



## Biosensory optyczne

Ewa Miller<sup>1</sup>

Stanisław Bielecki<sup>2</sup>

Instytut Podstaw Chemii Żywności<sup>1</sup>

Instytut Biochemii Technicznej<sup>2</sup>

Politechnika Łódzka

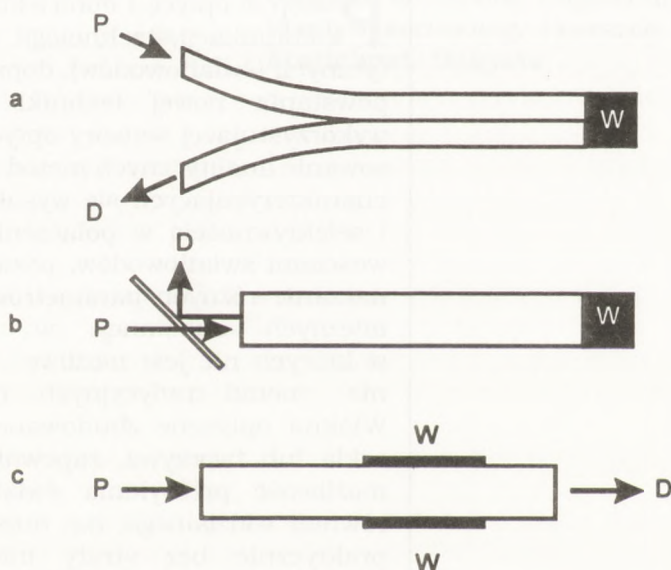
Łódź

### 1. Wstęp

Postęp w optyce i optoelektronice, telekomunikacji, technologii włókien optycznych (światłowodów), doprowadziły do powstania nowej techniki detekcyjnej wykorzystującej sensory optyczne. Zastosowanie analitycznych metod optycznych, charakteryzujących się wysoką czułością i selektywnością w połączeniu z właściwościami światłowodów, pozwoliło na oznaczanie różnych parametrów fizykochemicznych substancji w warunkach, w których nie jest możliwe wykorzystanie metod tradycyjnych, np. *in vivo*. Włókna optyczne zbudowane z kwarcu, szkła lub tworzywa, zapewniają bowiem możliwość przesyłania światła, w tym również widzialnego, na duże odległości, praktycznie bez straty intensywności. Charakteryzują się wysoką elastycznością i są obojętne chemicznie. Przesyłany przez nie sygnał świetlny jest niewrażliwy na zakłócenia elektryczne. Potrzeby i wymagania telekomunikacji spowodowały

rozwój techniki wyciągania samych włókien (o średnicy od kilku do kilkunastu mikrometrów, o wymaganym współczynniku załamania światła), a także nowych sposobów miniaturyzacji źródeł światła monochromatycznego, łączenia włókien, czy konstrukcji nowych układów detekcyjnych, itd. [1]. W sensorze optycznym wiązka światła, mająca za zadanie analizowanie próbki (promieniowanie analizujące), przekazywana jest za pomocą włókna optycznego. Tą samą drogą przesyłane jest promieniowanie analizowane od sensora do detektora. Poprzez analogię do elektrod, sensory optyczne — chemiczne i biochemiczne otrzymały nazwę: optody lub optrody [2].

Budowa chemicznych sensorów optycznych jest zróżnicowana w zależności od rodzaju oznaczanej substancji lub rodzaju jej właściwości fizykochemicznej przyjętej za podstawę pomiaru. W przypadku, gdy substancja jest barwna lub fluoryzująca, istnieje możliwość pomiaru bezpośredniego. Stężenie uranu (VI), który jest silnie fluoryzujący, oznaczano za pomocą włókna optycznego bezpośrednio zanurzonego w próbce [3]. Przy oznaczaniu określonej właściwości fizykochemicznej analizowanej substancji istnieje konieczność dokonania pomiaru pośredniego przez zastosowanie wskaźnika unieruchomionego na powierzchni światłowodu. W tym celu wykorzystuje się tzw. sensory chemiczne zewnętrzne (rys. 1a,b).



Rys.1. Schemat sensora optycznego: a - zewnętrzny optosensor dwuwłoknowy, b - zewnętrzny optosensor jednowłoknowy z układem rozdzielającym sygnały świetlne: próbujący i detekcyjny, c - wewnętrzny optosensor jednowłoknowy z warstwą wskaźnika zastępującą część powłoki włókna. P - sygnał świetlny próbujący, D - sygnał detekcyjny przesyłany do detektora, W - warstwa zawierająca wskaźnik.

