

Iontově selektivní elektrody (ISE)

Biosenzory

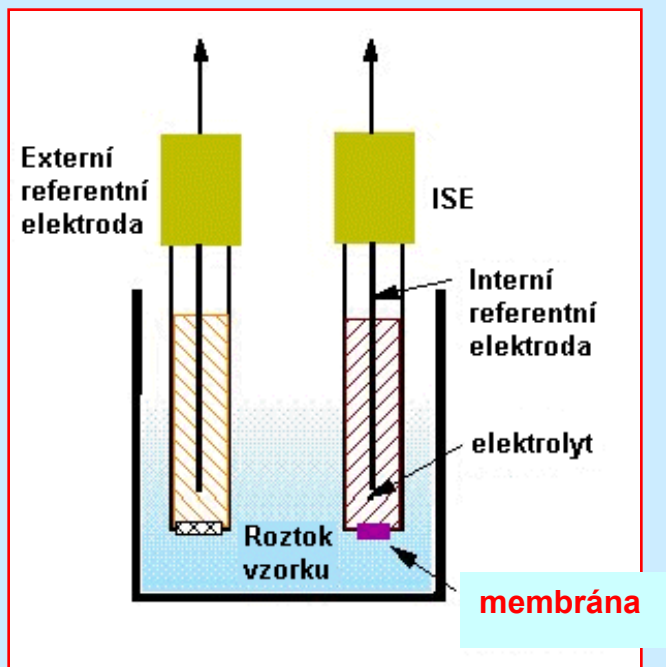
Petr Breinek



Iontově selektivní elektrody

Názvem iontově selektivní elektrody (ISE) jsou obvykle označována **elektrochemická čidla**, která umožňují **potenciometrická měření aktivity iontů** ve vodných nebo smíšených prostředích, případně parciálních tlaků plynů rozpuštěných v kapalinách

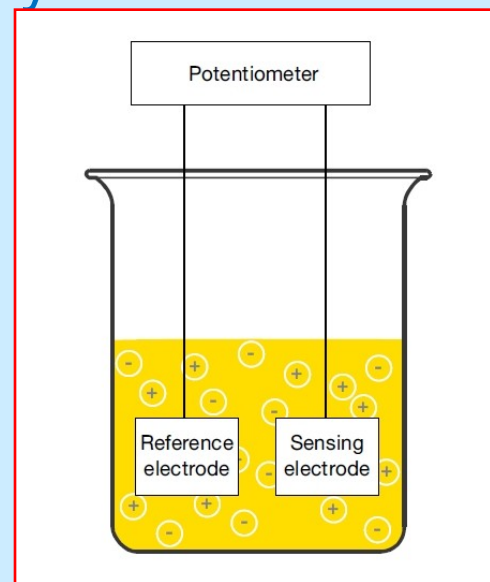
Iontově selektivní elektrody



Selektivitou ISE se rozumí, že membránový potenciál není závislý jen na aktivitě jediné elektricky nabitě částice v proměřovaném roztoku, ale že na jeho hodnotě se mohou podílet i další ionty.

Měřicí systém tvoří:

- ❖ ISE (měřicí) elektroda
- ❖ Srovnávací (referenční) elektroda



Potenciometrie

Potenciometrie je elektroanalytická metoda založená na měření rozdílu elektrického potenciálu (napětí) mezi dvěma elektrodami (oxidačně-redukční reakce) při nulovém elektrickém proudu.

Elektrodou rozumíme kontakt dvou nebo více navzájem nemísitelných fází, na jejichž rozhraní může docházet k redoxním reakcím nebo výměně elektricky nabitých částic. Výsledkem je potenciálový rozdíl mezi fázemi.

