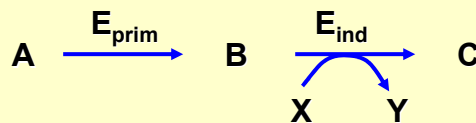


Enzymová stanovení

- kompletní konverze analytu na měřitelné produkty (barevné, fluoreskující, ...) - "end-point" stanovení
- kinetická stanovení - rychlost enzymové reakce limituje analyt (funguje např. jako substrát), ostatní komponenty reakční směsi jsou v nadbytku (další substráty, koenzymy, enzym, ...)
- recyklační stanovení - účastní se dva komplementární enzymy (např. laktát dehydrogenasa a laktát oxidasa)
- katalytická stanovení

Následné reakce

- často nestačí pouze jedna (primární, měřená) reakce, ale je nutné zařadit následné indikační kroky (sekvence reakcí):



$$t \sim 0: [B] \ll K_m^B, v_{\text{ind}} = V_{\text{ind}} \cdot [B] / K_m^B \quad \text{- reakce 1. řádu}$$

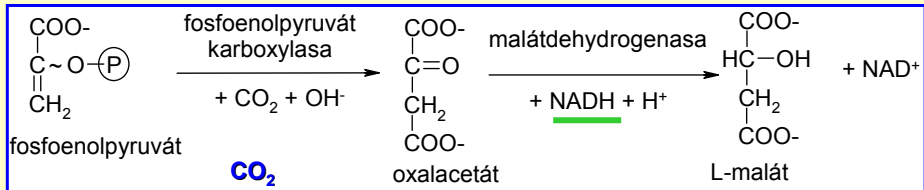
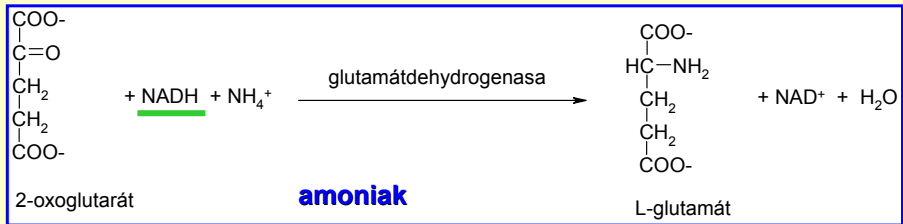
$$t > 0: k[E_{\text{prim}}] = V_{\text{ind}}$$

$$v_{\text{ind}} = V_{\text{ind}}[B] / (K_m^B + [B]) = V_{\text{ind}} / (K_m^B / [B] + 1)$$

$$[B] \geq 100 K_m^B \quad \dots \text{chyba kolem 1\%}$$

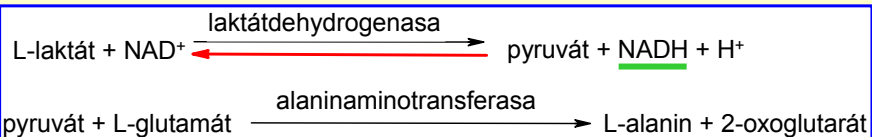
je třeba 10 až 100-násobný nadbytek E_{ind} vůči E_{prim}

