labilních enzymů ve vysoušecí peci).

2.9.2.3 Sol-gel matrice

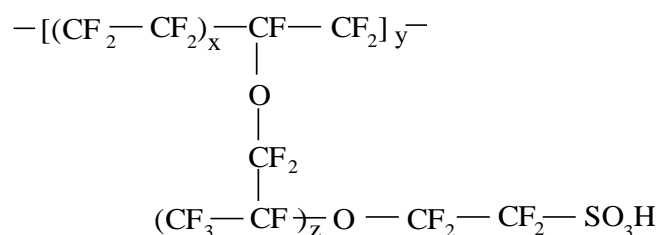
Pórovité sol-gel materiály [52] představují relativně novou a rychle se rozvíjející skupinu látek využitelných pro imobilizaci bioelementů. Sol-gel matrice se připravuje při laboratorní teplotě z organických prekurzorů [53],[54]. Metalalkoxid o nízké molekulové hmotnosti, nejčastěji tetramethoxysilan ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) nebo tetraethoxysilan ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$), je hydrolyzován v přítomnosti vody, kyselého katalyzátoru a rozpouštědla, např. ethanolu. Výsledkem hydrolyzy je vytvoření silanolových skupin (Si-OH), které jsou následnou kondenzační reakcí spojeny za vzniku siloxanových polymerů (Si-O-Si) tvořících koloidní suspenzi (sol) až gel. Na závěr jsou vysušením odstraněna rozpouštědla z porózní sítě a vzniká suchý gel. Zachycení biomolekuly pomocí sol-gel matrice lze provést několika

způsoby. Sol-gel matrici je možno přímo dopovat glukóza oxidázou [55]. Dále je možno využít sol-gel/enzym/sol-gel sendvičové uspořádání [56] nebo také dvouvrstvé uspořádání enzym-redox-polymer/sol-gel, např. v biosenzorech pro stanovení laktátu a kyanidu [57],[58].

2.9.2.4 Zachycení v gelu nebo polymeru

Zachycení v gelu či polymeru neboli inkluze biomolekul uvnitř struktury membrány je jednoduchá a jemná metoda imobilizace [6]. Polymer se v přítomnosti biomolekuly zesítí a jeho poróznost lze pak dodatečně přizpůsobit. Zvětšení pórů se provádí např. pomocí alkalické hydrolýzy acetylcelulózy [59], jejich zmenšení pomocí organosilanů nebo lipidických látek zachycených uvnitř pórů. Membrána může být tvořena polyakrylamidem, želatinou, polyvinylalkoholem [60], Nafionem [61], polyurethanem, apod.

Nafion (obr. 12) je komerčně dodávaný polymer používaný pro přímou imobilizaci enzymů. Rozpuštěný enzym se smíchá s Nafionem, kápne se na povrch elektrody a po odpaření rozpouštědla je elektroda připravena k použití. Může se taktéž využít jako permsektivní membrána, nebo vzhledem ke své struktuře jako iontoměnič odpuzující anionty.



Obr. 12: Molekula Nafionu

2.9.2.5 Elektropolymerizace

Tato imobilizační technika využívá elektrochemickou oxidaci k přípravě reaktivních monomerů. Které pak spontánně vytváří polymerní film na povrchu elektrody (vložený potenciál zpravidla mezi +0,6 až +0,8 V vs. Ag/AgCl). Tyto filmy se dají vytvořit i na členitém povrchu nebo na povrchu mikroelektrod. Typickými příklady takto využívaných polymerů jsou polypyrroly [62], polythiofen, polyanilin, polyindol, aminodifenylamin [63], fenylendiamin [64],[65], a jiné. Pokud jsou v průběhu elektropolymerizace v roztoku přítomné biomolekuly, dochází k jejich zachycení uvnitř vznikající membrány. Méně se může uplatnit také kladný náboj polymeru. Vlastnosti membrány je možné ovlivnit přidávkem dalších látek do elektropolymerizační směsi. Tloušťku membrány určuje velikost prošlého náboje, tak se dá

snadno reprodukovatelně ovlivnit množství imobilizované biomolekuly. Některé eletropolymerní vrstvy mohou být navíc vodivé, což usnadňuje přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami.

2.9.2.6 Imobilizace pomocí membrán

Biosenzory mohou být překryty tenkou membránou, která řídí transport látek (difúzní kontrola), omezuje popř. zabraňuje vlivu nežádoucích látek (interferencí) a také slouží jako mechanická ochrana čidla. Membrány také zvyšují biokompatibilitu při stanoveních „*in vivo*“ [66] nebo v klinických vzorcích. Např. pro zvýšení hemokompatibility při kontaktu s krví je často používána membrána, jejíž povrch je upraven heparin sulfátem [67]. Použití membrán je taktéž vhodné při analýze vzorků se zvýšeným obsahem bílkovin, které se absorbují na aktivní místa enzymů a způsobují tak pokles citlivosti.

Pro přípravu membrán lze využít komerčně dostupné polymery jako polyvinylchlorid (PVC), polyetylen, polymetakrylát a polyuretan pro jejich vhodné fyzikální a chemické vlastnosti. Dále je možno použít různé dialyzační membrány (celulóza, acetylcelulóza nebo polykarbonáty), vhodné zejména pro mikrobiální nebo tkáňové biosenzory.

Membránu je možno vytvořit přímo na povrchu senzoru [59] (vhodné především pro velmi malé senzory) nebo fázovou konverzí z polymerů [6], kdy se polymer rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nalije se na vhodný povrch (Petriho miska) a počká se do odpaření rozpouštědla (např. acetylcelulóza v acetonu nebo cyklohexanonu). Membránu je pak možné nastříhat na požadovanou velikost [68].

