

У С П Е Х И Х И М И И

Т. XLV

1976 г.

Вып. 2

УДК 543.866 : 541.13

ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ

И. В. Березин, А. А. Клёсов

Дан обзор литературных данных по применению иммобилизованных ферментов в аналитической химии. Изложены основные предпосылки создания кинетических методов ферментативного анализа. Подробно обсуждены типы ферментных электродов, факторы, влияющие на отклик ферментных электродов, стабильность и чувствительность электродов. Рассматриваются возможные пути дальнейшего развития ферментных электродов для применения их в лабораторной и технологической практике, а также для контроля окружающей среды.

Библиография — 69 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| I. Введение | 180 |
| II. Специфичность действия ферментов | 181 |
| III. Иммобилизация ферментов | 182 |
| IV. Применение иммобилизованных ферментов в аналитической химии | 183 |
| V. Устройство ферментных электродов | 187 |
| VI. Кинетические аспекты действия ферментных электродов. Факторы, влияющие на отклик | 194 |
| VII. Стабильность ферментных электродов | 198 |
| VIII. Проблемы и перспективы | 199 |

I. ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие отмечено бурным развитием исследований в области иммобилизации ферментов и применения их в технологических, аналитических и научных целях. Перевод ферментов в водонерастворимое состояние с сохранением каталитической активности позволил чрезвычайно расширить представления о возможности применения биоорганических катализаторов в самых различных областях химии, тонкой химической технологии, фармакологии, медицины. Благодаря своей высокой специфичности, ферменты уже много лет назад нашли применение в области аналитической химии; ежегодно публикуются сотни работ, посвященных кинетическим методам ферментативного анализа. Применение для этих целей иммобилизованных ферментов дало толчок для создания методов «безреагентного» анализа, позволяющих в принципе проводить непрерывный анализ водных растворов органических (а в ряде случаев и неорганических) соединений. В свою очередь, достижения в этой области способствуют развитию эффективных методов контроля окружающей среды, клинической диагностики и т. д. Наконец, разработанные в последнее время так называемые «ферментные электроды» позволяют проводить быстрый автоматический анализ многокомпонентных систем, основываясь на комбинированных электрохимических системах типа «электрод — фермент», обладающих высокой селективностью к определенным индивидуальным соединениям или классам соединений.

Внимание, которое в последнее время уделяется разработке ферментных электродов и изучению перспектив применения их в аналитической химии, объясняется отчасти бурным развитием методов выделения,

очистки и идентификации ферментов. Согласно данным, представленным на Симпозиуме по биотехнологии и биоинженерии в Хеникере¹, число найденных и охарактеризованных ферментов возросло с 80 в 1928 году до полутора тысяч в 1969 году, и продолжает возрастать по экспоненциальному закону с периодом удвоения в 10 лет.

Настоящий обзор представляет собой попытку суммировать и систематизировать работы по применению иммобилизованных ферментов в аналитической химии, опубликованные до апреля 1974 года, и оценить ближайшие перспективы в этой области.

II. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Наиболее характерной особенностью ферментативного катализа является специфичность действия ферментов. Из этого чрезвычайно емкого термина в настоящее время принято выделять по меньшей мере три общих качественных типа специфичности: специфичность к среде, специфичность к реакции и субстратную специфичность (специфичность к структуре субстрата). Первые два типа специфичности выражаются обычно в том, что фермент катализирует реакцию определенного типа в определенных условиях, и являются основой для разделения ферментов на соответствующие классы (оксиредуктазы, трансферазы, гидrolазы, лиазы, изомеразы и лигазы, или синтетазы)². Субстратная специфичность фермента является наиболее ярким его признаком, не находящим пока достаточных аналогий в неферментативном катализе и позволяющим однозначно характеризовать и идентифицировать данный фермент среди сотен и тысяч других. Обычным явлением для ферментативных реакций является то, что фермент катализирует превращение только одной стереохимической формы субстрата, будучи полностью неактивным по отношению к другим стереоизомерам (так называемая стереохимическая специфичность фермента).

В ряде случаев фермент обладает абсолютной специфичностью, катализируя превращение только одного вещества и не реагируя с его производными или гомологами. Так, бутандиолдегидрогеназа катализирует превращение 2,3-бутандиола в ацетоин, но совершенно не окисляет этиленгликоль, глицерин, этанол, изопропанол, изобутанол, изоамиловый спирт или глюкозу³. Лактальдегидредуктаза, катализирующая обратимую реакцию превращения *D*-лактальдегида в 1,2-пропандиол, полностью неактивна по отношению к *L*-лактальдегиду, ацетальдегиду, пропиональдегиду, гликолевому альдегиду, ацетолу, глиоксиловой кислоте, пировиноградной кислоте, *D*-галактозе, *D*-маннозе, *D*-фруктозе, *D*- или *L*-арabinозе и *L*-рамнозе⁴. Маннитолдегидрогеназа, катализирующая превращение *D*-фруктозы в маннитол, не действует на *D*-глюкозу, *D*-маннозу или *D*-рибозу⁵. Глюкозооксидаза, окисляющая β -*D*-глюкозу с образованием глюконовой кислоты, действует на 2-дезокси-*D*-глюкозу в 4 раза медленнее, на 6-метил-*D*-глюкозу в 50 раз медленнее, на *D*-маннозу и *D*-ксилозу — в 100 раз медленнее, на α -*D*-глюкозу в 200 раз медленнее, и на остальные 80 сахаров, которые испытывали в качестве субстратов, не действовала вовсе⁶. Формальдегид-дегидрогеназа, окисляющая формальдегид до муравьиной кислоты, не реагирует с ацетальдегидом, гликольальдегидом и бензальдегидом⁷. Бензальдегид-дегидрогеназа, превращающая бензальдегид в бензойную кислоту, совершенно не окисляет ацетальдегид, пропиональдегид, кротональдегид, формальдегид и *D,L*-глицеральдегид⁸. Аминобутиральдегид-дегидрогеназа из всех алифатических альдегидов действует только на 4-аминобутиральдегид, окисляя его до 4-аминомасляной кислоты⁹.

С другой стороны, большое количество ферментов проявляет широкую специфичность, не предъявляя жестких требований к структуре субстратов. Так, субстратами α -химотрипсина являются очень большое число соединений общей формулы $R_1CH(R_2)COR_3$, где заместители R_1 , R_2 и R_3 могут структурно варьироваться практически неограниченно¹⁰. Для иллюстрации чрезвычайно широкой специфичности α -химотрипсина можно указать, что этот фермент способен катализировать гидролиз белков, пептидов, сложных эфиров, амидов, гидразидов, алкиламидов, ангидридов, хлорангидридов, гидроксамидов, анилидов, тиоэфиров, оксазолонов, циклопентидов, циклофосфатов, лактонов, сульфонов, а также в некоторых случаях расщеплять C—C-связь. Альдегидоксидаза проявляет групповую специфичность по отношению к алифатическим альдегидам, катализируя реакции окисления формальдегида (1,0), ацетальдегида (4,6), пропиональдегида (5,1), бутиральдегида (12,2), валеральдегида (2,4), кротональдегида (7,6); в скобках указаны относительные значения реакционной способности альдегидов в данной ферментативной реакции¹¹.

Высокая специфичность ферментов (абсолютная или групповая) в сочетании с такими благоприятными факторами, как большая скорость ферментативных процессов, мягкие условия проведения реакций (комнатная температура, атмосферное давление, нейтральные значения pH среды и т. д.), а также достаточно широкий выбор доступных ферментов, обеспечили развитие нового направления аналитической химии — кинетических методов ферментативного анализа. Реакции, катализируемые ферментами, применяются для определения субстратов, ингибиторов, активаторов, а в ряде случаев и самих ферментов (это относится в первую очередь к анализу биологических жидкостей в клинических лабораториях). Применение ферментов в аналитической химии рассматривается в ряде обзоров и монографий¹²⁻¹⁹. Однако, несмотря на ряд очевидных достоинств кинетических методов ферментативного анализа, их применение в лабораторной практике пока довольно ограничено. Одной из основных причин этого продолжает оставаться высокая стоимость большинства ферментов, которая делает практически невозможным применение ферментативных методов анализа в широких масштабах (учитывая одноразовое использование ферментов, как следствие чрезвычайной трудоемкости регенерации их из реакционной смеси). Этот недостаток усугубляется еще и невысокой стабильностью большинства ферментов, что приводит зачастую к их полной инактивации в течение нескольких дней, а иногда и нескольких часов при условиях, оптимальных для аналитических целей.

Таким образом, для повышения «технологичности» ферментов необходимо добиться увеличения их стабильности, с одной стороны, и создать возможности для многократного использования ферментов, с другой. Это достигается в принципе превращением ферментов в гетерогенные катализаторы с помощью их иммобилизации.

III. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Иммобилизацией ферментов называется перевод их в водонерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) катализитической активности. Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы (см. обзоры²⁰⁻²⁴):

1. Ковалентное присоединение молекул ферmenta к водонерастворимому носителю (целлюлоза, агароза, декстран, стекло, бумага, ткань, полистирол, нейлон, металлы, ионообменные смолы и т. д.).
2. Захват ферmenta в сетку геля или полимера.

3. Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом при помощи би- или полифункционального реагента.

4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (как правило, на ионитах).

5. Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5—300 микрон).

Наиболее распространенными являются первые два метода иммобилизации. Ковалентное связывание фермента с носителем приводит к устойчивой системе, в которой белок не может быть десорбирован при изменении температуры, pH или ионной силы реакционной смеси, а также при добавлении в реакционную среду субстрата. Метод, основанный на захвате фермента в гель, отличается простотой и отсутствием значительных воздействий на активный центр фермента. В любом случае, иммобилизация ферментов позволяет на практике осуществлять многократное их использование при проведении каталитических процессов в «ферментных реакторах» периодического или непрерывного действия. Более того, иммобилизация ферментов зачастую приводит к увеличению их стабильности. Согласно данным, приведенным в обзоре Мэлроуза²⁴, из 50 вариантов иммобилизации в 30 случаях стабильность иммобилизованных ферментов была выше стабильности соответствующих растворимых ферментов, в 8 случаях стабильность при иммобилизации уменьшалась и в 12 случаях стабильность при иммобилизации практически не изменилась.

Если учесть, что на стабильность иммобилизованных ферментов в высшей степени влияют природа носителя, характер призывающего агента, а также метод и условия иммобилизации (причем во всех случаях возможно большое число вариантов), то становится ясно, что возможности стабилизации ферментов при иммобилизации еще далеко не исчерпаны. В качестве примера можно привести данные Каплана с сотр.²⁵, согласно которым растворимая лактатдегидрогеназа, теряющая активность на 100% приблизительно через час инкубации, при иммобилизации на пористом стекле с помощью глутарового альдегида полностью сохраняет активность в тех же условиях на протяжении по меньшей мере 35 дней.

IV. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Применение иммобилизованных ферментов, позволяющих проводить массовые химические анализы в отдельных пробах или в потоке (с многократным использованием одного и того же препарата фермента) в значительной степени снимает проблему высокой стоимости ферментативных методов анализа и зачастую повышает точность аналитического метода. Существуют два общих подхода к аналитическому определению концентраций реагентов (субстратов) в исследуемой системе. В одном из них ферментативную реакцию доводят до полного израсходования определяемого вещества (или до установления в системе равновесия между исходными реагентами и продуктами реакции), регистрируя при этом изменение какого-либо подходящего физического или химического свойства системы, и по количеству образовавшегося продукта рассчитывают количество субстрата в исходном образце. Во втором подходе используют кинетические методы анализа, определяя скорость появления продукта или исчезновения субстрата в ферментативной реакции, и вычисляя исходную концентрацию субстрата по соответствующей калибровочной кривой. Этот метод применим также для определения кон-

центрации эффекторов (ингибиторов или активаторов), присутствующих в реакционной системе. Оба данных подхода были реализованы на практике с использованием иммобилизованных ферментов.

Первая работа, в которой было описано применение иммобилизованных ферментов для аналитических целей, была выполнена в 1965 г. Гилболтом с сотр.²⁶. Авторы²⁶ нашли, что холинэстераза, захваченная в крахмальный гель и нанесенная на пенопластовую пластину (для повышения механической прочности иммобилизованного фермента) сохраняет активность в течение 12 часов. Активность фермента в реакции гидролиза бутирилтиохолиниода определяли электрохимически с использованием платиновых электродов, между которыми пропускали постоянный ток. В зависимости от скорости ферментативной реакции потенциал системы изменялся от 150 мв (потенциал окисления продукта реакции — тиохолина) до 350—400 мв (потенциал окисления иодида субстрата до иода), что позволяло изучать влияние добавленных эффекторов на холинэстеразу в непрерывном режиме. В том же году Гилболт и Крамер²⁷ использовали подобным образом иммобилизованную холинэстеразу для обнаружения малых количеств фосфороганических инсектицидов в воздухе. Пенопластовые пластины, импрегнированные крахмальным гелем с иммобилизованной холинэстеразой, были недавно использованы при создании непрерывного анализатора воды для быстрого обнаружения субтоксичных концентраций антихолинэстеразных соединений²⁸.

Общим недостатком всех этих устройств являлась их нестабильность, обусловленная заметным вымыванием фермента из геля крахмала. Соосаждение холинэстеразы с гидроокисью алюминия и суспендирование полученного препарата в крахмальном геле с последующим импрегнированием пенопластовой пластины дали возможность Гудсону и сотр.²⁹ получить устойчивую ферментативную систему, способную функционировать в течение 56 часов без заметной потери фермента. За это время через носитель с иммобилизованной холинэстеразой было пропущено 2700 л воды. По данным авторов²⁹, иммобилизованный фермент дает отклик на наличие в воде 0,2 миллионных долей 2,2-дихлорвинил-диметилfosфата через 3 минуты. Гуткнхт и Гилболт³⁰ также сообщили о разработке ферментной системы непрерывного контроля за наличием цианидных ионов в сточных водах, в основе которой лежит специфическая реакция иммобилизованной инжектазы (β -цианоаланин синтазы).

Хикс и Апдейк³¹ для проведения анализа на глюкозу и молочную кислоту использовали колонки с глюкозооксидазой и лактатдегидрогеназой, иммобилизованными в полиакриламидном геле. Образцы субстратов пропускали через колонки, заполненные стандартными по размеру и лиофильно высушеными частицами гель-фермента, смешивали с индикаторами, меняющими окраску при взаимодействии с соответствующими продуктами ферментативных реакций, и пропускали через кювету спектрофотометра. Авторы³¹ отмечают заметное увеличение стабильности лактатдегидрогеназы при иммобилизации в геле. Так, при 37°С активность растворимой лактатдегидрогеназы падает до 10% от исходной через 2 часа, в то время как активность гель-фермента в тех же условиях совершенно не изменяется в течение 10 часов. Гилболт и Дас³² провели сравнительное изучение крахмального и полиакриламидного гелей в качестве носителей для иммобилизации холинэстеразы и уреазы. Отмечая, что иммобилизацию в гель крахмала можно проводить в более мягких условиях, авторы³² указывают на значительно более высокую стабильность ферментов в полиакриламидном геле.

Хорнби и сотр.³³ разработали метод автоматизированного анализа растворов на содержание глюкозы, иммобилизовав глюкозооксидазу на внутренней поверхности полистирольной трубы (длина 375 см, внутренний диаметр 2 мм). Активность фермента регистрировали при 35°С и pH 5,6 колориметрическим определением перекиси водорода (продукта ферментативной реакции) с иодистым калием. Установка позволяла проводить 40 анализов в час и давала количественное определение глюкозы в интервале концентраций $5 \cdot 10^{-4}$ М — 10^{-2} М. По данным авторов³³, трубка с иммобилизованной глюкозооксидазой не показывала заметной потери катализитической активности в течение полутора месяцев.

В дальнейшем Хорнби и сотр. отказались от полистирольного носителя из-за высокой гидрофобности, и последующие работы этих авторов по иммобилизации ферментов^{34—36} были выполнены с использованием найлона. Так, уреаза, связанная через глутаровый альдегид с внутренней поверхностью частично гидролизованной найлоновой трубы^{34, 35} (внутренний диаметр 1 мм, длина 2 м) использовалась для анализа на мочевину в течение 4 месяцев, и за этот срок было проведено свыше 400 анализов. Уратоксидаза, иммобилизованная на найлоновом порошке, использовалась для анализа водных растворов мочевой кислоты³⁵ в области концентраций 10^{-5} — 10^{-4} М. Однако при частичном гидролизе найлона на поверхности носителя остаются карбоксильные группы, ионизованные при условиях эксперимента, что делает носитель непригодным для иммобилизации ряда ферментов.

Для расширения возможностей предложенного метода Хорнби, Инман и Мак-Доналд³⁶ амидировали карбоксильные группы носителя обработкой его N,N-диметил-1,3-пропандиамином, и использовали полученный носитель для иммобилизации лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы, что позволило проводить анализ водных растворов на содержание пировиноградной кислоты, щавелевоуксусной кислоты и этанола соответственно. Согласно данным³⁶, метод пригоден для количественного определения $4 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М пирувата, $2 \cdot 10^{-5}$ — $1,6 \cdot 10^{-4}$ М оксалоacetата и 0,01—0,1 М этанола. Все иммобилизованные ферменты полностью сохраняли активность в течение 20 дней, и за это время с каждым из них было проведено по меньшей мере 1000 анализов. Растворимые ферменты в тех же условиях теряли активность более чем на 90%.