Klinická (potravinářská, ...) stanovení

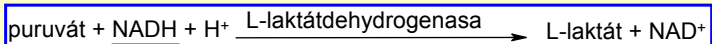


Org. kyseliny

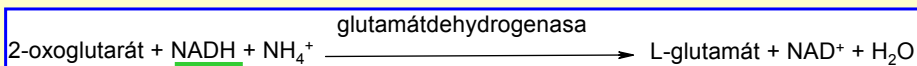
kys. mléčná



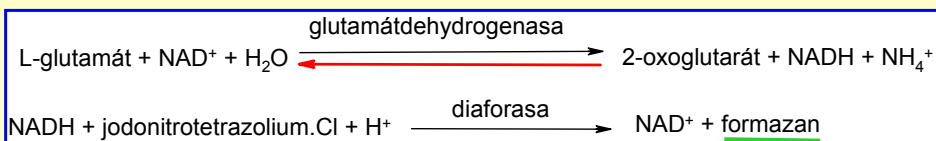
kys. pyrohroznová

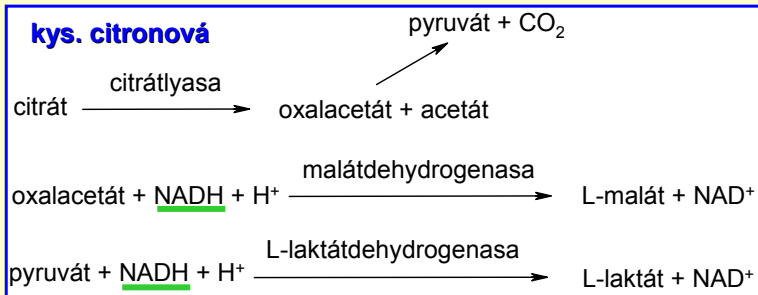
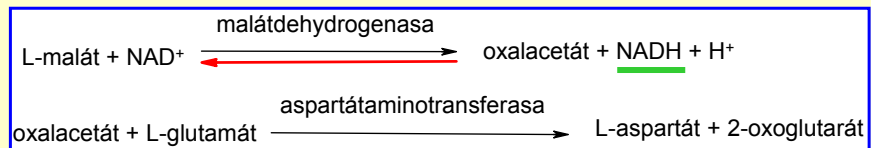
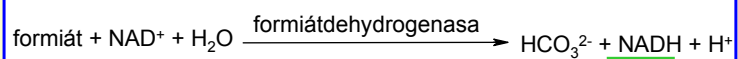
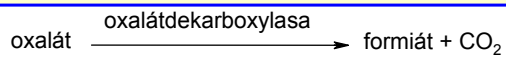
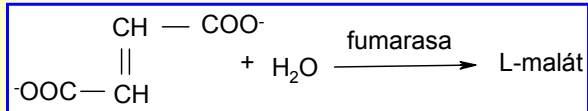


kys. oxoglutarová

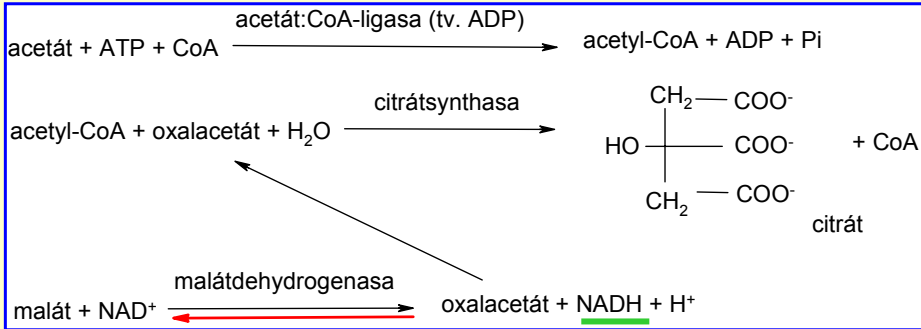
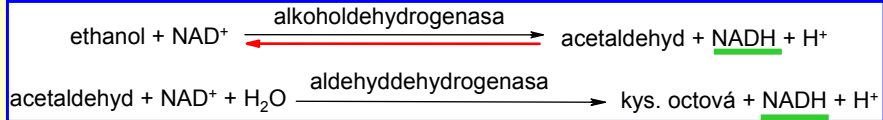


kys. glutamová

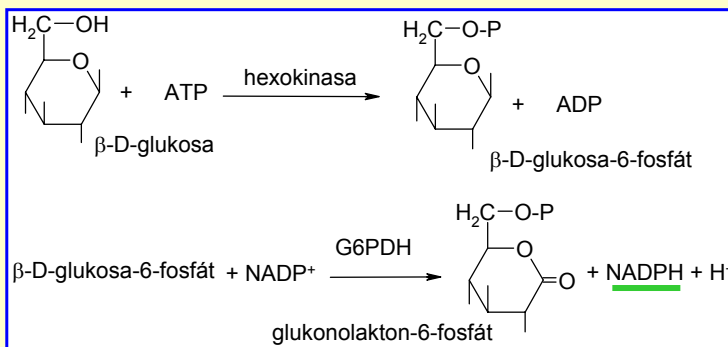
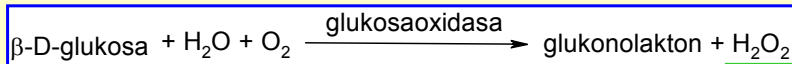


kys. citronová**kys. jablečná****kys. fumarová****kys. šťavelová****kys. mravenčí**