2.10 Mediátory

2.10.1 Obecná charakteristika mediátorů

Mediátory jsou přenašeče elektronů, které se mohou pohotově účastnit redoxní reakce s biologickou složkou. Jsou to většinou nízkomolekulární redoxní páry, které přenášejí elektrony z redoxního centra enzymu na povrch pracovní elektrody (11 – 13).



Od mediátoru se očekává, že bude stabilní za daných experimentálních podmínek a

nebude se účastnit jiné konkurenční reakce během přenosu elektronů [69]. Pro výběr vhodného mediátoru pro amperometrický biosenzor je dobré prostudovat jeho vlastnosti pomocí cyklické voltametrie [70]. Vlastnosti ideálního mediátoru jsou: schopnost rychle reagovat s redukováným enzymem; nezávislost na pH; nízké přepětí pro regeneraci oxidovaného mediátoru; stabilita jak oxidované tak redukované formy; redukovaná forma by neměla reagovat s kyslíkem. Používání mediátorů má mnoho výhod. Jednou z nich je jejich nízká závislost na koncentraci kyslíku. Díky mediátorům lze nastavit mnohem nižší potenciály, které se blíží k nule a tím se tak vyhnout interferujícím látkám v tomto rozmezí [69].

2.10.2 Typy používaných mediátorů

2.10.2.1 Organická barviva

Organická barviva jako je alizarinová žluť [71], fenaziny [72], methylenová modř [73] jsou často používanými mediátory, které však mají nízkou stabilitu a jejich redoxní potenciál závisí na pH.

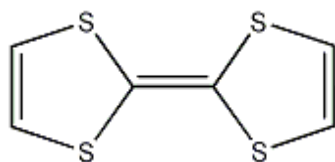
2.10.2.2 Ferroceny a jejich deriváty

Ferroceny a jejich deriváty patří do skupiny mediátorů, které lze také použít pro konstrukci stabilních a velmi citlivých biosenzorů [74]. Ferroceny se skládají z ionu železa, který je obklopen dvěma cyklopentadienovými kruhy, které pak mohou být různě substituovány. Jako příklad lze uvést biosenzor pro stanovení galaktózy. Na povrchu uhlíkové elektrody je zde adsorbován ferrocen. Tento systém nabízí nízký detekční limit, rychlou odezvu a široký lineární rozsah [75].

2.10.2.3 Tetrakyanochinondimethan (TCNQ) a tetrathiafulvalen (TTF)

TCNQ je velmi efektivním mediátorem přenášejícím elektrony a je jako mediátor hojně využíván. Hlavní pozornost poutá především svojí citlivostí k NADH [76].

TTF je heterocyklická sloučenina obsahující síru (obr. 13). Může sloužit jako případná náhrada derivátů ferrocenu pro konstrukci amperometrických biosenzorů [77]. TTF byl například využit jako mediátor pro konstrukci biosenzoru modifikovaného glukóza oxidázou na uhlíkové pastové elektrodě pro průtokovou analýzu [78].



Obr. 13: TTF

2.10.2.4 Vodivé soli

Vodivé soli, jakými jsou tetrathiafulvalen-tetrakyanochinondimethan (TTF-TCNQ) a N-methylfenazinium-tetrakyanochinondimethan (NMP-TCNQ), byly mnohokrát použity pro tvorbu biosenzorů. Používají se bez mála třicet let a stále patří k velmi populárním mediátorům elektrochemických biosenzorů. Pomocí mediátoru TTF-TCNQ byl sestrojen například biosenzor modifikovaný enzymem formaldehyd dehydrogenázou pro stanovení formaldehydu [79].

2.10.2.5 Chinony

Chinony jsou látky s oxidačními vlastnostmi. Při redoxní reakci se redukují na hydroxyloučeniny a ty jsou následně oxidovány zpět na chinony předáním elektronů na elektrodě. Chinony se jako mediátory využívají zejména při konstrukci biosenzorů modifikovaných dehydrogenázami, protože zajišťují elektrokatalytickou oxidaci NADH [80].

2.10.2.6 Hexakynoželezitany (hexakynoželeznatany)

Hexakynoželezitany jsou běžně používané mediátory při konstrukci biosenzorů. Jejich hlavní výhodou je snadná dostupnost na trhu a nízká cena. Přenos elektronů zde zprostředkovávají ionty železa, které se snadno oxidují i redukují. Díky těmto biosenzorům bylo zkonstruováno velké množství enzymatických biosenzorů pro stanovení různých analytů: glukóza, cholesterol [81], laktát [82].

2.10.2.7 Kovy

Kovy a jejich sloučeniny, jako oxidy, představují největší skupinu mediátorů ve spojení s uhlíkovými biosenzory. Kovy jsou používány již od prvopočátků elektrochemie. Jejich výhoda spočívá v tom, že jsou schopny rychlého přenosu elektronů při elektrodové reakci. Ve spojení s uhlíkovými elektrodami byla důkladně prozkoumána celá řada kovů a jejich sloučenin jako stříbro [83], ruthenium [84], platina, rhodium [85] osmium, mangan, atd.