В недавней работе Вайбеля и сотр.³⁷ на примере анализа растворов на содержание в них глюкозы был разработан общий метод количественного анализа соединений, в ходе ферментативного превращения которых поглощается растворенный в воде кислород. При проведении анализа на глюкозу анализируемый раствор прокачивают с помощью микронасоса через колонку (размером 5×35 мм) с глюкозооксидазой, ковалентно связанной с пористым стеклом, и пропускают через ячейку, в которую помещен кислородный электрод Кларка. Анализ может проводиться либо в кинетическом режиме, либо по установлению глубины реакции после завершения ферментативного процесса. На проведение одного анализа требуется около двух минут, и ошибка в определении концентрации глюкозы не превышает 1—2%. Согласно данным авторов³⁷, колонка функционировала свыше 2 недель при ежедневной работе в течение 8 часов.

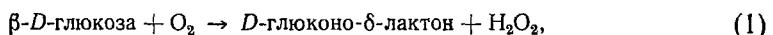
Мосбах и сотр.³⁸ описали применение струевой микрокалориметрии для кинетических методов ферментативного анализа с использованием иммобилизованных ферментов. Преимущества метода заключаются в возможности анализа непрозрачных растворов и в высокой чувствительности (до 10^{-6} М определяемого вещества).

Интересный и многообещающий подход к селективному определению малых количеств металлов был продемонстрирован недавно Стоуном и Тауншендом^{39, 40}. Полифенолоксидаза из грибов была иммобилизована ковалентным связыванием с энзакрилом АА (полученным восстановлением сополимера акриламида, *p*-нитроакриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида), и затем подвергалась диализу вплоть до полного удаления ионов двухвалентной меди, входящих в состав активного центра фермента. Полученный неактивный апофермент воспроизводимо и очень селективно реактивируется при инкубации его со следовыми количествами Cu²⁺ (10—200 нг), причем наблюдаемая скорость ферментативной реакции однозначно связана с концентрацией Cu²⁺ в анализируемом растворе (линейная зависимость скорости реакции от концентрации ионов меди в растворе наблюдается в интервале концентраций 10⁻⁷—2·10⁻⁶ M Cu²⁺). Авторы³⁹ отмечают, что в относительно больших объемах анализируемых растворов с помощью данного метода можно определять 10⁻¹⁵ мг/мл Cu²⁺. Стабильность иммобилизованной полифенолоксидазы позволяет хранить ее в водном растворе при pH 7,0 и 6°C в течение трех месяцев.

Во всех перечисленных выше вариантах применения иммобилизованных ферментов для аналитических целей определение ферментативной активности проводилось реакцией биокатализатора с соответствующими субстратами, или продуктов ферментативного превращения с соответствующими индикаторами, специально вводимыми в исследуемую систему. Однако наибольшее развитие к настоящему времени получили «безреагентные» методы ферментативного анализа, основанные на применении для этой цели так называемых «ферментных электродов», представляющих собой электрохимические датчики, на чувствительный элемент которых нанесен иммобилизованный фермент. Такой электрод обладает основными свойствами, необходимыми для аналитической системы — специфичностью к заданной реакции и определяемому реагенту (если реагент является специфическим субстратом данного фермента), и позволяет проводить быстрый анализ реакционной смеси (скорость анализа, вообще говоря, зависит как от характеристик самой электрохимической системы, так и от значений кинетических параметров ферментативной реакции).

При контакте ферментного электрода с исследуемым раствором, содержащим, в частности, специфический субстрат данного фермента, в приэлектродном слое происходит ферментативная реакция. Если продукт (или субстрат) реакции являются электрохимически активными, то скорость или абсолютная величина изменения электродного потенциала являются мерой количества определяемого реагента в анализируемой смеси. Преимущество данного метода анализа заключается в том, что его можно автоматизировать и проводить непрерывную количественную регистрацию определяемых реагентов, в том числе и в сложных химических или физиологических системах.

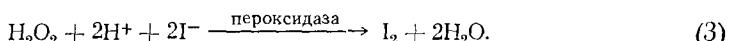
Первый ферментный электрод, сконструированный для непрерывного определения концентрации глюкозы с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы, был описан Апдейком и Хиксом⁴¹ в 1967 году. Эти же авторы ввели и термин «ферментный электрод»^{41, 42}, назвав так систему, состоящую из полярографического кислородного электрода, на поверхность которого был нанесен слой полиакриламидного геля толщиной 25—50 микрон с захваченной в него глюкозооксидазой. При погружении приготовленного таким образом электрода в раствор, содержащий глюкозу, субстрат и кислород диффундируют из раствора в слой гель-фермента. Ферментативная реакция окисления глюкозы



происходящая в непосредственной близости от поверхности электрода, уменьшает диффузионный поток кислорода через пластиковую мембрану кислородного электрода Кларка, что приводит в свою очередь к уменьшению электродного тока. Таким образом, изменение тока в электродной системе зависит от скорости ферментативной реакции и, следовательно, от концентрации глюкозы в анализируемой смеси. Построение соответствующей калибровочной кривой позволило авторам⁴¹⁻⁴³ проводить количественный анализ на глюкозу также в биологических растворах и тканях.

Аналогичный принцип был положен в основу приготовления других ферментных электродов (см. следующую главу), характеристики которых приведены в сводной таблице. Каждый из этих электродов является специфичным либо по отношению к одному определенному соединению (мочевина, *L*-аспарагин, *L*-глутамин, *D*-глюкоза и др.), либо обладает групповой специфичностью (*L*- или *D*-аминокислоты, первичные спирты, различные пенициллины). Естественно, характер селективности ферментативной реакции определяет область применения данного ферментного электрода.

Использование для аналитических целей сопряженных ферментативных реакций открывает принципиально новые возможности для приготовления селективных ферментных электродов. Этот подход продемонстрирован пока только на одном примере — определении *L*-фенилаланина с помощью оксидазы *L*-аминокислот и пероксидазы, иммобилизованных в полиакриламидном геле на поверхности электрода, чувствительного к иодид-ионам⁴⁴. Действие электрода с сопряженной ферментативной системой основано на следующих реакциях:



В ходе ферментативного превращения стационарная концентрация иодид-ионов у поверхности электрода уменьшается, причем скорость уменьшения концентрации I^- зависит от количества *L*-фенилаланина в анализируемом растворе⁴⁴.

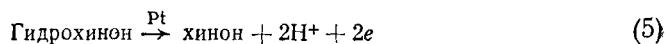
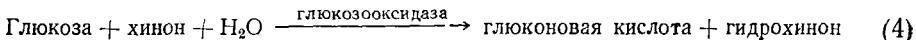
V. УСТРОЙСТВО ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Все ферментные электроды представляют собой электрохимический датчик того или иного типа, на который нанесен слой иммобилизованного фермента. Помимо полярографического кислородного электрода, который был использован для аналитического определения глюкозы с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы⁴¹⁻⁴³, для регистрации этой реакции использован также ферментный электрод на основе платинового диска, покрытого тонким слоем глюкозооксидазы, химически связанный с полиакриламидным гелем^{45, 46}. Электрод погружают в анализируемый раствор, и в системе устанавливают потенциал 0,6 в (по отношению к насыщенному каломельному электроду). Глюкоза диффундирует в приэлектродный слой гель-фермента, где происходит ее превращение по схеме (1). Образовавшаяся перекись водорода окисляется на платиновом электроде, поэтому наблюдаемый ток пропорционален ее концентрации и, следовательно, исходной концентрации глюкозы. Уингард с сотр.⁴⁷, используя иную конструкцию платинового электрода, применили аналогичный метод определения концентрации глюкозы с

помощью иммобилизованной глюкозооксидазы. Полярографические ферментные электроды были также использованы Кларком для аналитического определения глюкозы⁴⁸ и L-аминокислот⁴⁹ с помощью иммобилизованных глюкозооксидазы и оксидазы L-аминокислот.

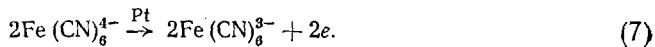
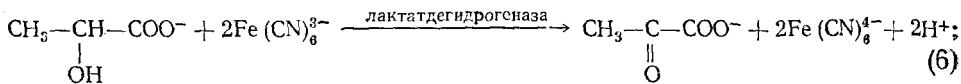
Недавно Кларк¹ разработал метод определения метанола и этанола в водных растворах и парах с помощью полярографического ферментного электрода, содержащего иммобилизованную алкогольоксидоредуктазу. Чувствительность ферментного электрода такова, что он дает заметный отклик на дыхание человека через 16 часов после употребления алкогольных напитков.