Ethanol, acetaldehyd, kys. octová

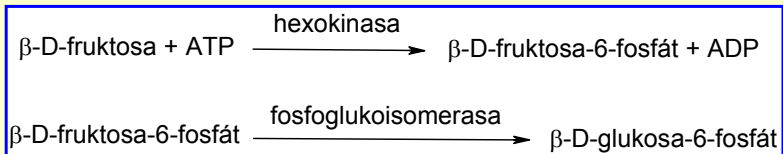


Monosacharidy

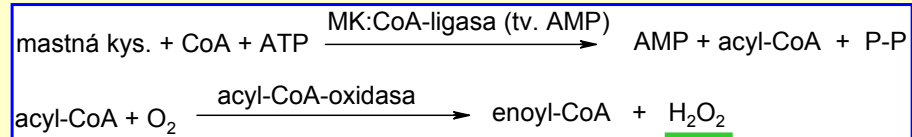
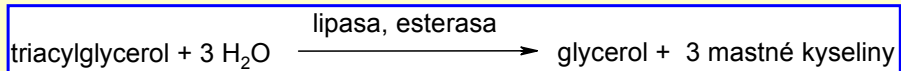
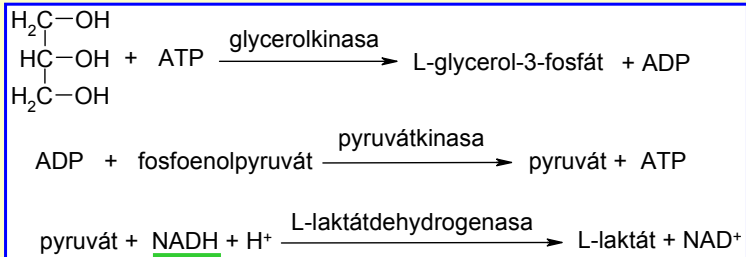