Oxidace a redukce

- **Oxidace** je děj, při kterém dochází ke zvyšování oxidačního čísla částice



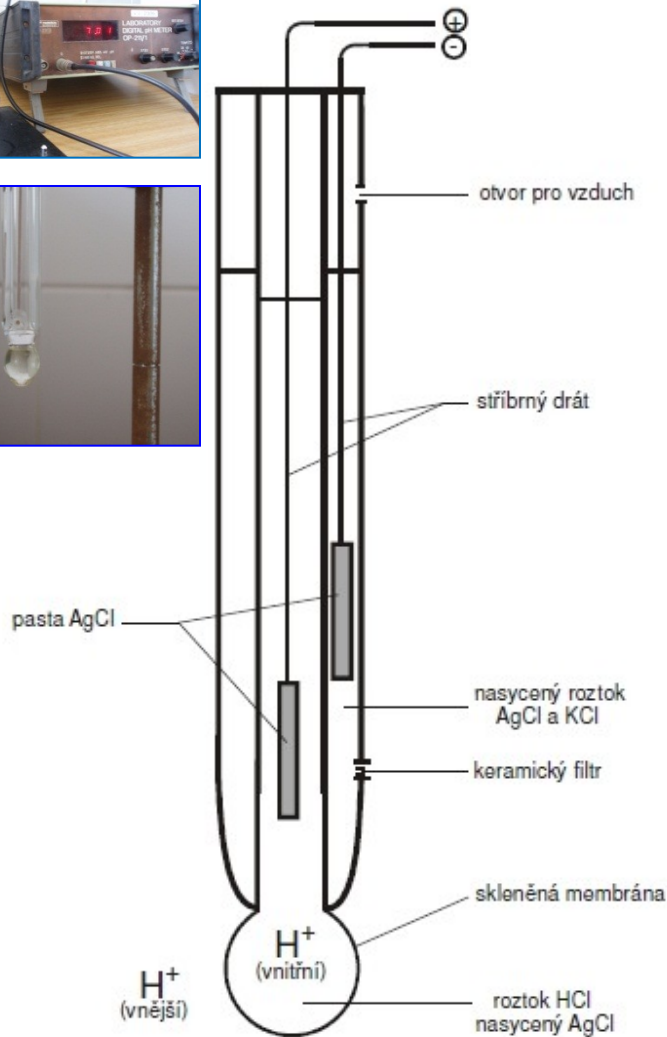
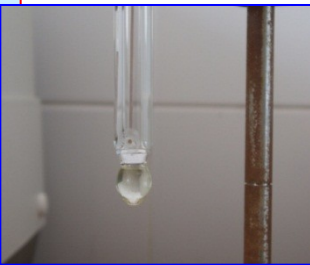
- **Redukce** je děj, při kterém dochází ke snižování oxidačního čísla částice