Уильямс и сотр.⁵⁰ описали ферментный электрод, в котором глюкозооксидазу, иммобилизованную в геле, наносили на платиновый электрод и покрывали диализной пленкой для предотвращения диффузии фермента в раствор. Глюкоза, находящаяся в анализируемом растворе, диффундирует в слой гель-фермента в количестве, пропорциональном ее объемной концентрации. Отличительной особенностью ферментного электрода в работе⁵⁰ является то, что в качестве окислителя вместо кислорода использовали бензохинон. Как было показано⁵⁰, бензохинон также способен окислять глюкозу под действием глюкозооксидазы, так что схему реакции в приэлектродном слое и на электроде можно записать в следующем виде:



Преимущество данного метода заключается в том, что концентрацию бензохинона в реакционной смеси легко контролировать. Помимо этого, появляется возможность проводить измерения на большем линейном участке концентраций глюкозы по сравнению с методикой, в которой регистрируется изменение содержания кислорода в водном растворе в ходе реакции. Проводя реакцию в буферном растворе (для поддержания pH среды постоянным в ходе реакции) и регистрируя ток в электродной системе, можно количественно определять содержание глюкозы в анализируемой смеси.

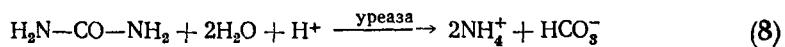
Аналогичный подход был использован авторами⁵⁰ для аналитического определения молочной кислоты с помощью иммобилизованной лактатдегидрогеназы:



Окисление лактата феррицианидом катализирует препарат лактатдегидрогеназы из дрожжей, содержащей в качестве кофактора цитохром B₂.

Принципиально отличными электрохимическими датчиками, на основе которых сконструирована большая часть ферментных электродов, являются ион-селективные электроды. Первый ферментный электрод подобного типа был предложен в 1969 году Гилболтом и Монтальво^{51, 52} для количественного определения мочевины в водных растворах. Он был приготовлен нанесением слоя полиакриламидного геля, содержащего уреазу, на поверхность стеклянного катионного электрода, чувствительного к ионам аммония. При погружении ферментного электрода в раствор, содержащий мочевину, субстрат диффундирует в слой иммобили-

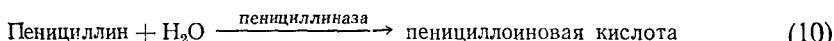
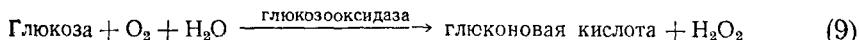
зованного фермента, который катализирует гидролиз мочевины по следующей схеме:



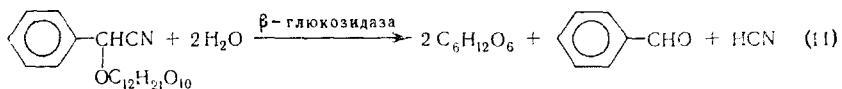
Ионы аммония, являющиеся продуктами реакции гидролиза, регистрируются катионным электродом, так что наблюдаемый потенциал в определенных пределах пропорционален содержанию мочевины в анализируемой пробе.

Этот подход был развит Гилболтом и сотрудниками в дальнейшем для определения L- и D-аминокислот⁵³⁻⁵⁸, аспарагина⁵⁵ и глутамина⁵⁹. Однако авторы^{58, 67, 60} отмечают, что селективность коммерческих катионных электродов не позволяет пока использовать их для анализа биологических жидкостей без предварительного удаления мешающих ионов K⁺ и Na⁺ с помощью ионообменников. В связи с этим модификация ферментных электродов в настоящее время направлена в основном на повышение селективности их электрохимической части (см. следующую главу).

В работах Мосбаха и сотр.⁶¹ и Папариелло с сотр.⁶² ферментные электроды были приготовлены нанесением слоя иммобилизованного фермента на стеклянный pH-электрод, с помощью которого регистрировали концентрацию ионов водорода, образующихся в результате ферментативной реакции. На основе этого метода были разработаны ферментные электроды на глюкозу⁶¹ (схема (9)), мочевину⁶¹ (схема (8)) и различные пенициллины^{61, 62} (схема (10)).



Наконец, в 1971 году Рехниц и Лленадо^{63, 64} описали новый тип ферментного электрода, в котором в качестве электрохимического датчика использована нестеклянная мембрана. Авторы^{63, 64}, разрабатывая аналитический метод определения амигдалина, применили для этой цели твердый электрод, состоящий из кристаллического цианидного датчика, покрытого слоем иммобилизованной в полиакриламидном геле β-глюкозидазы. При ферментативном гидролизе амигдалина (схема (11)) цианидные ионы, образующиеся в приэлектродном слое в качестве продукта реакции, диффундируют через слой геля к поверхности кристаллической мембранны и потенциометрически регистрируются электродной системой.



Как видно из таблицы, в качестве основного метода иммобилизации фермента на электроде был использован захват в гель (в ряде случаев слой гель-фермента дополнительно покрывали целлофановой пленкой для уменьшения диффузии фермента из геля в раствор). Приблизительно третья часть ферментных электродов приготовлена простым захватом фермента между поверхностью электрода и диализной пленкой. Наконец, лишь в трех работах^{45, 46, 58} в качестве метода иммобилизации было выбрано ковалентное связывание фермента с носителем, причем авторы отмечают несколько более высокую стабильность ферментных электродов с химически связанным ферментом по сравнению с электродами на основе гель-ферментов.

ТАБЛИЦА

Характеристики ферментных электродов

| Фермент | Способ иммобилизации | Определяемое вещество | Чувствительность | Время отклика | Стабильность | Условия определения | Ссылки на литературу |
|--------------------------------|--|--|--|------------------|--|---|----------------------|
| Уреаза | захват в гель | мочевина | 10^{-3} — 1 мг/мл | 25—60 сек | — | $[E]_0 = 175 \text{ мг/мл}$ | 51 |
| | захват в гель | мочевина | $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-2} M$ | 40—60 сек | 2 недели | $[E]_0 = 175 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 7,0 \text{ (трис-буфер)}$ | 52, 56, 67 |
| | захват в гель и покрытие целлофановой пленкой | мочевина | $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-2} M$ | — | 3 недели при 25° без заметного падения активности | те же | 52, 56, 57 |
| | захват в гель и покрытие целлофановой пленкой | мочевина | 11 — 81 мг\% | — | — | в сыворотке крови | 56 |
| | захват в гель и покрытие целлофановой пленкой | мочевина | $0,55$ — $3,50 \text{ мг}/100 \text{ мл}$ | — | — | в моче | 56 |
| | захват в гель и покрытие целлофановой пленкой | мочевина | $10^{-5} M$ — $10^{-2} M$ | 60—180 сек | неделя без заметной потери активности | $[E]_0 = 175 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 7,0 \text{ (трис-буфер)}$ | 57 |
| | захват между электродом иodialизной пленкой | мочевина | $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-2} M$ | — | — | $[E]_0 = 100 \text{ мг/мл}, 25^\circ, 0,1 M \text{ NaCl, pH } 7,0 \text{ (трис-буфер)}$ | 61 |
| | захват в гель | мочевина | 10^{-5} — $10^{-3} M$ | 15 мин | более двух недель | $37^\circ, \text{pH } 7,4 \text{ (физиологический солевой раствор)}$ | 61 |
| | захват в гель | <i>L</i> -фенилаланин | 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3} M$ | 60—120 сек | более 1 недели | $[E]_0 = 200 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 7,2$ | 53, 54 |
| | захват между электродом и целлофановой пленкой | <i>L</i> -фенилаланин | — | 30—80 сек | 2 недели | $[E]_0 = 100 \text{ мг/мл}$ | 56 |
| Оксидаза <i>L</i> -аминокислот | захват между электродом и целлофановой пленкой | (<i>L</i> -фенилаланин) | 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3} M$ | 60—120 сек | 2 недели | $[E]_0 = 100 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 7,2$ — $7,5 \text{ (трис-буфер)}$ | 54 |
| | захват в гель | { <i>L</i> -лейцин <i>L</i> -метионин <i>L</i> -аланин <i>L</i> -пролин | 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3} M$ 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3} M$ 10^{-3} — $5 \cdot 10^{-3} M$ 10^{-3} — $5 \cdot 10^{-3} M$ | — — — — | — — — — | — — — — | » » » » |