2.11 Uhlíkové nanotrubic (CNTs)

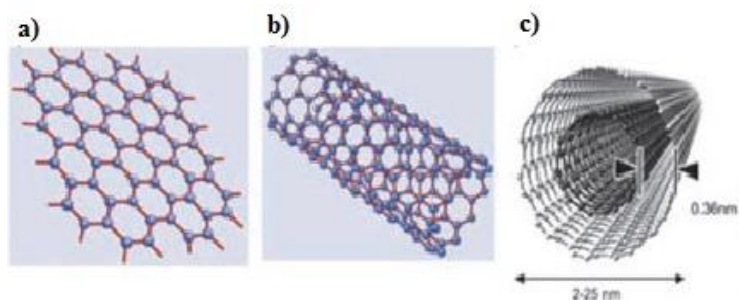
Uhlíkové nanotrubic (CNTs – Carbon nanotubes) patří mezi nedávno objevené alotropy uhlíku, které vzhledem ke svým jedinečným vlastnostem nabízí uplatnění v mnoha aplikacích (např. v elektrochemii se využívají pro modifikaci pracovních elektrod, které lze další úpravou modifikovat pomocí biomolekul, které pak dokáží zvýšit specifickou afinitu k určité látce a tím zvýšit selektivitu a citlivost elektrochemické analýzy).

I když byly uhlíkové nanotrubic (tehdy jako útvary) pozorovány již v padesátých letech, jejich objev je připisován prof. Iijimovi, který v roce 1991 jako první publikoval článek o přípravě vícevláknových uhlíkových nanotrubic vnořených do sebe [93]. O existenci a přípravě jednovláknových uhlíkových nanotrubic následně publikoval rovněž Iijima a zároveň nezávisle i Bethune v roce 1993 [94].

2.11.1 Struktura a vlastnosti uhlíkových nanotrubic

Základním stavebním prvkem nanotrubic je grafen. Grafen (obr. 14a) je forma uhlíku s atomy tvořícími rovinnou šestiúhelníkovou strukturu. Pokud tuto vrstvu svineme, získáme jednovláknovou uhlíkovou nanotubic (SWNT) (obr. 14b). Závislost směru sbalení dvojrozměrných grafenových vrstev daným chirálním vektorem určuje výslednou strukturu uhlíkových nanotrubic. Chiralita pak ovlivňuje vodivost, hustotu, mřížkovou strukturu a další vlastnosti nanotrubic [95].

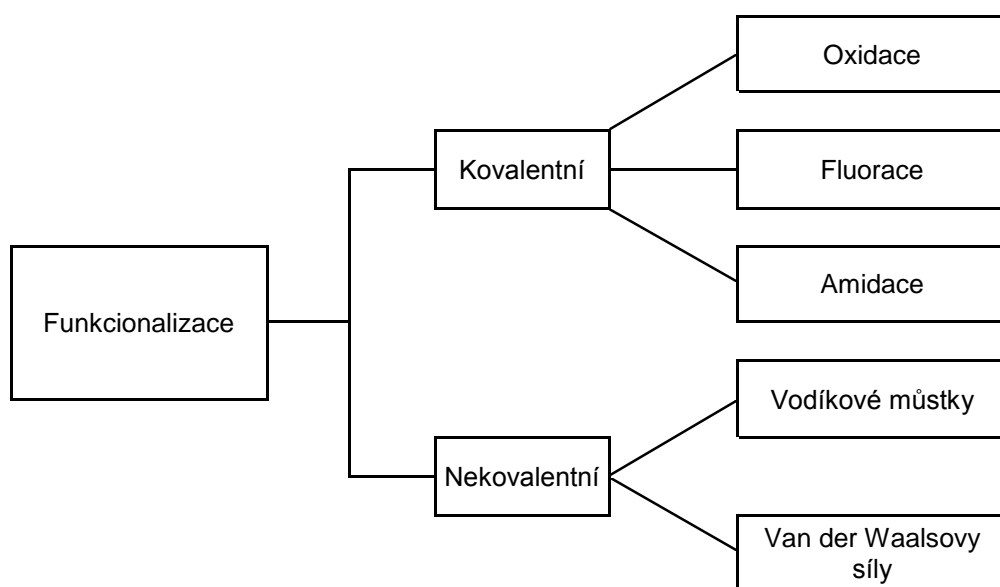
Uhlíkové nanotrubic lze rozdělit na dva základní typy. Prvním typem jsou jednovláknové CNTs (SWNT – Single Wall Carbon Nanotube), které mají typický průměr v rozmezí od 0,4 do 2 nm a délku až několik mikrometrů. Druhým typem jsou mnohovláknové CNTs (MWNT – Multi Wall Carbon Nanotube, obr. 14c), tvořené z několika soustředných uhlíkových nanotrubic, které jsou zpravidla v průměru větší než 2 nm, zatímco jejich délka může být více než 10 μm . Nanotrubic mají dobré mechanické, elektrické a optické vlastnosti, jsou pevné (až 100x pevnější než ocel), pružné a tepelně stabilní. CNTs jsou chemicky inertní a nejsou napadány silnými kyselinami nebo zásadami [96].



Obr. 14: a) Grafen, b) SWNT c) MWNT

2.11.2 Funkcionalizace

I přesto, že uhlíkové nanotrubičky mají sami o sobě jedinečné vlastnosti, je nutné je pro většinu aplikací funkcionalizovat. Funkcionalizací se rozumí modifikace povrchu uhlíkových nanotrubiček. Povrchové modifikace CNTs se nejčastěji využívá kvůli lepší dispergovatelnosti CNTs v roztocích a schopnosti na sebe vázat další organické nebo anorganické molekuly a tím měnit své vlastnosti a povrchovou aktivitu. Jednou z důležitých vlastností CNTs je, že tento materiál je prakticky nerozpustný ve vodných a polárních/nepolárních organických rozpouštědlech. Protože tato vlastnost brání jejich chemické manipulaci a možnému využití v mnoha oborech, vědci začali zkoumat jejich možnou fyzikální a chemickou funkcionalizaci. Podobně jako u fullerenů jsou jejich bočnice mnohem více inertní vůči chemickým činidlům. Z tohoto důvodu zde není tolik metod, které by se daly použít. O kovalentní i nekovalentní funkcionalizaci je v současné době známo, že je velmi užitečná při rozplétání CNT svazků, ale má různé dopady na jejich elektronické vlastnosti. Přehled metod modifikace CNTs je možné vidět na obrázku 15 [96], [97].