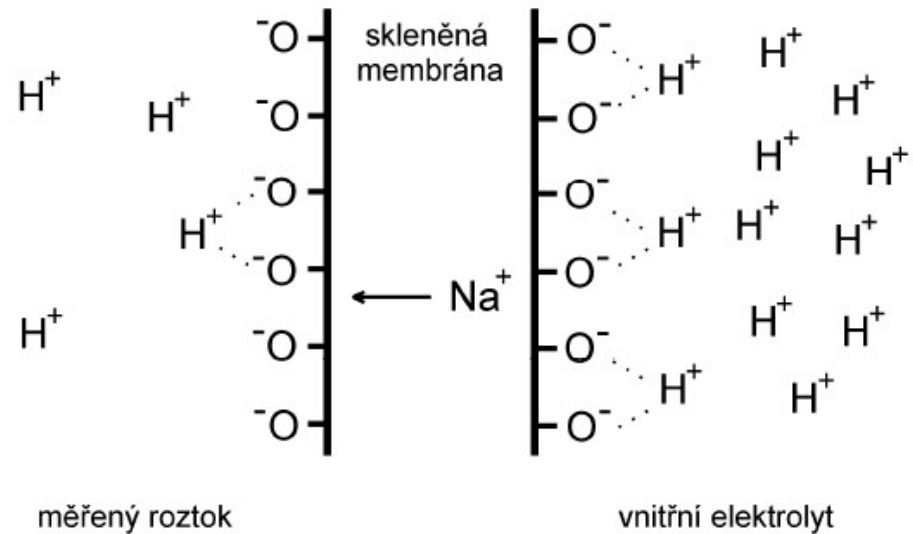
Klasifikace ISE

- **Skleněné elektrody** mají membránu tvořenou různými vícesložkovými skly (např. měření pH)
- **Elektrody s vhodnými přídavnými membránami** (plynové elektrody a elektrody s biokatalytickými membránami (=biosenzory))
- **Elektrody s kapalnou membránou** mají membrány zhotoveny z kapalných iontoměničů nebo ionoforů (valinomycin, nonactin, cyklické ethery atp.). Mezi elektrody s kapalnou membránou patří také ty, jejichž membrána je tvořena měkčenými plasty, v málo těkavém plastifikátoru je současně rozpuštěna vhodná elektroaktivní látka.
- **Elektrody s pevnou membránou** ("solid-state"), tj. membránou tvořenou pevnými, málo rozpustnými solemi (monokrystaly, ztuhlé taveniny nebo tablety z práškových solí). Vnitřní elektrolyt se u tohoto typu elektrod obvykle nahrazuje kovovým kontaktem ("all-solid-state").
- **Elektrody připravené sítotiskovou technikou** – na jednu matici lze vytisknout i více senzorů najednou

Měření pH, skleněná elektroda

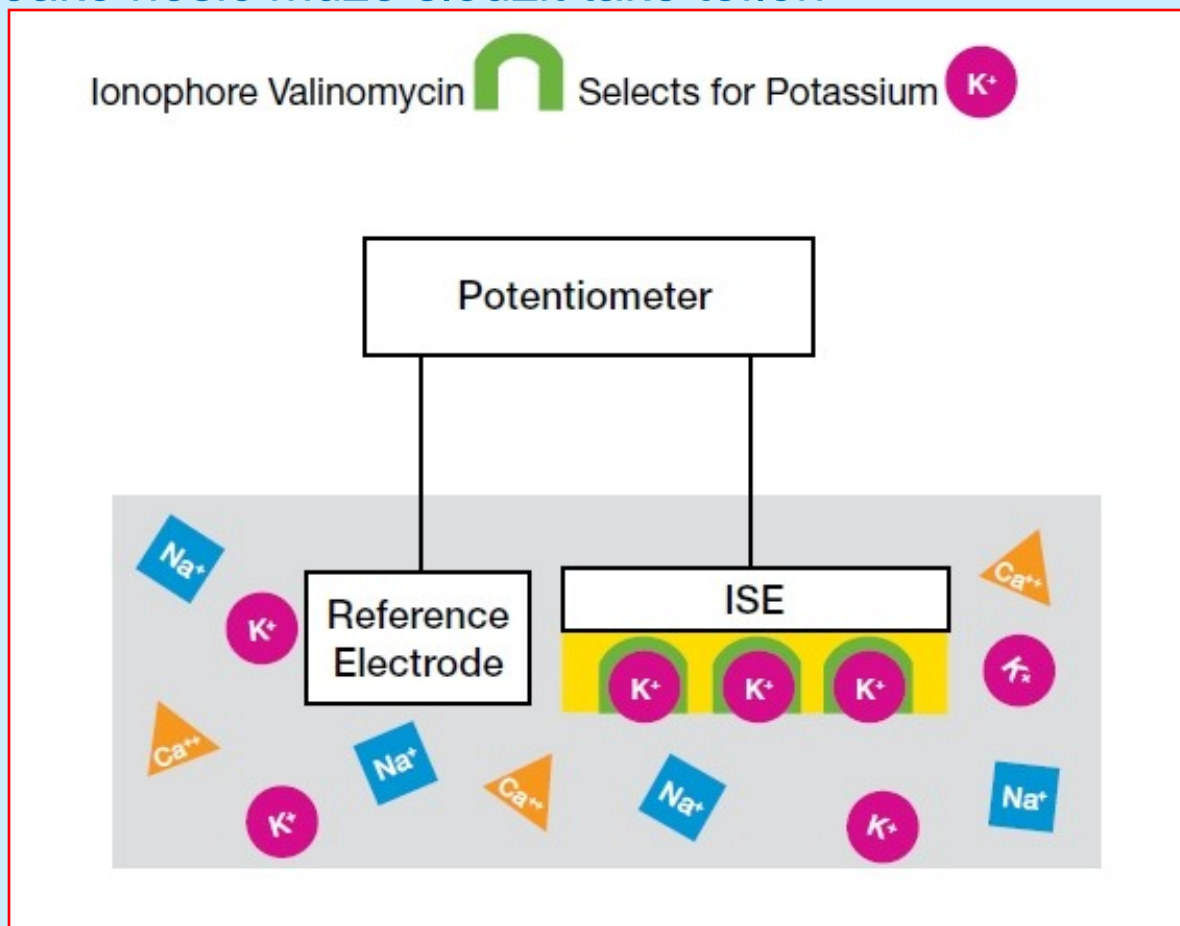


Vznik potenciálu na skleněné elektrodě je výsledkem výměnných dějů mezi ionty v krystalické mřížce skla a ionty v roztoku.