glukosa

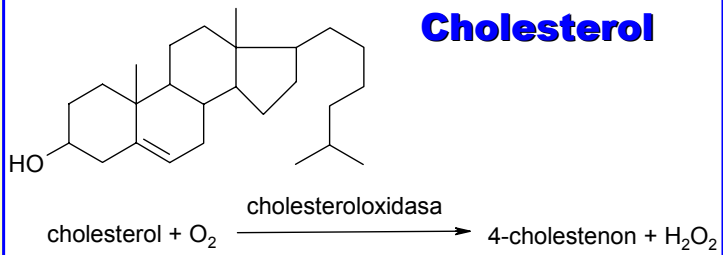
fruktosa



Glycerol, tuky, mastné kyseliny

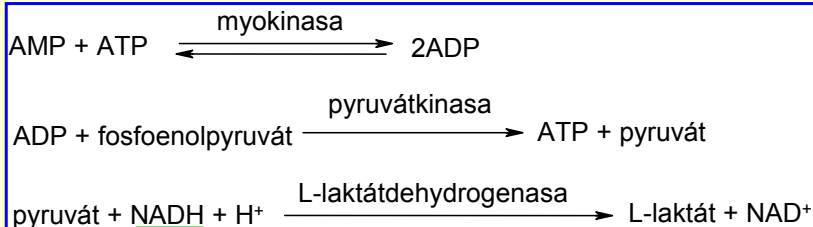


Cholesterol

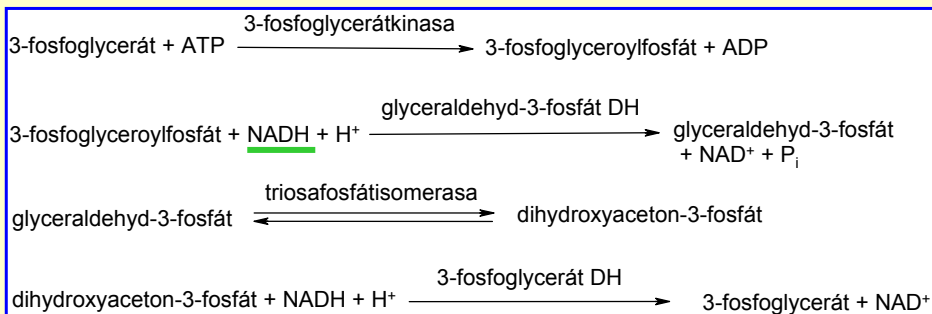


AMP, ADP, ATP

AMP, ADP

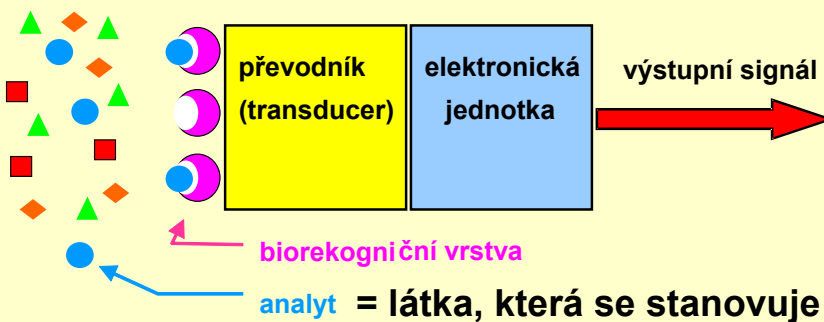


ATP

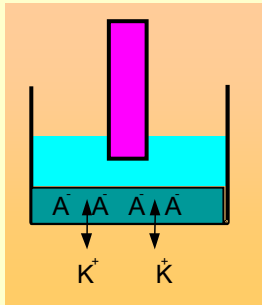


Enzymové biosensory

biosensor je analytický přístroj obsahující **citlivý prvek biologického původu**, který je buď součástí nebo **v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem**. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupiny) chemických látek ve vzorku .



Potenciometrické bioelektrody



- základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem

- převodníkem je iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou
- měří se potenciál pracovní elektrody proti referenční elektrodě, přitom v systému neteče proud

Potenciometrické enzymové elektrody

potenciál ISE pro sledovaný iont (aktivita a_i) v přítomnosti rušivého iontu (aktivita a_j)

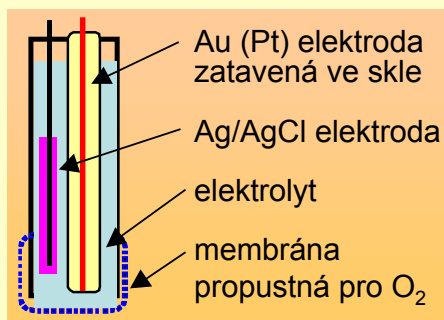
$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i + k_{ij} a_j^{z_i/y_j})$$

- skleněná elektroda - H^+ - měření pH, běžně dostupná
- pevné ISE - tenká vrstva iontového vodiče
 - monokrystal nebo směs krystalů
 - precipitát
 - homogenní nebo
 - heterogenní (mnohonásobně levnější, vlastní materiál dispergován v inertní matrici (PVC, silikon, ...))

Příklady

- **pH** : penicilin (penicilinasa), acetylcholin (cholinesterasa), esterasy, nukleové kyseliny (nukleasy)
- **NH₃ / NH₄⁺** : močovina (ureasa), aminokyseliny (oxidační deaminace - glutamát DH, oxidasa L- / D-aminokyselin; α,γ-eliminace amoniaku – L-methionin γ-lyáza)
- **CO₂** : močovina (ureasa), aminokyseliny (lysin dekarboxylasa, tyrosin dekarboxylasa), laktát (laktát monooxygenasa - dekarboxylující oxidasa)
- **CN⁻** : amygdalin (β-glukosidasa)