И. В. Березин, А. А. Клесов

| | | | | | | | |
|--|---|--|--|---------------|---|---|----|
| | химическое связывание с гелем (азосочетание с полимером <i>o</i> -аминоанилида акриловой кислоты) | <i>L</i> -фенилаланин | 10^{-4} — $10^{-2} M$ | 60—180 сек | — | 25° | 58 |
| Оксидаза <i>L</i> -аминокислот-пероксидаза | тот же | <i>L</i> -фенилаланин | $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-3} M$ | меньше 30 сек | уменьшение на 4—5% активности после трех недель | 25° , pH 5,0 $[K_1] = 5 \cdot 10^{-5} M$ | 58 |
| | | <i>L</i> -лейцин <i>L</i> -метионин | $3 \cdot 10^{-4}$ — $10^{-3} M$ $3 \cdot 10^{-3}$ — $10^{-3} M$ (воспроизведимость 2%) | | | | |
| Оксидаза <i>D</i> -аминокислот | захват в гель | <i>D</i> -фенилаланин, <i>D</i> -аланин, <i>D</i> -валин, <i>D</i> -метионин, <i>D</i> -лейцин, <i>D</i> -норлейцин, <i>D</i> -изолейцин | $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-2} M$ | — | 3 недели без заметной потери активности | 25° , pH 8,2 (трикс-буфер) | 55 |
| | захват между электродом и диализной пленкой | — | — | — | значительно менее стабилен по сравнению с предыдущим | — | 55 |
| Пенициллиназа | захват в гель | бензилпенициллин, ампициллин, нафциллин, феноксиметилпенициллин, циклический диклосациллин | 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-2} M$ (воспроизведимость варьировалась от 9 до 17% в течение трех дней для разных электродов) | 15—30 сек | 2 недели (после этого срока время, требуемое для показаний, возрастает в 3—5 раз) | $[E]_0 = 125 \text{ мг/мл}$, pH 6,4, комнатная температура (не контролировалась) | 62 |
| | захват между электродом и диализной пленкой | бензилпенициллин | $5 \cdot 10^{-4}$ — $10^{-2} M$ | 2 мин | 3 недели | $[E]_0 = 50 \text{ мг/мл}$, pH 6,8 (фосфатный буфер), 0,1 м NaCl | 61 |
| Аспарагиназа | захват в гель | <i>L</i> -аспарагин | $5 \cdot 10^{-6}$ — $10^{-2} M$ | — | 28 дней без заметной потери активности | $[E]_0 = 25 \text{ ед/мл}$, 25° , pH 8,0 (трикс-буфер) | 55 |
| | захват между электродом и диализной пленкой | <i>L</i> -аспарагин | — | — | потеря половины активности через 4 дня | также | 55 |

ТАБЛИЦА (продолжение)

| Фермент | Способ иммобилизации | Определяемое вещество | Чувствительность | Время отклика | Стабильность | Условия определения | Ссылки на литературу |
|----------------------|---|-----------------------|---|--|---|---|----------------------|
| Глутаминаза | захват в гель* захват между электродом и диализной пленкой | L-глутамин | 10^{-4} — $10^{-1} M$ | 1—2 мин | 12 часов | $[E]_0 = 150 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 5,5$ (трикс-буфер) | 59 59 |
| | захват в гель | амигдалин | 10^{-5} — $10^{-2} M$ | 15—40 сек | 3 дня | $[E]_0 = 100 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 10,4$ | 64 |
| β -глюкозидаза | захват в гель и покрытие целлофановой пленкой | амигдалин | $5 \cdot 10^{-6}$ — $10^{-3} M$ | 1 мин | криSTALLическая мембрана растворяется после 200 часов непрерывной работы | $[E]_0 = 50 \text{ мг/мл}, 25^\circ, \text{pH } 12,7$ | 63 |
| | захват в гель | глюкоза | $0,15$ — $2,0 \text{ мг/мл}$ | 30—180 сек | изменение активности в пределах $\pm 10\%$ за первые сутки при комнатной температуре | $37^\circ, \text{pH } 3,2$ — $10,3$ $[E]_0 = 1 \text{ мг/мл}$ или $10 \text{ мг/мл}, \text{pH } 7,4$ (фосфатный буфер) | 47 41 |
| Глюкозооксидаза | захват в гель | глюкоза | 10^{-3} — $10^{-1} M$ | — | — | $[E]_0 = 200 \text{ мг/мл}, \text{pH } 6,9$ (фосфатный буфер), $0,1 M \text{ Na}_2\text{SO}_4$ | 61 |
| | захват между электродом и диализной пленкой | глюкоза | $2 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-2} M$ | 3—10 мин | — | $\text{pH } 4$ (фосфатный буфер) или кровь; $[E]_0 = 1 \text{ мг/мл}$ | 50 |
| | захват между электродом и диализной пленкой химическое связывание с гелем | глюкоза | $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-2} M$ | 12 сек (по начальным скоростям) или 1 мин (по установлению стационарного тока) | увеличение активности со скоростью 1,4% в течение 20 дней, затем уменьшение активности со скоростью 0,3—0,7% в день на протяжении 300 дней | $\text{pH } 6,0$ или $6,6$ (фосфатный буфер), 30° | 45, 46 |
| | захват в гель | глюкоза | $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-2} M$ | то же | увеличение активности от нуля до максимальной величины в течение 40 дней, затем уменьшение активности со скоростью 0,3—0,4% в день на протяжении 160 дней | $\text{pH } 6,6$ (фосфатный буфер), 30° | 46 |

| | | | | | |
|--|------------------|--|----------|--|-------------------------------------|
| | глюкоза | — | 1 мин | уменьшение на 1,5% в день при 25° | [E] ₀ =1—10 мг/мл, рН 69 |
| захват в сополимер этиленгликольметакриата и этиленгликольдиметакриата (состоинение 100:1) | глюкоза | 5·10 ⁻⁴ —2·10 ⁻² M | то же | отклика со скоростью 2—3% в день | 7,2 (фосфатный буфер), 46 |
| захват между электродом и цефлофарновой пленкой | молочная кислота | 10 ⁻⁴ —2·10 ⁻³ M | 3—10 мин | — | кровь |
| захват между электродом и диапазонной пленкой | метанол, этанол | 10 ⁻⁹ —2,5·10 ⁻⁸ M | 2 мин | уменьшение активности более чем в 2 раза за 12 часов | 1 |
| Лактатдегидрогеназа | — | — | — | — | 50 |
| Алкогольоксидоредуктаза | — | — | — | — | — |

* Электрод полностью неактивен.

Наиболее простым методом приготовления ферментного электрода является механический захват фермента между чувствительным элементом электрода и пленочной мембраной, задерживающей фермент в приэлектродной поверхности, но проницаемой для молекул субстрата и продукта (обычно для этой цели используют диализную пленку с определенными размерами пор). Как правило, данный способ иммобилизации фермента не приводит к ухудшению характеристик ферментного электрода по сравнению с иммобилизацией фермента в геле на поверхности датчика (см. таблицу). Более того, в работах^{54, 56} отмечается, что при определении L-аминокислот с помощью оксидазы L-аминокислот гель-ферментный электрод был менее стабилен и имел более медленный отклик по сравнению с электродом, покрытым тонким слоем раствора фермента и диализной пленкой. Помимо этого, авторы⁵⁴ указывают, что рибофлавин, добавляемый в раствор акриламида в качестве катализатора полимеризации, является ингибитором оксидазы L-аминокислот, что также приводит к ухудшению характеристик электрода. Наоборот, в случае электродов на основе оксидазы D-аминокислот и аспарагиназы иммобилизация ферментов в полиакриламидном геле значительно увеличивает их стабильность⁵⁵ (см. таблицу). В случае глутаминазного электрода попытки иммобилизации фермента в полиакриламидном геле привели к полной потере активности L-глутаминазы⁵⁹, в то время как электрод, покрытый диализной пленкой с захваченным тонким слоем раствора фермента, показывал нормальный отклик при наличии в анализируемой смеси L-глутамина. Таким образом, имеющиеся в литературе данные пока не позволяют отдать предпочтение *a priori* какому-либо одному методу иммобилизации при приготовлении ферментных электродов.

Практически все гель-ферментные электроды, о которых имеются к

настоящему времени сведения в литературе, приготовлены иммобилизацией ферментов в геле полиакриламида*. Различия заключаются лишь в том, какой метод полимеризации — химический или фотоинициируемый — используется при приготовлении гель-фермента. Преимущества полиакриламидных гелей состоят в том, что образующийся полимер можно легко гранулировать, полимеризация идет быстро, и в зависимости от условий реакции можно получать гели различной пористости²⁴. Подробная методика иммобилизации ферментов в полиакриламидном геле на поверхности электрода приведена в работе Монтальво и Гилболта⁶⁵.

VI. КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОТКЛИК

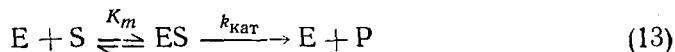
Количественное определение реагентов в анализируемой смеси с помощью ферментных электродов можно в принципе осуществить тремя различными способами: а) проводя ферментативное превращение субстрата до конца и регистрируя общее изменение отклика электрода в результате реакции; б) измеряя скорость изменения отклика электрода в начальный период ферментативной реакции (другими словами, определяя величину, пропорциональную начальной скорости реакции); в) регистрируя изменение отклика электрода от момента начала реакции до установления постоянной величины отклика (вследствие установления стационарной концентрации продукта реакции в приэлектродном слое).