Stanovení K^+

- ✓ Iontově selektivní membrána obsahuje specifický nosič draselných iontů, kterým je neionogenní makrocyclické antibiotikum **valinomycin** rozpuštěné v dioktyladipátu na porézním PVC nosiči. Jako nosič může sloužit také teflon



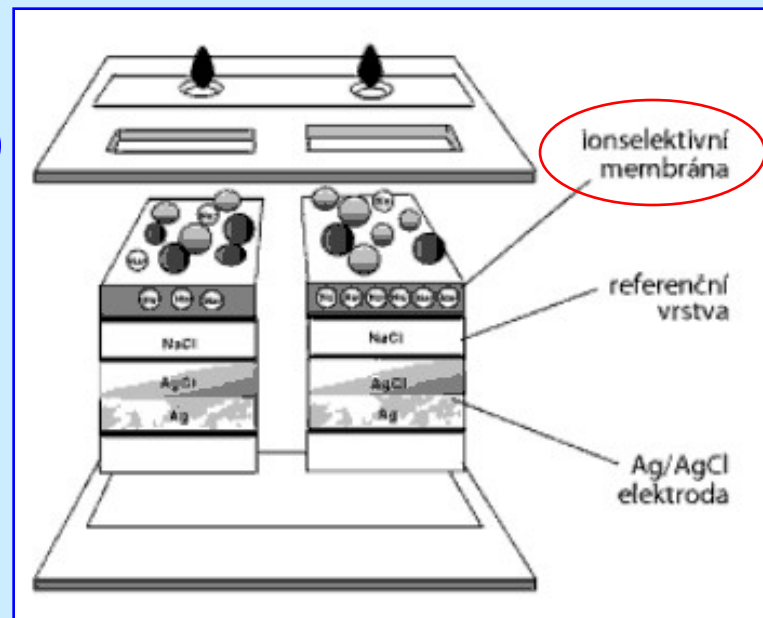
✓ Méně obvyklý je použití ionogenního **tetra(p-chlorfenyl)boritanový aniontu**

✓ Dále se používají tzv. „**crown**“ **etery**, zejména v ISE japonských analyzátorů (např. 18-crown-6) nebo kryptandy (např. kryptand 2.2.2)

Používá se buď **přímé měření** (bez ředění - měřenou veličinou je aktivita ve vodné fázi) nebo **nepřímé měření** (s ředěním/ dilucí – aktivita odpovídá koncentraci v celém vyšetřovaném vzorku)

Stanovení Na^+

- ✓ Skleněná elektroda
- ✓ Dále se používají tzv. „crown“ étery integrované do plastové membrány
- ✓ Směs několika ionoforů („koktail“)
- ✓ Stanovení Na^+ v pevné fázi



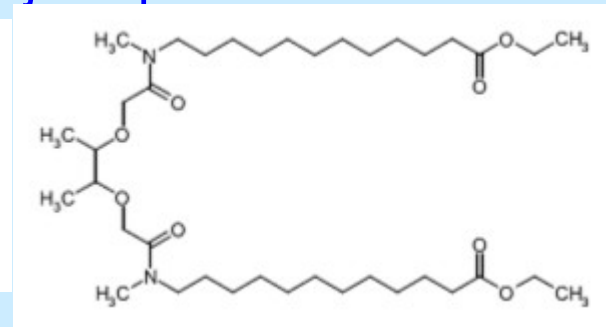
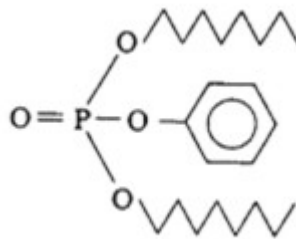
Stanovení Cl⁻

- ✓ Nejvíce používaná je iontově-výměnná membrána obsahující kvartérní amoniovou sůl jako anex, např. tri-n-oktylpropylamoniumchlorid v n-dekanolu.
- ✓ Kapalná membrána může obsahovat také o-fenantrolin.
- ✓ Elektrody s pevnou membránou, obsahující AgCl zapuštěný v lůžku z epoxidové pryskyřice či silikonového kaučuku
- ✓ Stanovení Cl⁻ v pevné fázi

Stanovení Ca^{2+} (ionizované)

✓ Elektrody **ionexového typu** s kapalnou membránou, obsahují organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, ve kterém jsou rozpuštěny látky schopné vyměňovat nebo zachycovat ionty z vnějšího roztoku (didecylfosforečnan vápenatý v dekan-1-olu nebo dioktylfenylfosfonátu).