Měření kyslíku a H₂O₂

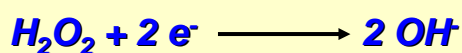
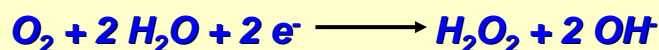


Clarkův **amperometrický** sensor

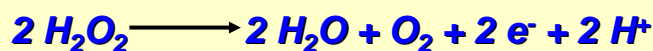
absolutní specifita pouze ke kyslíku - rušivé látky nemohou projít předřazenou membránou

elektroda pro stanovení **peroxidu vodíku** je podobná kyslíkové s tím rozdílem, že není použita plynopropustná membrána a používá se pozitivní polarizace - anodická oxidace peroxidu

Elektrodová redukce kyslíku (-750 mV) je čtyřelektronový proces:



Elektrodová oxidace peroxidu vodíku (> 600 mV):

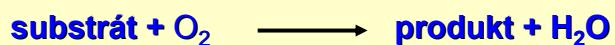
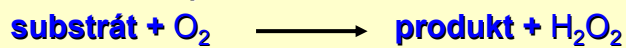


Kyslíková elektroda

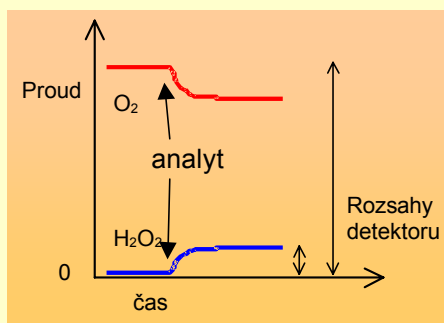


Enzymové elektrody s oxidasami

- tyto enzymy oxidují molekulu substrátu (analytu) za účasti kyslíku, přitom vzniká buď peroxid vodíku nebo voda:



- detekce peroxidu je obecně citlivější (nulová výchozí hladina)



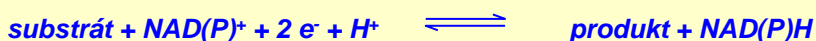
- oxidace peroxidu vodíku je spojená s nebezpečím interference ze strany jiných oxidabilních látek, např. v séru mohou vadit kyseliny askorbová a močová či paracetamol
- specifita se dá zlepšit předřazením kontrolní membrány, která omezí přístup interferujících látek

Přehled oxidas

Substrát oxidasy	Zkratka	EC číslo	koenzym	H ₂ O ₂
Alkohol	AOD	1.1.3.13	FAD	ano
L-Aminokyseliny		1.4.3.2	FAD	ano
D-Aminokyseliny		1.4.3.3	FAD	ano
Askorbát		1.10.3.3	Cu	ne
Bilirubin	BRO	1.3.3.5		ne
Diaminy	DAO	1.4.3.6	Cu	ano
Fenol (Tyrosinasa)		1.14.18.1	Cu	ne
Galaktosa		1.1.3.9	Cu	ano
Glukosa	GOD	1.1.3.4	FAD	ano
L-Glutamát		1.4.3.11	FAD	ano
Cholin		1.1.3.17	FAD	ano
Cholesterol	COD	1.1.3.6	FAD	ano
p-difenoly (Lakasa)		1.10.3.2	Cu	ne
L-Laktát	LOD	1.1.3.2	FAD	ano
L-Laktát (dekarb.)	LMO	1.13.12.4	FMN	ne
L-Lyzin		1.4.3.14		ano
Monoaminy	MAO	1.4.3.4	FAD	ano
NADH				ano
Oxalát		1.2.3.4	Fp	ano
Pyruvát		1.2.3.3	FAD	ano
Sulfit		1.8.3.1	Mo	ano
Urát(Urikasa)		1.7.3.3	Cu	ano
Xanthin	XOD	1.1.3.22	Mo	ano

Enzymové elektrody s dehydrogenasami

- největší skupinou oxidoreduktas jsou dehydrogenasy (250 NAD⁺ a 150 NADP⁺ dependentních enzymů)