Первый способ, видимо, является самым точным; он не подвержен влиянию эффекторов (ингибиторов или активаторов фермента), которые могут присутствовать в реакционной смеси; текущая инактивация фермента, иммобилизованного на электроде, не влияет на результаты анализа, увеличивая лишь время аналитического определения; наконец, калибровочная кривая для данного метода должна иметь вид прямой, независимо от начальной концентрации определяемого реагента. Однако для сравнительно быстрого проведения анализа в данном случае необходимы электроды с низким диффузионным сопротивлением реакционного слоя по отношению к субстрату и продукту, и с очень высокой концентрацией фермента в приэлектродном слое, что обычно трудно, а зачастую и невозможно получить в реальных условиях. Видимо, этим обстоятельством можно объяснить то, что данный метод ни разу не был использован для аналитического определения реагентов с помощью ферментных электродов.

Основным недостатком второго метода анализа является то, что начальная скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата гиперболически:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (12)$$

Здесь $k_{\text{кат}}$ — катализическая константа, K_m — константа Михаэлиса ферментативной реакции, протекающей по общей схеме



* В работе Ю. Ю. Кулиса и Б. С. Панаво, проводимой в настоящее время в Институте биохимии АН Литовской ССР, разработан ферментный электрод на глюкозу, в котором иммобилизация глюкозооксидазы на поверхности полярографического платинового электрода проводится в полимере этиленгликольметакриловой и этиленгликольди-метакриловой кислот (см. таблицу)⁶⁶.

Уравнение (12), называемое уравнением Михаэлиса — Ментен, свидетельствует о том, что начальная скорость ферментативной реакции является линейной функцией от концентрации субстрата только в области $[S]_0 \ll K_m$.

Гилболт и Лубрано⁴⁶, использовавшие метод «начальных скоростей» для определения концентрации глюкозы с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы, отмечают производительность данного метода (измерение начальных скоростей в условиях опыта⁴⁶ занимало 4—12 сек) и его воспроизводимость (ошибка менее 2%). Преимущество метода «начальных скоростей» отмечается также в работе Гилболта и Нади⁵⁸.

В подавляющем большинстве вариантов анализа, проведенных с использованием ферментных электродов (см. таблицу), был применен метод, основанный на регистрации стационарного электродного отклика системы. Суть этого метода заключается в том, что через определенное время, прошедшее с момента погружения электрода в анализируемый раствор, в приэлектродном слое иммобилизованного фермента достигается стационарная концентрация продуктов ферментативной реакции, которая регистрируется электрохимическим датчиком.

Рассмотрим следующую модель. Имеется плоская мембрана толщиной l , покрывающая чувствительный элемент электрохимического датчика и содержащая иммобилизованный фермент в концентрации $[E]_0$. Датчик с мембраной погружены в раствор субстрата, концентрация которого равна $[S]_0$. Коэффициент распределения субстрата и продукта ферментативной реакции между мембраной и раствором равен δ_s и δ_p соответственно. Требуется найти зависимость между стационарным электродным потенциалом системы и начальными концентрациями субстрата и иммобилизованного фермента (с учетом диффузионных факторов). В соответствии со вторым законом Фика, скорости диффузии субстрата и продукта внутри мембранны в направлении x , перпендикулярном ее поверхности, равны $D_s \frac{d^2 [S]}{dx^2}$ и $-D_p \frac{d^2 [P]}{dx^2}$, где D_s и D_p — коэффициенты диффузии субстрата и продукта соответственно. Скорость ферментативной реакции в мембране определяется уравнением Михаэлиса — Ментен (12). В стационарном (по диффузии) состоянии системы скорости этих двух процессов должны быть одинаковыми:

$$D_s \frac{d^2 [S]}{dx^2} = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad (14)$$

$$-D_p \frac{d^2 [P]}{dx^2} = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad (15)$$

Здесь $[S]$ и $[P]$ — концентрации субстрата и продукта в мембране.

Подробный анализ этой модели проведен в работе Бледеля и сотр.⁶⁶. Авторы показали, что в области низких концентраций субстрата ($[S] \ll K_m$) стационарная концентрация продукта в приэлектродном слое мембранны определяется выражением (16), если до установления стационарного состояния реакция не изменяет концентрационного соотношения в общем объеме раствора:

$$[P] = \frac{\frac{a D_s \delta_p}{t_p} \sinh \alpha l + \frac{D_s}{D_p} \cosh \alpha l - \frac{D_s}{D_p}}{\frac{\cosh \alpha l}{\delta_s} + \frac{a D_s}{t_s} \sinh \alpha l} [S]_0, \quad (16)$$

где t_s и t_p — соответствующие коэффициенты массопередачи, и

$$\alpha = \sqrt{\frac{k_{\text{кат}} [E]_0}{K_m D_s}} \quad (17)$$

В области высоких концентраций субстрата ($[S] \gg K_m$) стационарная концентрация продукта равна

$$[P] = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 l^2}{2D_p} + \frac{\delta_p k_{\text{кат}} [E]_0 l}{t_p}. \quad (18)$$

Таким образом, в области $[S] \ll K_m$ величина стационарной концентрации продукта в приэлектродном слое и, следовательно, величина стационарного отклика ферментного электрода линейно зависит от концентрации субстрата в растворе (см. (16)), в то время как в области $[S] \gg K_m$ стационарная концентрация продукта не зависит от начальной концентрации субстрата (см. (18)). Далее, из выражения (16) видно, что концентрация фермента в мембране оказывает влияние на стационарную концентрацию продукта лишь до определенного предела. При высоких значениях $[E]_0$ стационарный отклик электрода перестает зависеть от концентрации иммобилизованного фермента; в этом случае

предельное значение $[P]$ равно $\frac{\delta_p t_s}{t_p} [S]_0$. Наконец, величина стацио-

нарного отклика электрода зависит также от значений константы Михаэлиса и каталитической константы ферментативной реакции (в свою очередь подверженных влиянию pH, температуры, ионной силы и т. д.), от значений коэффициентов диффузии субстрата и продукта и от толщины реакционного слоя.

Согласно уравнению Нернста, в случае заряженных продуктов ферментативной реакции потенциал электродной системы должен изменяться с изменением активности продукта по логарифмической зависимости. Полагая стационарную концентрацию продукта (16) в условиях эксперимента приблизительно равной его активности, уравнение Нернста можно записать следующим образом

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left\{ \frac{\frac{\alpha D_s \delta_p}{t_p} \sinh \alpha l + \frac{D_s}{D_p} \cosh \alpha l - \frac{D_s}{D_p}}{\frac{\cosh \alpha l}{\delta_s} + \frac{\alpha D_s}{t_s} \sinh \alpha l} [S]_0 \right\}, \quad (19)$$

или в случае однозарядного иона-продукта ($n=1$):

$$E = E^0 + 0,0591 \log [S]_0. \quad (20)$$

Из выражения (20) следует, что в области низких концентраций субстрата можно ожидать изменение потенциала, равное 59,1 мв, при десятикратном изменении начальной концентрации субстрата (при 25° С). Однако для большинства реальных систем отклик электрода не является полностью «нернстовским». В качестве примеров можно привести экспериментальные значения тангенсов угла наклона зависимости E от $\log[S]_0$, равные 0,055 (определение мочевины⁶⁰), 0,050 (определение мочевины⁶¹), 0,048 (определение амигдалина⁶⁴). При определении различных пенициллинов (см. таблицу) угловой коэффициент варьировался от 0,052 в случае ампициллина до 0,038 в случае диклоксациллина⁶²; авторы не нашли объяснения этому факту, но предположили, что различия в отклике ферментных электрородов по отношению к различным

пенициллинам могут быть вызваны различной толщиной слоя геля на поверхности электродов.

При определении глутамина с помощью ферментного электрода⁵⁹ угловой коэффициент зависел от pH, изменяясь от 0,048 (pH 6,0) до 0,040 (pH 5,0), что, по мнению авторов, свидетельствует о влиянии ионов гидроксония на ион-селективный электрод. В работе Гилболта и Монтальво⁶⁷ было найдено, что отклик электрода, на поверхность которого была нанесена иммобилизованная уреаза, по отношению к стандартному раствору хлористого аммония даже превышал отклик обычного стеклянного электрода, чувствительного к ионам аммония. Авторы⁶⁷ объясняют более высокую чувствительность ферментного электрода тем, что в условиях эксперимента (pH 7,0) уреаза является отрицательно заряженной, так что иммобилизованный на электроде фермент действует подобно катионообменнику.