Obr. 15: Přehled metod povrchové modifikace CNTs.

2.12 Možnosti a využití amperometrických biosenzorů

Amperometrické biosenzory se v posledních letech stávají velmi zajímavým odvětvím elektroanalytické chemie. Svojí selektivitou jsou velmi vhodným nástrojem pro analýzu

vzorků s velmi složitou maticí (např. krev, moč). Dnes se amperometrické biosenzory uplatňují také v potravinářství a kontrole životního prostředí. Svými malými rozměry je lze použít i k měřením v terénu. Pomocí biosenzorů je dnes možné stanovit celou řadu analytů: glycerol [86], kyselina askorbová [87], laktát [88],[91], glukóza [89], aminokyseliny [90], ethanol [92], fenol a katechol [98], acetaldehyd [99], siřičitany [100], fruktóza [101]. Dále pak také stanovení glutamátu v instantních potravinách [102], stanovení sarinu v ovzduší (pro vojenské účely) [103], stanovení NH_4^+ v říčních vodách [104] atd.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části jsou uvedeny výsledky prací publikovaných v odborných časopisech. Práce se zabývaly především stanovením peroxidu vodíku, glukózy a etanolu.

3.1 Sloučeniny rhodia jako mediátory

Publikace č. 1 a 2 popisují možnosti využití různých sloučenin rhodia jako mediátorů v amperometrických biosenzorech při stanovení peroxidu vodíku, glukózy a etanolu.

Pro jednotlivé analyty byly optimalizovány pracovní podmínky: pH nosného analytu a jeho průtok, vložený potenciál. Především vložený potenciál má vliv na selektivitu a citlivost měření. Se zvyšujícím se vloženým napětím, kladným nebo záporným, vzrůstá odezva na daný analyt a snižuje se detekční limit. Zároveň se ovšem zvyšuje riziko oxidace nebo redukce přítomných elektroaktivních látek, které mohou způsobit interference. Jako zástupci elektroaktivních látek byly použity kyselina askorbová, kyselina močová a paracetamol.

3.2 Imobilizace enzymu

Důležitým krokem při přípravě biosenzoru je imobilizace enzymu. Zvolíme-li nevhodný postup zachycení enzymu může dojít k jeho denaturaci, nepřímou inaktivaci nebo vymytí z elektrody. V současnosti se používá mnoho zavedených imobilizačních technik, zahrnujících fyzikální a chemické imobilizace. Výběr metody imobilizace enzymu závisí na vlastnostech enzymu, typu převodníku, na podmínkách, při nichž má biosenzor pracovat, a v neposlední řadě na fyzikálních vlastnostech analytu, popř. na velikosti stanovovaných molekul. V ideálním případě by vytvořený biosenzor měl mít co nejkratší dobu odezvy, největší dynamický rozsah koncentrací a velmi citlivé odezvy na daný analyt. V praxi je však nutno přistoupit k určitému kompromisu a upřednostnit jeden parametr před druhým podle požadavků na stanovení.

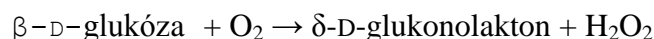
V této práci byly porovnány vybrané imobilizační techniky: imobilizace pomocí membrány z nafionu nebo acetátu celulosy, zesítním s glutaraldehydem, elektropolymerizací s pyrrolem nebo m-fenyldiaminem (články č. 4 a 5).

3.3 Stanovení glukózy

Velký zájem na rychlé a přesné stanovení glukózy je při diagnostice a léčbě cukrovky (Diabetes mellitus). Glukóza se také sleduje ve výrobních procesech (fermentace), při zpracování potravin apod. Ke stanovení glukózy se používá zejména chromatografie, titrační stanovení (metoda Kruisheerovou, podle Luffa-Schoorla nebo Rotsche) a polarimetrie. Při elektrochemickém stanovení glukózy se zejména používají amperometrické biosenzory obsahující enzym glukóza oxidáza nebo glukóza dehydrogenáza.

3.3.1 Enzym glukóza oxidáza

Glukóza oxidáza katalyzuje oxidaci glukózy na glukonolakton v přítomnosti rozpuštěného kyslíku (obr. 16).



Obr. 16: Oxidace glukózy pomocí glukóza oxidázy

Enzym glukóza oxidáza byl součástí biosenzoru, který je popisován v článku číslo 3.

Výskyt: *Aspergillus*, *Penicillium*

Kofaktor: FAD

Kovy a ionty: Fe

pH optimum: 5,5 – 5,8

Využití glukóza oxidázy:

odstranění glukózy (Maillardovy reakce), odstranění kyslíku

příprava kyseliny glukonové

produkce peroxidu vodíku

kvantitativní stanovení glukózy (klinická biochemie) nebo látek, které lze na glukózu převést

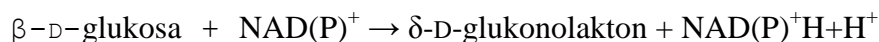
stanovení aktivity enzymů

Specifita:

Substrát	Relativní rychlost oxidace (%)	Substrát	Relativní rychlost oxidace (%)
β -D-glukóza	100	D-galaktóza	0,50
α -D-glukóza	0,64	maltóza	0,20
L-glukóza	0,00	melibióza	0,10
D-manóza	1,00	celobióza	0,09
D-xylóza	1,00		

3.3.2 Enzym glukóza dehydrogenáza

Glukóza dehydrogenáza katalyzuje oxidaci glukózy na glukonolakton za přítomnosti NAD(P)^+ (obr. 17).