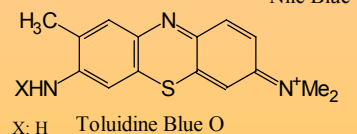
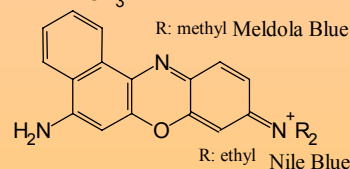


- bioanalyticky významné druhy jsou shrnuty v tabulce:

Přehled dehydrogenas

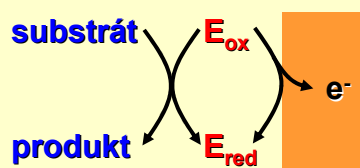
Substrát	Zkratka	EC číslo			
Alkohol	ADH	1.1.1.1	3-Hydroxybutyrát	3-HBDH	1.1.1.30
Aldehyd	AIDH	1.2.1.5	3-Hydroxysteroid	3-HSDH	1.1.1.50
Alanin	Ala-DH	1.4.1.1	Isocitrát	ICDH	1.1.1.42
Formiát	FDH	1.2.1.2	Inositol	IDH	1.1.1.18
Galaktosa	Gal-DH	1.1.1.48	L-Laktát	L-LDH	1.1.1.27
Glycerol	Gly-DH	1.1.1.6	D-Laktát	D-LDH	1.1.1.28
Glukosa	GDH	1.1.1.47	L-Leucin	L-LeDH	1.4.1.9
Glukosa-6-fosfát	G6P-DH	1.1.1.49	L-Malát	L-MDH	1.1.1.37
Glutamát	GIDH	1.4.1.3	Sorbitol	SDH	1.1.1.14

Detekce NAD(P)H



- elektrochemická detekce NADH je možná amperometrickou reoxidací vznikajícího NADH (E° -560 mV/SCE); přímá oxidace vyžaduje vysoký potenciál (přes 1 V na uhlíku), nastává dimerizace a adsorpce produktů na povrchu elektrody
- reoxidace se může provést lépe prostřednictvím modifikujících látek vázaných na povrchu elektrody
- nejčastěji se používají fenaziny, fenoxaziny a fenothiaziny, oxidace nastává již kolem 0 V/SCE
- lze užít také hexakynoželezitan nebo TTF.TCNQ
- průběh reakce je homogenní - vzniká charge transfer komplex CT, po rozpadu je pak reoxidován mediátor, přitom $E > E^\circ$
- lze pracovat při nižším potenciálu

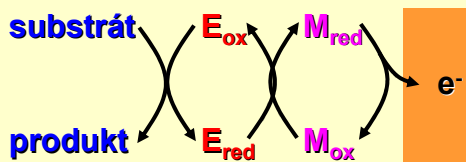
Přenos elektronů z biomolekul



- přímý přenos elektronů pro konstrukci biosenzorů je atraktivní - zjednodušil by konstrukci
- bohužel, byl pozorován u malých redoxních bílkovin (cytochromy *c* a *b*, azurin, ferredoxin) a některých enzymů (lakasa, peroxidasa).

- přímý reversibilní přenos elektronů z biomolekuly (bílkovina, nukleová kyselina) je obvykle ztížen řadou faktorů
- v enzymech se sice vyskytuje celá řada redoxně aktivních skupin (disulfidické můstky, Fe-S skupiny, flaviny, hem, řada iontů kovů), ale nachází se obvykle uvnitř molekuly
- kontakt redoxní skupiny s povrchem elektrody je možný pouze pro orientované molekuly, což výrazně snižuje odezvy
- velikost molekuly vede k velmi pomalé difúzi
- biomolekuly se adsorbují pevně na povrch elektrod a dochází tím současně k jejich denaturaci

Přenos elektronů z biomolekul



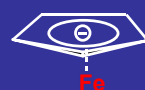
- pro usnadnění výměny elektronů mezi enzymy a elektrodou se používají nízkomolekulární redoxní látky – mediátory
- použití mediátorů urychluje a obvykle vůbec umožňuje výměnu elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou.