Если в анализируемом растворе присутствуют «мешающие» ионы, которые также оказывают влияние на электродный потенциал⁵⁷, то зависимость потенциала от концентрации субстрата можно записать в следующем виде

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \left\{ \frac{\frac{aD_s \delta_p}{t_p} \sinh \alpha l + \frac{D_s}{D_p} \cosh \alpha l - \frac{D_s}{D_p}}{\frac{\cosh \alpha l}{\delta_s} + \frac{aD_s}{t_s} \sinh \alpha l} [S]_0^{1/n} + \sum_i \eta a_i^{1/z} \right\}, \quad (21)$$

где η — отношение селективности ионов, a_i — активность мешающего иона, z — его заряд. Фактически по такому закону должен меняться потенциал ферментного pH-электрода, если определение ионов водорода, образующихся в результате ферментативной реакции, проводится в буферных растворах.

Мосбах и сотр.⁶¹, изучая действие ферментных pH-электролов в буферных растворах различной концентрации, показали, что определение мочевины с помощью уреазного электрода можно проводить при концентрациях фосфатного буфера, не превышающих $10^{-2} M$. Из уравнения (21) видно, что при уменьшении концентрации субстрата величина электродного потенциала стремится к постоянному значению, равному

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \left(\sum_i \eta a_i^{1/z} \right). \quad (22)$$

К этому же значению стремится величина электродного потенциала при уменьшении концентрации фермента, иммобилизованного на электроде. Таким образом, с помощью соотношений (16) — (22) можно легко объяснить наблюдаемую обычно на опыте S-образную зависимость потенциала ферментного электрода от логарифма концентрации определяемого вещества в растворе.

Значительная часть ферментных электролов, о которых имеются сведения в литературе (см. таблицу), выполнена на основе электролов, чувствительных к ионам аммония⁶⁰. Существенным недостатком этих электролов является их чувствительность практически ко всем одновалентным катионам⁵⁴, которую можно выразить следующим рядом⁵⁹: $\text{Ag}^+ > \text{H}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Низкая селективность катионных электролов по отношению к ионам аммония не позволяла до последнего времени проводить количественный анализ биологических жидкостей на содержание аминокислот и мочевины (с помощью иммобилизованных оксидаз аминокислот, аспарагиназы, глутаминазы и уреазы) без предварительной обработки их с помощью ионообменников⁵⁶⁻⁵⁹. Однако не-

давно Гилболтом и Нади было сообщено о повышении селективности электродов на основе уреазы⁵⁷ и оксидазы *L*-аминокислот⁵⁸ путем добавления в слой гель-фермента антибиотика нонактина. При этом селективность электродов выражалась отношениями $[NH_4^+]/[K^+]=6,5$; $[NH_4^+]/[Na^+]=750$. Монтальво⁶⁸ также сообщил о значительном увеличении селективности катионного стеклянного электрода при нанесении на него тонкой гидрофобной мембранны (силиконо-поликарбонатной пленки), проницаемой для ионов аммония.

Гилболт и Монтальво⁶⁷ подробно изучили факторы, влияющие на отклик уреазного электрода. Практически все найденные эффекты согласуются с уравнениями (16) — (22). Авторы⁶⁷ также показали, что при иммобилизации уреазы в поликариламидный гель на поверхности катион-чувствительного электрода толщина геля и его состав практически не влияют на стационарный отклик ферментного электрода. Так, при уменьшении толщины геля от 350 до 60 микрон стационарный отклик уменьшается лишь на 2%; вариация концентрации геля от 5 до 17,6% при постоянном соотношении концентраций мономера и сивающего агента приводит к изменению отклика менее чем на 2%; наконец, вариация содержания сивающего агента в системе от 5 до 19% при постоянной концентрации геля также приводит лишь к очень малому изменению отклика ферментного электрода⁶⁷.

VII. СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Стабильность ферментных электродов, или их способность сохранять катализическую активность иммобилизованного фермента во времени, варьируется в довольно широких пределах в зависимости от типа фермента и характера его иммобилизации. Основным недостатком иммобилизации фермента в геле является постепенное «вымывание» его в раствор, окружающий ферментный электрод^{52, 57, 64}, что приводит к постепенному уменьшению активности электрода. Как правило, повышения стабильности таких электродов можно добиться, помещая вокруг слоя гель-фермента тонкую целлофановую (диализную) пленку, легко проницаемую для молекул субстрата и продукта, но не для молекул фермента^{52, 56, 67}. Обычно электроды с более высокой концентрацией фермента в приэлектродном слое являются более стабильными^{54, 55}. В случае ферментных электродов, содержащих иммобилизованную оксидазу *D*-аминокислот, стабильность значительно возрастала при хранении их в растворе флавинаденидинуклеотида, являющегося кофактором данного фермента^{55, 60}. При иммобилизации аспарагиназы в поликариламидном геле стабильность соответствующего электрода значительно возрасла по сравнению со стабильностью гомогенного фермента (см. таблицу); наоборот, иммобилизованная в геле оксидаза *L*-аминокислот имела стабильность существенно более низкую по сравнению с растворимым ферментом⁵⁴. Наконец, в работе Гилболта и Шу⁵⁹ иммобилизация глутаминазы в поликариламидном геле привела к полной инактивации фермента. Таким образом, эти и другие данные, имеющиеся к настоящему времени в литературе (см. таблицу), не позволяют *a priori* выбрать способ иммобилизации для приготовления стабильного ферментного электрода.

Наиболее детальное и систематическое исследование стабильности гель-ферментных электродов, приготовленных в различных условиях, было проведено Гилболтом и Монтальво⁶⁷. В числе факторов, оказывавших влияние на стабильность уреазного электрода, были отмечены следующие: а) концентрация мочевины в исследуемом растворе; б) кон-

центрация фермента в геле; в) исходная активность иммобилизованного фермента; г) толщина приэлектродного слоя гель-фермента; д) интенсивность света при проведении фотополимеризации; е) время фотополимеризации при приготовлении гель-фермента; ж) температура гель-фермента в процессе фотополимеризации; з) тип ферментного электрода.

Авторы⁶⁷ нашли оптимальные условия приготовления гель-фермента, при которых стабильность иммобилизованной уреазы была наиболее высокой (3 недели периодической работы без заметной потери активности). Было показано, что стабильность электрода зависит от концентрации мочевины в анализируемом растворе, ухудшаясь при увеличении концентрации субстрата. По данным^{56, 60, 67}, увеличение стабильности ферментного электрода наблюдается при увеличении толщины слоя геля (от 60 до 350 микрон), при увеличении концентрации фермента в реакционном слое и, наконец, при покрывании слоя гель-фермента на электроде тонкой целлофановой пленкой.

В работе Гилболта и Лубрано⁴⁶ приводилось сравнительное изучение стабильности трех типов электродов с иммобилизованной глюкозооксидазой — химически связанный с производными полиакриловой кислоты, захваченной в полиакриламидный гель, и иммобилизованной в тонком слое раствора между поверхностью электрода и целлофановой пленкой. Авторы⁴⁶ отметили, что третий тип электрода не только заметно теряет активность при хранении в буферном растворе, но и уменьшает отклик с каждым последующим определением концентрации глюкозы в растворе. По этой причине электрод данного типа не использовался для аналитического определения глюкозы (см. таблицу). Для ферментных электродов первых двух типов отклик достигает максимальной величины через 20—40 дней работы, и затем уменьшается в течение 200—300 дней (см. таблицу), причем электрод с химически иммобилизованной глюкозооксидазой является более стабильным по сравнению с гель-ферментным электродом. Авторы⁴⁶ полагают, что колоколообразную зависимость отклика электрода от времени можно объяснить наложением двух эффектов — постепенного образования диффузионных каналов в матрице иммобилизованного фермента и одновременной его денатурацией.

VIII. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Для широкого и эффективного применения иммобилизованных ферментов в аналитической химии необходимо решить ряд общих проблем биохимического плана (разработка методов выделения и очистки ферментов, развитие методов определения каталитической активности конкретных ферментов, изучение механизма действия определенных ферментов, выявление факторов, влияющих на ферментативную активность, и т. д.). Помимо этих проблем, не имеющих непосредственного отношения к теме данного обзора, для разработки высокоспецифичных и экономичных ферментных электродов, пригодных для селективного определения широкого круга химических соединений, необходимым представляется решение следующих проблем:

- 1) Увеличение стабильности иммобилизованных ферментов вплоть до возможности функционирования их в течение нескольких месяцев и лет.
- 2) Нахождение универсальных методов иммобилизации, позволяющих проводить иммобилизацию по стандартным методикам, пригодным для всех ферментов (или для определенных групп ферментов).
- 3) Повышение специфичности ион-селективных электродов по отношению к определяемым ионам (например, к ионам аммония), что позво-

лит проводить количественный анализ реагентов с помощью соответствующих ферментных электродов в присутствии посторонних ионов.

4) Повышение чувствительности электрохимических систем по отношению к электрохимически активным соединениям — продуктам соответствующих ферментативных реакций. Это позволит расширить границы чувствительности ферментных методов анализа в сторону малых концентраций реагентов.