Hydrofobní přepážka (obvykle z PVC) odděluje kapalnou membránu od měřeného roztoku.



✓ Elektrody s **neutrální membránou** zachycují vápenaté ionty do dutin, které jim vyhovují svou velikostí (jedná se o syntetické cyklické polyétery, např. ETH 1001 nebo přírodní makrocyclické sloučeniny).

ISE 9180 analyzátor elektrolytů

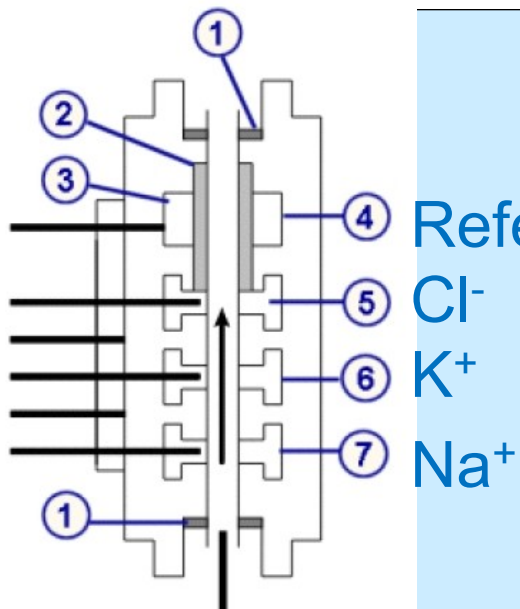


Měřené parametry
(konfigurace elektrod)

Na ⁺	K ⁺	
Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺
Na ⁺	K ⁺	Li ⁺
Na ⁺	Li ⁺	
Li ⁺		



KCl



Referenční elektroda

Cl⁻

K⁺

Na⁺

Elektroda	Popis
Sodík (Na ⁺)	Crown éterový ionofor integrovaný do iontově-selektivní plastové membrány. (Jelikož se nejedná o skleněnou elektrodu, je měření méně ovlivněno změnami pH.)
Draslík (K ⁺)	Valinomycin integrovaný do iontově-selektivní plastové membrány.
Chloridy (Cl ⁻)	Kotouč vyrobený z chloridu stříbrného (AgCl).
Referenční elektroda	Stříbrno-stříbrná elektroda (Ag/Ag) uložená v gelovém roztoku chloridu draselného (KCl), který je od vzorku oddělen pomocí porézní keramické trubice.

Biosenzory

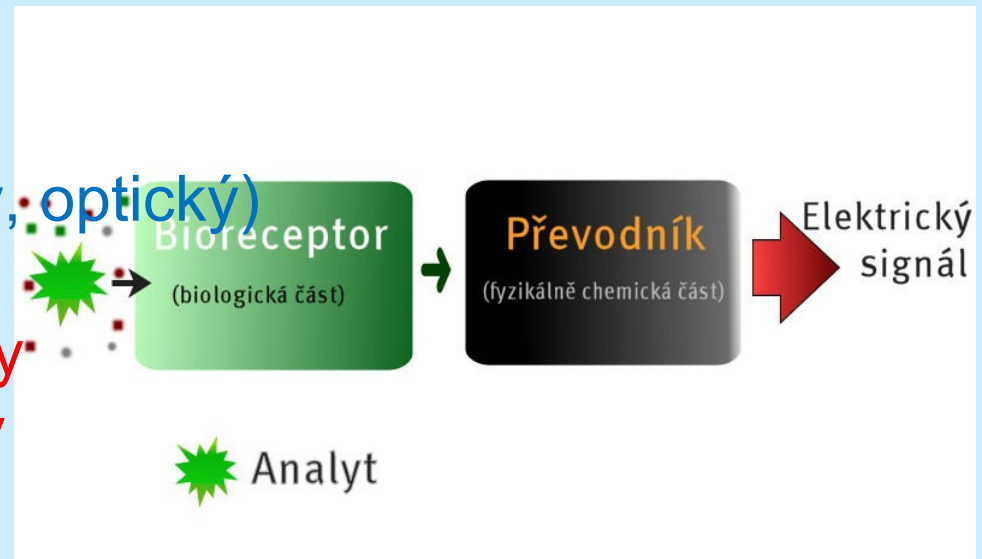
Biosenzor je analytický přístroj, v principu ISE, obsahující **bioreceptor** a fyzikálně-chemický **převodník**.