Obr. 17: Oxidace glukózy pomocí glukóza dehydrogenázy

Biosenzory obsahující enzym glukóza dehydrogenáza jsou popisovány v článcích 4, 5 a 6.

Výskyt: *Pseudomonas sp*, *Aspergillus*, *Penicillium*

Kofaktor: NAD^+ (NADP^+)

pH optimum: 9,0

Využití glukóza dehydrogenázy:

kvantitativní stanovení glukózy (klinická biochemie) nebo látek, které lze na glukózu převést

Specifita:

Substrát	Relativní rychlost oxidace (%)	Substrát	Relativní rychlost oxidace (%)
D-glukóza	100	D-fruktóza	0,0
L-glukóza	0,0	2-deoxy-glukóza	127,0
D-xylóza	16,2	galaktóza	1,7
D-manóza	5,1	Maltóza	1,4
L-sorbóza	0,0	D-laktóza	1,5

3.4 Stanovení etanolu

Přesné, citlivé a selektivní stanovení etanolu je potřebné v různých odvětvích (potravinářství, forenzika - stanovení etanolu v biologických materiálech). Bylo vyvinuto mnoho analytických metod na stanovení etanolu, např. plynová chromatografie, infračervená spektrometrie v blízké oblasti, destilační metoda, refraktometrická metoda, head-space analýza. Jednou z těchto metod je také enzymatický biosenzor. Nejčastěji používanými enzymy při konstrukci těchto biosenzorů jsou alkohol oxidáza (AOX) a alkohol dehydrogenáza (ADH).

3.4.1 Enzym alkohol oxidáza

Alkohol oxidáza katalyzuje oxidaci nízkomolekulárních alkoholů na odpovídající aldehydy za využití O_2 jako akceptoru elektronů (obr. 18).



Obr. 18: Oxidace nízkomolekulárních alkoholů pomocí alkohol oxidázy

Výskyt: *Candida boidinii*, *Pichia sp*

Kofaktor: FAD

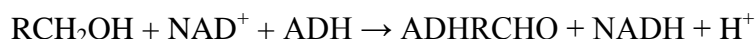
Kovy a ionty: K⁺, MgCl₂

pH optimum: 7,5

Využití: stanovení etanolu (potravinářství, klinická biologie)

3.4.2 Enzym alkohol dehydrogenáza

Alkohol dehydrogenáza katalyzuje reversibilní oxidaci primárních alifatických a aromatických alkoholů na jim odpovídající aldehydy a ketony (obr. 19). ADH má velmi širokou specifitu, nicméně metanol oxiduje mnohem hůře než etanol.



Obr. 19: *Oxidace primárních alifatických a aromatických alkoholů pomocí alkohol dehydrogenázy*

Stanovení etanolu pomocí enzymu alkohol dehydrogenáza je popsáno v článcích 7 a 8.

Výskyt: *Saccharomyces sp.*

Kofaktor: NAD⁺ (NADP⁺)

Kovy a ionty: Zn²⁺, Fe²⁺

pH optimum: 8,6 - 9,0

Využití: stanovení etanolu (potravinářství, klinická biologie)

3.5 Další použité enzymy

3.5.1 Galaktóza oxidáza

Galaktóza se nachází v hydrolyzovaném mléce, syrovátce a dalších mléčných výrobcích: jen velmi malé množství galaktózy se nachází v čerstvém mléce [105],[106][107]. Hydrolýzou laktózy vzniká glukóza a galaktóza. Galaktózu je třeba dále štěpit určitými enzymy: galaktokinázou, galaktózo-1-fosfáturydyl transferázou a galaktózo-6-fosfát empirázou. Nedostatek jednoho z těchto enzymů způsobuje galaktosemii. Proto je důležité kontrolovat přítomnost galaktózy (laktózy) v potravinách.

Galaktóza je enzymem galaktóza oxidáza oxidována na D-galakto-hexodialdózu (obr. 20).



Obr. 20: *Oxidace galaktózy na D-galakto-hexodialdózu pomocí galaktóza oxidázy*

Výskyt: *Dactylium dendroides*

Kofaktor: FAD

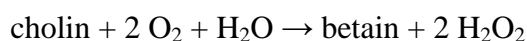
Kovy a ionty: Cu²⁺, Mn²⁺, Fe

pH optimum: 6

Využití: stanovení laktózy
stanovení galaktózy (klinická biochemie – galaktosemie, potravinářství) nebo látek,
které lze na galaktózu převést

3.5.2 Cholin oxidáza

Cholin je kvartérní báze rostlinného i živočišného původu, ve formě esteru s kyselinou fosfatidovou (fosfatidylcholin, lecitin) nebo ve formě sfingomyelinů jakožto významné složky biologických membrán. Vyskytuje se hojně např. v mozku nebo ve vaječném žloutku. Jeho ester s kyselinou octovou, acetylcholin, je významným neurotransmiterem. Cholin se stanovuje v potravinách, ale využívá se ho i při stanovení pesticidů [108],[109][110]. Cholin je oxidován cholin oxidázou na betain (obr. 21).



Obr. 21: *Oxidace cholinu na betain pomocí cholin oxidázy*

Výskyt: *Alcaligenes, Arthobacter*

Kofaktor: FAD

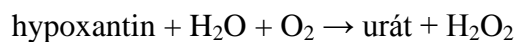
Kovy a ionty: žádné

pH optimum: 8

Využití: stanovení cholinu

3.5.3 Xantin oxidáza

Hypoxantin je hlavní metabolit při štěpení adenosin trifosfátu (ATP), který se akumuluje v biologických tkáních. Množství hypoxantinu se využívá při stanovení čerstvosti masa a při sledování některých patologických procesů v lidském těle [111],[112]. Hypoxantin je oxidován na urát (obr. 22).