Požadavky na mediátor

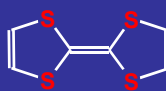
- reaguje s biokomponentou a elektrodou
- dostatečně rychlý přenos elektronů (známa stechiometrie a počet přenášených elektronů)
- stabilní formy (redukováná i oxidovaná) za podmínek použití
- neúčastní se postranních reakcí
- vhodný redoxní potenciál
- bez vlivu pH na průběh redoxní reakce
- netoxický (např. pro aplikace in vivo)
- vhodný k imobilizaci (nerozpustný či snadno adsorbovatelný)

Mediátory

Název	E° (V)
tris-(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III)	1.031
tris-(2,2'-bipyridyl)osmium(III)	0.603
ferrocen-1,1'-dikarboxylová kyselina	0.403
ferrocenylmethyltrimethylamonium	0.388
1,1'-bis(hydroxymethylferrocen]	0.224
ferrokyanid $K^4[Fe(CN)_6]^{4-}$	0.190
hydroxyethylferrocen	0.161
N,N'-dimethyl-p-fenylendiamin	0.139
ferrocenocetová kyselina	0.124
p-benzochinon	0.039
N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin	0.029
2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP)	-0.016
1,2-naftochinon	-0.090
fenazin methosulfát (PMS)	-0.161
methylenová modř	-0.230
tetramethyl-p-benzochinon (durochinon)	-0.191
2-hydroxy-1,4-naftochinon	-0.378
fenosafranin	-0.493



ferrocen Fc

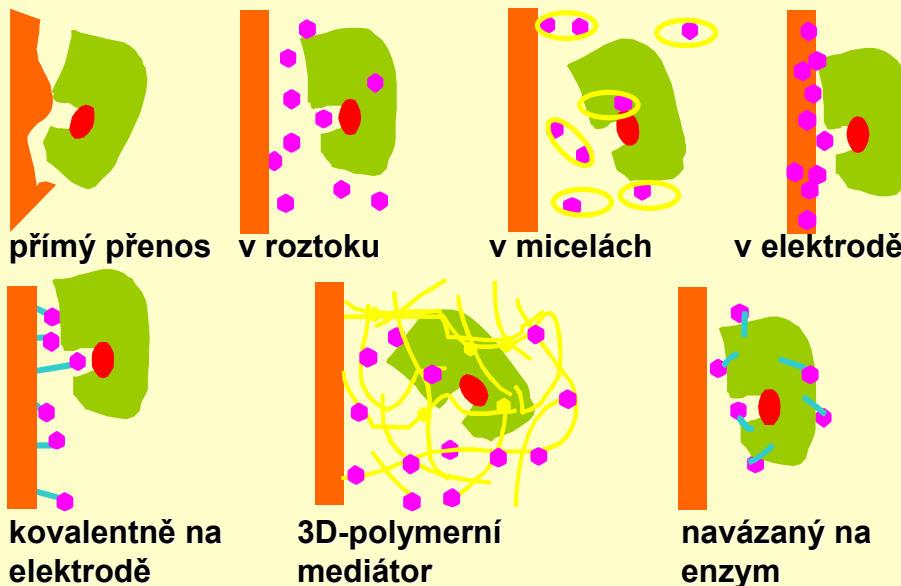


tetrathiafulvalen
TTF



tetrakyanochinodimethan
TCNQ

Použití mediátorů

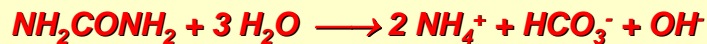


Biosensor pro glukosu



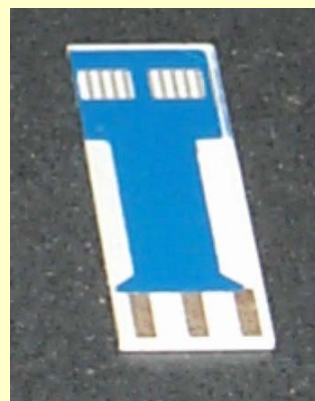
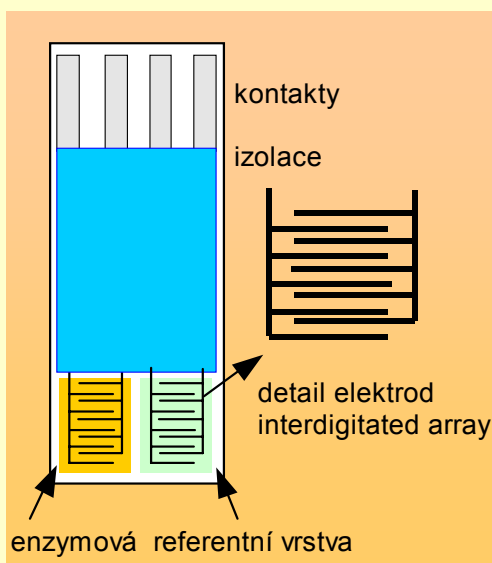
Konduktometrické biosensory