Bioreceptory jsou molekuly, často **enzymy**, které rozpoznávají látku, která má být analyzována. Důležitou částí je i nosič bioreceptoru.

- Biokatalytické
- Bioafinitní (imunosenzory)

Převodník (elektrochemický, optický)

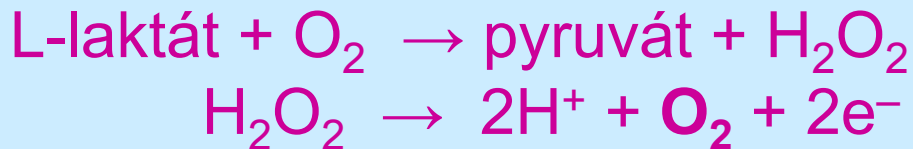
- potenciometrické biosenzory
- amperometrické biosenzory



Stanovení laktátu

a) Polarografie (amperometrie)

Měrná elektroda je potažena **laktát oxidázou** (odtud název „**laktátová**“ **elektroda**“). Při konstantním potenciálu (přepětí) je vzniklý proud úměrný koncentraci peroxidu vodíku.



Elektroda je vlastně modifikací Clarkovy kyslíkové elektrody.

Laktátový senzor obsahuje většinou čtyři elektrody:

- platinovou měrnou elektrodu potaženou laktát oxidázou
- srovnávací argentchloridovou elektrodu
- platinovou elektrodu určenou ke stabilizaci konstantního potenciálu
- platinovou elektrodu bez enzymu sloužící ke stanovení interferujících látek

Stanovení laktátu

b) Potenciometrie

Využívá se ferrikyanidu jako mediátoru elektronů. Laktát se laktát oxidázou (LO) oxiduje na pyruvát a současně se ferrikyanid redukuje na ferokyanid. Ten při zpětné oxidaci předává elektrony na platinovou katodu, kde dochází k jejich spotřebě při redukci kyslíku na vodu.

Zařízení není běžně dostupné.

Byl popsán také postup s grafitovou elektrodou potaženou laktát oxidázou a peroxidázou, kdy jako mediátor elektronů byl využitý systém ferrocen-ferricin.

Ampérometrie

Ampérometrie je elektroanalytická metoda založená na **měření elektrického proudu** při konstantním napětí.

Využívá se skutečnosti, že některé látky mohou být oxidovány nebo redukovány na inertní kovové elektrodě, na kterou je vložen určitý elektrický potenciál, ten způsobí buď oxidaci nebo redukci, výsledkem je elektrický proud, který se měří.

Příklady přístrojů na stanovení laktátu



Stanovení glukózy (biosenzory)



glukózaoxidáza (GOD)



1. Stanovení H_2O_2

- přímá oxidace leukobází na barevné produkty
- oxidační kopulace mezi aromatickými aminy a fenoly katalyzovaná peroxidázou (POD)
- elektrooxidace H_2O_2 - ampérometrická detekce signálu

2. Měření úbytku O_2 – ampérometrická detekce pomocí Clarkovy elektrody

3. Ampérometrické měření signálu s novými elektronovými akceptory elektronů místo kyslíku, tzv. mediátory (ferroceny, chinony)