Obr. 22: *Oxidace hypoxantinu na urát pomocí xantin oxidázy*

Výskyt: *Escherichia coli, Arthrobacter sp.*

Kofaktor: FAD

Kovy a ionty: Mo, Fe

pH optimum: 7,5

Využití: stanovení hypoxantinu

Biosenzory obsahující enzymy popisované v kapitole 3.5 jsou uvedeny v článku č. 9.

Publikace č. 1

**Rhodium and Its Compounds in Amperometric Biosensors Based on
Redox Enzymes**

Publikace č. 2

Využití sloučenin rhodia v amperometrických biosenzorech

Publikace č.3

Biosensor for determination of glucose

Publikace č. 4

**Screen-Printed Carbon Electrodes Modified by Rhodium Dioxide and
Glucose Dehydrogenase**

Publikace č. 5

Biosenzory využívající dehydrogenázové enzymy a jejich využití

Publikace č. 6

**Tištěné uhlíkové elektrody modifikované RhO_2 a glukóza
dehydrogenázou**

Publikace č. 7

**Determination of ethanol in alcoholic drinks using an enzyme
biosensor containing alcohol dehydrogenase**

Publikace č. 8

**Simple and Rapid Determination of Ethanol Content in Beer Using an
Amperometric Biosensor**

Publikace č. 9

Využití tištěných uhlíkových elektrod modifikovaných RhO₂ ke stanovení biologických látek v potravinách a klinických vzorcích

4 ZÁVĚR

Práce shrnuje výsledky studia katalytických vlastností sloučenin rhodia, jakožto mediátorů v amperometrických biosenzorech, pro stanovení peroxidu vodíku, glukózy a etanolu. Byly použity uhlíkové tištěné elektrody, připravené sítotiskem uhlíkového inkoustu s 5% obsahem dané sloučeniny rhodia, v průtokové analýze. Z provedených analýz se nejlépe osvědčil oxid rhodičitý, který vykazoval největší dynamický rozsah v rozmezí 1-400 mg/l pro peroxid vodíku a 10-400 mg/l pro glukózu. Mezi další výhody oxidu rhodičitého lze zařadit i velikost a stabilitu signálu. Z tohoto důvodu byl oxid rhodičitý vybrán pro následující experimenty.

Dále se práce zabývala výběrem vhodné imobilizace enzymu na povrch elektrody, přičemž bylo testováno několik imobilizačních technik: pomocí membrány z nafionu nebo acetátu celulosy, zesítním s glutaraldehydem, elektropolymerizací s pyrrolem nebo m-fenyldiaminem. U všech zachycení byla optimalizována koncentrace imobilizující látky. Jako nejlepší imobilizační technika byla vyhodnocena elektropolymerizace m-fenyldiaminem. U tohoto způsobu imobilizace byla zjištěna krátká doba odezvy a dostatečná hodnota a stabilita signálu

Enzymové biosenzory byly optimalizovány a testovány v modelových vzorcích glukózy a také v reálném vzorku (instantní čaj, med, sirup) respektive v modelových vzorcích etanolu a reálném vzorku (víno, vodka, whisky, pivo)

Dobré výsledky při stanovení v reálných vzorcích mimo jiné značí, že tyto biosenzory nebyly ovlivněny složitější maticí vzorku (kyselina askorbová a jiné oxidovatelné látky) a lze jej výhledově použít i pro podobné aplikace v potravinářské a klinické praxi.

5 SEZNAM LITERATURY

- [1] Turner A.P.F., Karube I., Wilson G. S (ed.): Biosensors: Fundamentals and Applications, Oxford University Press, 1987.
- [2] D'Souza S.F.: Biosens. Bioelectron. 16 (2001) 337.
- [3] Karel S.F., Libicki S.B., Robertson Ch.R.: Chem. Eng. Sci. 40 (1985) 1321.
- [4] Kwon H.S., Cho M.Y.: Anal. Chim. Acta 264 (1992) 7.
- [5] Davis J., Vaughan D.H., Cardosi M.F.: Enzyme Microb.Technol. 17 (1995) 1030.
- [6] Skládal P.: Biosenzory, Masarykova univerzita, Brno, 1999
- [7] Bilitewski U.: Anal. Chem. 72 (2000) 693.
- [8] Paleček E.: Electroanalysis 8 (1996) 7.
- [9] Wolcott M.J.: J. Food Protect. 54 (1991) 387.
- [10] Boer E., Beumer R.R.: Int. J. Food Microbiol. 50 (1999) 119.
- [11] Kriz D., Ramstrom O., Mosbach K.: Anal.Chem 67 (1995) 2142.
- [12] Kriz D., Ramstrom O., Mosbach K.: Anal.Chem. 69 (1997) A345.
- [13] Seitz W.R.: Biosensors: Fundamentals and applications (Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. ed.), str. 599. Oxford University Press, London and New York, 1987.
- [14] Ramsden J.J.: J. Mol. Recogn. 10 (1997) 109.
- [15] Danielsson B., Mosbach K.: Biosensors: Fundamentals and applications (Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. ed.), str. 599. Oxford University Press, London and New York, 1987.
- [16] Abad J.M., Pariente F., Hernandez L., Abruna H.D., Lorenzo E.: Anal.Chem. 70 (1998) 2848.
- [17] Skládal P.: Chem. Listy 89 (1995) 170.
- [18] Prodromidis M.I., Karayannis M.I.: Electroanalysis 14 (2002) 241.
- [19] Vytřas K.: Kapitoly ze současné potenciometrie (Druhé, doplněné vyd.), Alit, Praha, 1997.
- [20] Valach M., Šturdík E.: Chem. Listy 100 (2006) 330.
- [21] Clark L.C.: Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 2 (1956) 41.
- [22] Updike S.J. a Hicks G.P.: Nature 214 (1967) 986.
- [23] Pappas A.C., Prodromidis M.I., Karayannis M.I.: Anal. Chim. Acta 467 (2002) 225.
- [24] Maines A, Ashworth D, Vadgama P.: Anal. Chim. Acta 333 (1996) 223.
- [25] Reddy S., Vadgama P.: Anal. Chim. Acta 350 (1997) 67.
- [26] Barek J., Opekar F., Štulík K.: Elektroanalytická chemie, Karolinum, Praha, 2005.