- sledování změn vodivosti - produkce či spotřeba iontů nebo změny velikosti nabitých částic
- vznik iontů je spojen s účinkem hydrolas (lipidy štěpené lipasou) a amidas, změna velikosti nabitých částic probíhá u reakcí fosfatas, sulfatas či nukleas
- klasickým příkladem je reakce ureasy při stanovení močoviny:



- problémem je vlastní vodivost pracovního prostředí (použití málo vodivých pufrů - organické, např. imidazol)
- také změnu vodivosti vyvolanou samotným přídatkem vzorku je třeba odlišit, je žádoucí zanedbat změny vodivosti v celém roztoku a sledovat především těsné okolí elektrod s imobilisovanými enzymy (vlastní signál v důsledku bioreakce)
- proto se výhodně používá diferenční uspořádání.

Konduktometrické převodníky



ukázka dvojitého konduktometrického převodníku (sítotisková technologie, rozměry 7 x 25 mm)

Enzymové optody

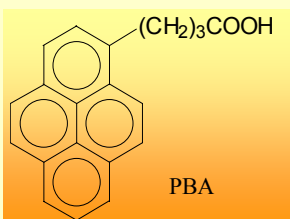
- Přímé typy - opticky měřená látka (nejčastěji fluorofor) se přímo vyskytuje v biokatalytické reakci
- **NADH** - poměrně „slabý“ fluofofor ($\Phi_f = 0.02$), extinkční a emisní maxima jsou při 350 a 450 nm. Biorekogničním elementem jsou dehydrogenasy imobilisované před koncem optického vlákna. Aby se i koenzym dal zachytit v systému biosensory, používá se jeho konjugát s polyethylenglykolem, který neprochází dialyzační membránou. Výhodná je konstrukce senzoru pro alkohol, kde je vzorek oddělen mikroporézní teflonovou membránou, NADH se nachází ve vnitřním roztoku senzoru
- Existuje řada pokusů využít fluorescenci **flavinových koenzymů** ($FADH_2$, $FMNH_2$) vázaných pevně v molekule mnoha oxidas. Při vyšší koncentraci substrátu se zpomaluje zpětná oxidace redukované formy kyslíkem a intenzita „vnitřní“ (intrinsic) fluorescence redukováného koenzymu narůstá. Výhodou je reversibilita takového systému

Enzymové optody

- Nepřímé („mediované“, extrinsic) optické biosensory využívají optické indikátory. Nejčastější jsou optické senzory pro měření kyslíku a pH.
- sledování kyslíku využívá zhasnutí fluorescence indikační molekuly, pokles intenzity fluorescence je dán Stern-Volmerovým vztahem:

$$I_f = I_{f0} / (1 + K_{SV} [O_2])$$

- Indikátor se obvykle nachází v silikonové vrstvě před čelem optického vlákna. Nejčastěji se používá kyselina pyrenmásečná (pyrenebutyric acid, PBA), excitace při 350 až 400 nm; další možnosti jsou perylen a dekacyklen, organokovové komplexy ruthenia lze výhodně excitovat při 460 nm, takže jako zdroj může sloužit modrá LED.



- pH změny lze sledovat pomocí acidobasických indikátorů. Z fluorescenčních lze použít např. 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonovou kyselinu (HPTS, pH přechod 5 až 8) nebo 4-methylumbelliferon. Absorbčních indikátorů je celá řada, kresolová zeleň a bromthymolová modř.