Для оценки возможностей ферментных методов анализа и перспектив их развития достаточно привести далеко не полный перечень реагентов, количественное определение которых может представлять интерес для аналитической химии и которые могут быть определены с помощью ферментных электродов. Эти реагенты включают алифатические и ароматические спирты, альдегиды, кислоты, оксикислоты, кетокислоты, дикарбоновые кислоты, аминокислоты, сложные эфиры, амиды и нитрилы карбоновых кислот, первичные, вторичные и третичные амины, диамины, гликоли (в том числе этиленгликоль, 1,2-пропандиол и 2,3-бутандиол), глицерин, ацетоин, ацетоацетат, гидразин, гидроксиламин, этаноламин, тирамин, нитроэтан и другие алифатические нитросоединения, фенолы, *o*- и *p*-дифенолы, ксантины, гипоксантины, холестерол, андростерон и другие 3- α -оксистероиды, тестостерон и другие 3- β - и 17- β -оксистероиды, 20-дигидрокортизон, пенициллины, сахара, тиоловые соединения, дизопропилфторfosfat и другие фосфорорганические соединения, ДДТ, перекись водорода, нитраты, нитриты, сульфиты, сероводород, аммиак, окись азота, пироfosfat, галогениды, цианиды, а также ионы металлов — кальция, бария, цинка, кадмия, меди, марганца, кобальта, никеля.

Следует отметить, что для определения любого из этих реагентов в принципе возможно подобрать подходящую цепь сопряженных ферментативных реакций, в начале которой стоит определяемое вещество, а в конце — электрохимически активный продукт ферментативной реакции. Другими словами, для количественного определения практически любого из перечисленных выше реагентов в принципе можно приготовить соответствующий ферментный электрод.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. C. Clark, Jr., Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 3, 1972, стр. 377.
2. Номенклатура ферментов. Рекомендации Международного биохимического союза. Изд-во ВИНТИИ, М., 1966.
3. H. J. Strecker, J. Harary, J. Biol. Chem., 211, 263 (1954).
4. W. G. Ribonson, Methods in Enzymology, 9, 332 (1966).
5. G. Martinez, H. A. Barker, B. L. Horecker, J. Biol. Chem., 238, 1598 (1963).
6. М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, «Мир», М., 1966, стр. 184.
7. Z. B. Rose, E. Racker, Methods in Enzymology, 9, 357 (1966).
8. C. S. Stachow, I. L. Stevenson, D. Day, J. Biol. Chem., 242, 5294 (1967).
9. W. B. Jakobs, Methods in Enzymology, 5, 765 (1962).
10. И. В. Березин, К. Мартинек, Биохим. химия, 1, 520 (1975).
11. G. Palmer, Biochim. Biophys. Acta, 56, 444 (1962).
12. J. P. Hunt, Metal Ions in Aqueous Solution, Benjamin Inc., N. Y., 1963.
13. G. G. Guilbault, Anal. Chem., 38, 527R (1966).
14. G. G. Guilbault, Там же, 40, 459R (1968).
15. G. G. Guilbault, Там же, 42, 334R (1970).
16. G. G. Guilbault, Enzymatic Methods of Analysis. Pergamon Press, Oxford, London, 1970.
17. G. G. Guilbault, Crit. Rev. Anal. Chem., 1, 377 (1970).
18. Г. Марк, Г. Рехниц, Кинетика в аналитической химии, «Мир», М., 1972.
19. M. M. Fishman, H. F. Schiff, Anal. Chem., 44, 543R (1972).
20. I. H. Silman, E. Katchalski, Ann. Rev. Biochem., 35, 873 (1966).
21. G. J. H. Melrose, Rev. Pure and Appl. Chem., 21, 83 (1971).

22. Иммобилизованные ферменты (под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинека), Изд-во МГУ, М., 1975.
23. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalski, in Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports, p. 1, Acad. Press, N. Y., 1971.
24. В. И. Суровцев, Совр. биол., 77, 177 (1974).
25. J. E. Dixon, F. E. Stolzenbach, J. A. Berenson, N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 905 (1973).
26. E. K. Bauman, L. H. Goodson, G. G. Guilbault, D. N. Kramer, Anal. Chem., 37, 1378 (1965).
27. G. G. Guilbault, D. N. Kramer, Там же, 37, 1675 (1965).
28. L. H. Goodson, W. B. Jakobs, A rapid detection system for organophosphates in water, Proc. Nat. Conf. on Control of Hazardous Material Spills, Houston, TX, March 21—23, 1972.
29. L. H. Goodson, W. B. Jacobs, A. W. Davis, Anal. Biochem., 51, 362 (1973).
30. W. F. Gutknecht, G. G. Guilbault, Environ. Lett., 2, 51 (1971).
31. G. P. Hicks, S. J. Updike, Anal. Chem., 38, 726 (1966).
32. G. G. Guilbault, J. Das, Там же, 38, 341 (1970).
33. W. E. Hornby, H. Fillippuson, A. McDonald, FEBS Letters, 9, 8 (1970).
34. P. V. Sundaram, W. E. Hornby, A. McDonald, Там же, 23, 144 (1972).
35. H. Fillippuson, W. E. Hornby, A. McDonald, Там же, 20, 291 (1972).
36. W. E. Hornby, D. J. Inman, A. McDonald, Там же, 23, 114 (1972).
37. M. K. Weibel, W. Dritschilo, H. J. Bright, A. E. Humphry, Anal. Biochem., 52, 402 (1973).
38. A. Johansson, J. Lundberg, B. Mattiasson, K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta, 304, 217 (1973).
39. J. V. Stone, A. Townshend, Chem. Commun., 1972, 502.
40. J. V. Stone, A. Townshend, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1973, 495.
41. S. J. Updike, G. P. Hicks, Nature, 214, 986 (1967).
42. G. P. Hicks, S. Updike, J. Stuart, Там же, 3542662 (1971); РЖХим., 1971, 13Ф1518.
43. S. J. Updike, G. P. Hicks, Science, 158, 270 (1967).
44. G. G. Guilbault, G. Nagy, Anal. Lett., 6, 301 (1973).
45. G. G. Guilbault, G. J. Lubrano, Anal. Chim. Acta, 60, 254 (1973).
46. G. G. Guilbault, G. J. Lubrano, Там же, 64, 439 (1973).
47. L. B. Wingard, Jr., C. C. Liu, N. L. Nagda, Biotechnol. Bioeng., 13, 629 (1971).
48. L. C. Clark, Jr., Oxygen transport and glucose metabolism. Conf. Dynamics Septic Shock Man (Nov. 13—15, 1968).
49. L. C. Clark, Jr., A polarographic enzyme electrode for the measurement of oxidase substrates. Satellite Conf., 25th Internat. Conf. Physiological Sciences, Dortmund, 1971.
50. D. L. Williams, A. R. Doig, A. Korosi, Anal. Chem., 42, 118 (1970).
51. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, Jr., J. Amer. Chem. Soc., 91 2164 (1969).
52. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, Jr., Anal. Lett., 2, 283 (1969).
53. G. G. Guilbault, E. Hrabankova, Там же, 3, 53 (1970).
54. G. G. Guilbault, E. Hrabankova, Anal. Chem., 42, 1779 (1970).
55. G. G. Guilbault, E. Hrabankova, Anal. Chim. Acta, 56, 285 (1971).
56. G. G. Guilbault, Pure Appl. Chem., 25, 727 (1971).
57. G. G. Guilbault, G. Nagy, Anal. Chem., 45, 417 (1973).
58. G. G. Guilbault, G. Nagy, Anal. Lett., 6, 301 (1973).
59. G. G. Guilbault, F. R. Shu, Anal. Chim. Acta, 56, 333 (1971).
60. G. G. Guilbault, см. ¹, p. 362.
61. H. Nilsson, A.-C. Åkerlund, K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta, 320, 529 (1973).
62. G. J. Papariello, A. K. Nukherji, C. M. Shearer, Anal. Chem., 45, 790 (1973).
63. G. A. Rechnitz, R. A. Llenado, Anal. Chem., 43, 283 (1971).
64. R. A. Llenado, G. A. Rechnitz, Там же, 43, 1457 (1971).
65. J. Montalvo, Jr., G. G. Guilbault, Там же, 41, 1897 (1969).
66. W. J. Blaedel, T. R. Kissel, R. C. Boguslavski, Там же, 44, 2030 (1972).
67. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, J. Am. Chem. Soc., 92, 2533 (1970).
68. J. G. Montalvo, Jr., Anal. Chim. Acta, 65, 189 (1973).
69. Ю. Ю. Кулес, Б. С. Панаев, Тезисы докл. I Всесоюзн. симп. Получение и применение иммобилизованных ферментов, Таллин, 1974, стр. 102.