- [27] Gorton L.: *Electroanalysis* 7 (1995) 23.
- [28] Švancara I., Vytřas K., Zima J., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 311.
- [29] Švancara I., Schachl K.: *Chem. Listy* 93 (1999) 490.
- [30] Kalcher K., Švancara I., Metelka R., Vytřas K., Walcarius A.: *Heterogenous Carbon Electrochemical Sensors* (2005) 2.
- [31] Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: *Sensors* 4 (2004) 47.
- [32] Lawrence N.S., Deo R.P., Wang J.: *Talanta* 63 (2004) 443.
- [33] Švancara I., Vytřas K.: *Chemija (Vilnius)* 11 (2000) 18.
- [34] Wring S.A., Hart J.P.: *Analyst* 117 (1992) 1281.
- [35] Bilitewski U., Rüger P., Schmid R.D.: *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 369.
- [36] Guo Y., Guadalupe A.R.: *Sens. Actuators B* 46 (1998) 213.
- [37] Koopal C.G.J., Bos A.A.C.M., Nolte R.J.M.: *Sens. Actuators B* 18 (1994) 166.
- [38] Cagnini A., Palchetti I., Lioni I., Mascini M., Turner A.P.F.: *Sens. Actuators B* 24 (1995) 85.
- [39] Wang J., Tian B., Nascimento V.B., Agnes L.: *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3459.
- [40] Vodrážka Z.: *Biochemie. Academia, Praha*, 1999.
- [41] Wang J.: *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH, Weinheim, 1988.
- [42] Pravda M.: *Disseration, Vrije Universiteit, Brusel*, 1998.
- [43] Luong J.H.T., Mulchandani A., Guilbault G.G.: *Trends Biotechnol.* 6 (1988) 310.
- [44] Salleh A.B.: *Biotechnol. Lett.* 4 (1982) 769.
- [45] Skládal P., Nunes G.S., Yamanaka H., Ribeiro M.L.: *Electroanalysis* 9 (1997) 1083.
- [46] Zhang S., Wright G., Yang Y.: *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 273.
- [47] Weetall H.H.: *Biosens. Bioelectron.* 8 (1993) R10.
- [48] Schimizu Y., Morita K.I.: *Anal. Chem.* 62 (1990) 1498.
- [49] Palchetti I., Cagnini A., Del Carlo M., Coppi C., Mascini M., Turner A.P.F.: *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 315.
- [50] Wang J., Li-Huey W., Ziling L., Ruiliang L., Sánchez J.: *Anal. Chim. Acta* 228 (1990) 251.
- [51] Bilitewski U., Chemnitiu G.C., Rüger P., Schmid R.D.: *Sens. Actuators B* 7 (1992) 351.
- [52] Wang J.: *Anal. Chim. Acta* 399 (1999b) 21.
- [53] Hench L., West J.: *Chem. Rev.* 90 (1990) 33.
- [54] Buckley A.M., Greenblatt M.: *J. Chem. Educ.* 71 (1994) 599.

- [55] Audebert P., Demaille C., Sanchez C.: *Chem. Mater.* 5 (1993) 911.
- [56] Narang U., Prasat P.N., Brigit F., Ramanathan K., Kumar N., Malhorta B., Kamalasanana M., Chandra S.: *Anal. Chem.* 66 (1994) 3139.
- [57] Park T., Iwuoha E., Smyth M., Freaney R., McShane A.: *Talanta* 44 (1997) 1120.
- [58] Kane S., Iwuoha E., Smyth M.: *Analyst* 123 (1998) 2001.
- [59] Florou A.B., Prodromidis M.I., Karayannis M.I., Tzouwara-Karayanni S.M.: *Talanta* 52 (2000) 465.
- [60] Mascini M., Mateescu M.A., Pilloton R.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 16 (1986) 149.
- [61] Beyene N.W., Moderegger H., Kalcher K.: *S. Afr. J. Chem.* 56 (2003a) 54.
- [62] Palmisano F., Rizzi R., Centonze D., Zambonin P.D.: *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000b) 531.
- [63] Genies E.M., Penneau J.F., Lapkowski M., Boyle A.: *J. Electroanal. Chem.* 269 (1989) 63.
- [64] Dousikou M.F., Koupparis M.A., Efstathiou C.E.: *IMA '03 - Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications (Thessaloniki, 23.-27. 8. 2003). Book of Abstracts*, str. 742. Ziti, Thessaloniki, 2003.
- [65] Marzouk S.A.M., Sayour H.E.M., Ragab A.M., Cascio W.E., Hassan S.S.M.: *Electroanalysis* 12 (2000) 1304.
- [66] Donald L.E., Jeffrey A.H.: *Ann. Rev. Mater. Sci.* 26 (1996) 365.
- [67] Zhang S., Wright G., Yang Y.: *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 273.
- [68] Yamamoto K., Ohgaru T., Torimura M., Kinoshita H., Kano K., Ikeda T.: *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 201.
- [69] Chaubey A., Malhotra B.D.: *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 441.
- [70] Nakaminami T., Kuwabata S., Yoneyama H.: *Anal. Chem.* 69 (1997), 2367.
- [71] Aoyagi T., Nakanuta A., Ikeda H., Ikeda T., Mihara H, Ueno A.: *Anal. Chem.* 69 (1997), 659.
- [72] Bruneti B., Ugo P., Moretto L.M., Martin C.R.: *J. Electroanal. Chem.* 491 (2000) 166.
- [73] Karyakin A.A., Karyakina E.E., Schumann W., Schmidt H.L., Varfolomeyev S.D., *Electroanalysis* 6 (1994) 821.
- [74] Hendry S.P., Cardovi M.F., Neuse E.W., Turner A.P.F., *Anal. Chim. Acta* 281 (1995) 453.
- [75] Tkáč J., Gemeiner P., Šturdík, E.: *Biotechnol. Techn.* 13 (1999) 931.
- [76] Murthy A.S.N., Anita, Gupta, R.L.: *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 43.
- [77] Mulchandani A., Bassi A.S., Nguyen, A.: *J. Food Sci.* 60 (1995) 74.