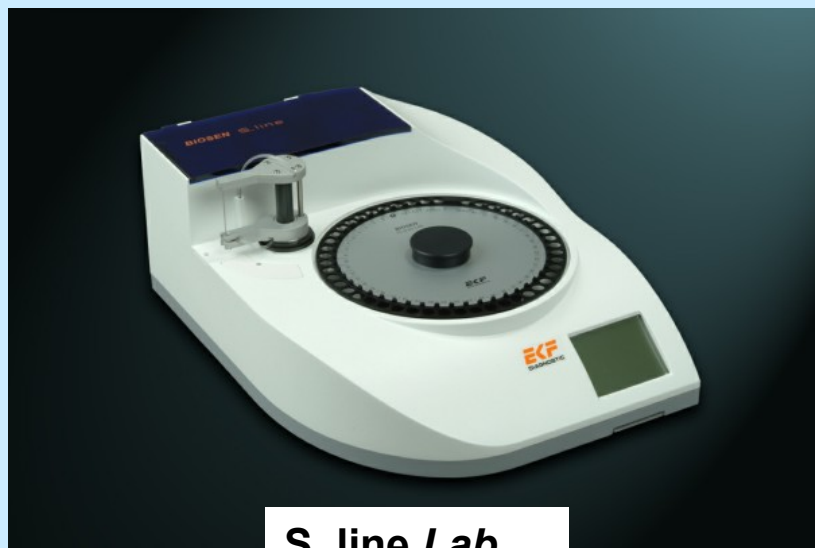
Analyzátory glukózy/laktátu BIOSEN



- Stanovení 120 až 180 vzorků za hodinu
- **Čipové senzory**
- 20 μ l vzorku (krev, plazma, sérum) se ředí 1ml systémovým roztokem
- Pravidelná kalibrace



Model
5040



S_line Lab



S_line Lab+

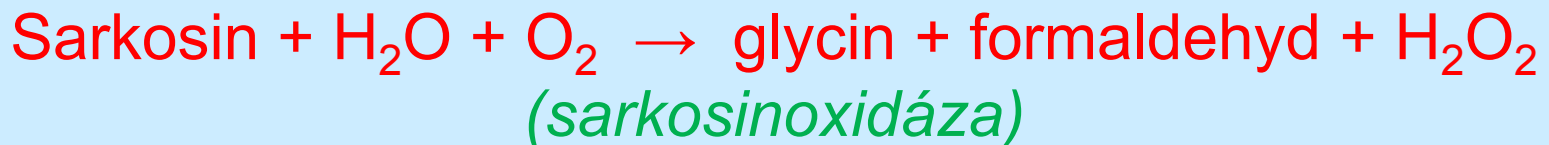
Stanovení kreatininu (biosenzory)

Princip: polarografie (amperometrie)

Používají se dvě kreatininové elektrody.

Jedna elektroda umožňuje stanovit kreatinin i kreatin přítomné v analyzovaném vzorku krve, druhá elektroda stanovuje pouze kreatin. Po odečtení obou signálů a tedy kompenzaci interferujících látek v analyzovaném vzorku krve je stanoven kreatinin.

Obě elektrody mají podobné složení liší se jen v počtu imobilizovaných enzymů na membráně (jedna elektroda obsahuje všechny tři enzymy, druhá elektroda obsahuje pouze poslední dva enzymy).



Stanovení kreatininu (biosenzory)

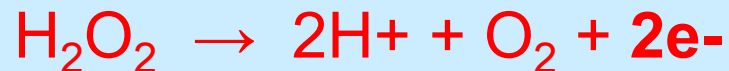
Kreatinin + H₂O ↔ kreatin (*kreatinináza*)

Kreatin + H₂O → sarkosin + močovina (*kreatináza*)

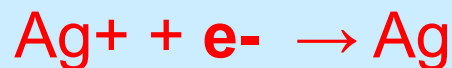
Sarkosin + H₂O + O₂ → glycin + formaldehyd + H₂O₂ (*sarkosinoxidáza*)

Vznikající peroxid vodíku (H₂O₂) je transportován k platinové elektrodě, mezi elektrody je vloženo polarizační napětí (675mV), dochází k oxidaci peroxidu vodíku, při které vzniká elektrický proud úměrný množství peroxidu vodíku a tedy i koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku krve.

Na anodě probíhá oxidace (při které vznikají elektrony) peroxidu vodíku



Na katodě probíhá redukce (při které jsou spotřebovávány elektrony) Ag⁺ (z AgCl) na Ag:



Dva stříbrné kationy jsou redukovány při oxidaci jedné molekuly peroxidu vodíku.

Stanovení močoviny (biosenzory)

Princip: potenciometrický biosenzor se zakotvenou ureázou, stanovuje se:

- vznikající oxid uhličitý (pCO₂ elektroda)



- nebo amonné ionty vytvářené ze vzniklého amoniaku