- [78] Gunasingham H., Tan C.H.: *Analyst* 115 (1990), 35.
- [79] Kataký R., Bryce M. R., Goldenberg L., Gates S., Nowak A.: *Talanta* 56 (2002) 451.
- [80] Persson B., Lan H.L., Gorton L., Okamoto V., Hale P.D., Boguslavsky L.I., Skotheim T.: *Biosens. Bioelectron.* 8 (1993) 81.
- [81] Cassidy J.F., Clinton C., Breen W., Foster R., O'Donoghue E.: *Analyst* 118 (1993) 415.
- [82] Williams D.L., Doig A.P. Jr., Korosi A.: *Anal. Chem.* 42 (1970) 118.
- [83] Honeychurch K. C., Hart J. P.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 456.
- [84] Smith D. S., Kostov Y., Rao G.: *Sens. Actuators, B* 127 (2007) 432.
- [85] Ybarra G., Moina C., Florit M. I., Posadas D.: *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4727.
- [86] Gamella M., Campuzano S., Reviejo A.J., Pingarrón J.M.: *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 201.
- [87] Wang X., Watanabe H., Uchiyama S.: *Talanta* 74 (2008) 1681.
- [88] Smutok O., Dmytruk K., Gonchar M., Sibirny A., Schuhmann W.: *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 599.
- [89] Jia W.Z., Hu Y.L., Song Y.Y., Wang K., Xia X.H.: *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 892.
- [90] Wcisło M., Compagnone D., Trojanowicz M.: *Bioelectrochem.* 71 (2007) 91.
- [91] Ghamouss F., Ledru S., Ruillé N., Lantier F., Boujtita M.: *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 158.
- [92] Wen G., Zhang Y., Shuang S.: *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 121.
- [93] Iijima, S.: *Nature* 354 (1991) 6348.
- [94] Bethune D.S., Kiang C.H., Devries M.S., Gorman G., Savoy R., Vazquez J., Beyers R.: *Nature* 363 (1993) 6430.
- [95] Wilder J.W.G., Venema L.C., Rinzler A.G., Smalley R.E., Dekker C.: *Nature* 391 (1998) 6662.
- [96] Prášek J., Uhlíkové nanočástice: grafen, nanotrubičky, fullerény. Pdf k dispozici na <http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/data/soubory/CTN,%20grafen,%20fullerenCNTs+grafen+fullereny.pdf>
- [97] Jimenés L.L.: *Carbon Nanotube Polymer Composites: Mechanical, Electrical and Photorefractive properties*, Chalmers university of technology, Švýcarsko, 2007, ISBN 978-91-7291-937-2.
- [98] Rubianes M.D., Rival G. A.: *Electroanalysis* 12 (2000) 1159.

- [99] Ghica M. E., Pauliukaite R., Marchand N., Devic E., Brett C.M.A.: *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 80.
- [100] Dinckaya E., Sezginturk M.K., Akyilmaz E., Nil Ertas F.: *Food Chem.* 101 (2007) 1540.
- [101] Garcia C.A.B., de Oliveira Neto G., Kubota L. T.: *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 201.
- [102] Beyene N.W, Moderegger H., Kalcher K. ; *Electroanalysis* 16 (2004) 268.
- [103] Arduini F., Amine A., Moscone D., Ricci F., Palleschi G.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007)1049.
- [104] Hart J. P., Abass A. K., Cowell D. C., Chappel A.: *Electroanalysis* 11 (1999) 406.
- [105] Acosta P.B., Gross K.C.: *Eur. J. Pediatr.* 154 (1995) 87.
- [106] Sharma S. K., Suman, Pundir C.S., Sehgal N., Kumar A.: *Sens. Actuators, B* 119 (2006) 15.
- [107] Sung W. J., Bae Y. H.: *Sens. Actuators. B* 114 (2006) 164.
- [108] Espionsa M., Atanasov P, Wilkins E.: *Eletroanalysis* 11 (1999) 1055.
- [109] Lin Y., Lu F., Wang J.: *Electroanalysis* 16 (2004) 145.
- [110] Cagnini A., Palchetti I., Lioni I, Mascini M., Turner A.P.F.: *Sens. Actutators, B* 24 (1995) 85.
- [111] Hu A., Xu C., Luo J. Luo J., Cui D: *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 55.
- [112] Mao L. Yamamoto K.: *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 143.