Rejestrowane przez układ detekcyjny optody zmiany optyczne wskaźnika, zachodzą pod wpływem oddziaływania z substancją oznaczaną i są miarą jej badanej właściwości fizykochemicznej. W pomiarach za pomocą sensorów optycznych wykorzystuje się tradycyjne metody analizy: spektroskopię absorpcyjną, fluorescencyjną, refraktometrię, jak również interferometrię. Najbardziej znaczącą metodą analityczną, w pomiarach przy użyciu optosensorów, jest spektroskopia fluorescencyjna ze względu na swoją czułość i selektywność [1,4,5].

W pierwszej optodzie opisanej przez J. J. Petersona i S. R. Goldsteina w 1980 r., wykorzystano zjawisko absorpcji [6]. Optoda służyła do oznaczania fizjologicznego pH, w oparciu na zmianach widma absorpcji czerwieni fenolowej, w pomiarach *in vivo*.

Istnieją również optyczne sensory chemiczne, nazywane wewnętrznymi, służące do oznaczania parametrów fizycznych ulegających fluktuacjom, np. ciśnienia, temperatury, pola magnetycznego, itd. (rys. 1c). Reagent czuły na badaną właściwość umieszczony jest zamiast części powłoki włókna optycznego lub rdzenia. Zmienność mierzonego parametru powoduje zmianę właściwości samego włókna na skutek zmiany współczynnika załamania światła jednej z jego części. Na tej zasadzie działają sensory interferometryczne [7,8]. Pierwszy opisany czujnik tego typu służył do pomiaru ciśnienia wodoru [7]. Element czuły stanowiła warstwa palladu naniesiona na powierzchni rdzenia włókna optycznego, zamiast fragmentu jego powłoki. Wyższe ciśnienie cząstkowe wodoru powodowało zwiększoną jego absorpcję w palladzie i związaną z tym odwracalną deformację samego włókna rejestrowaną jako zmianę fazy przesyłanego sygnału świetlnego.

Za pomocą sensorów chemicznych można również oznaczać substancje, które powodują wzrost współczynnika załamania światła powłoki o wartość nie większą, niż współczynnik załamania rdzenia włókna optycznego. Takie rozwiązania występują w chemicznych sensorach optycznych do analizy węglowodorów aromatycznych w próbkach wodnych oraz alkanów w fazie gazowej [9,10]. Za pomocą chemicznych sensorów optycznych można oznaczać stężenie: tlenu, dwutlenku węgla [11], amoniaku [12], siarkowodoru, jonów halogenowych, jonów wielu metali, węglowodorów i ich chlorowcopochodnych [13], a także, takich wielkości jak: siła jonowa i pH roztworów [1], lepkość, zmiany ciśnienia, itd. [14]. Stąd znalazły one zastosowanie w ochronie środowiska do monitorowania gazów odlotowych, do analizowania i kontrolowania ścieków i wód gruntowych [15,16,17], w przemyśle rolno-spożywczym do badania jakości produktów [18,19], w toksykologii [20,21,22,23].

Na bazie chemicznych sensorów optycznych powstała nowa generacja czujników określanymi jako biosensory lub optobiosensory, w których wykorzystuje się reakcje biochemiczne. W tym przypadku na powierzchni włókna optycznego, immobilizowany jest enzym, katalizujący odpowiednią reakcję biochemiczną, często unieruchamiany jest jeszcze indykator. Podobnie, jak w przypadku chemicznych sensorów optycznych, pomiar z użyciem biosensora optycznego może być prowadzony w sposób bezpośredni wtedy, kiedy substraty lub produkty reakcji enzymatycznej są barwne lub czułe optycznie. W innym przypadku oz-

naczenie prowadzi się w sposób pośredni śledząc odpowiednie zmiany, najczęściej fluorescencji wskaźnika, zachodzące w wyniku powstawania lub zanikania oznaczanego reagenta w reakcji katalizowanej przez enzym.

Nowa technika detekcyjna z użyciem sensorów optycznych posiada wiele zalet w stosunku do innych metod badawczych, w tym elektrod enzymatycznych:

1. Metoda jest selektywna ze względu na czułość metod optycznych.

2. Sensor jest małych rozmiarów, średnica włókna może wynosić nawet kilka mikrometrów. Pozwala on oznaczać jednocześnie kilka parametrów, np. stężenia różnych substancji, pH.

3. Brak konieczności stosowania sygnału porównawczego; możliwość polepszenia stabilności pomiaru.

4. Pomiar może być prowadzony w sposób ciągły lub okresowy. Ze względu na właściwości światłowodu można oznaczenie wykonywać zdalnie, *in situ* nawet na odległość 1 km.

5. Istnieje możliwość oznaczania w układach *in vivo*.

Optobiosensory, w porównaniu z optodami chemicznymi, rozszerzyły wachlarz oznaczeń na związki biologicznie czynne, np. glukozę [24,25], fruktozę [26,27], mocznik [28], mleczan, pirogronian [29], bilirubinę, aminokwasy [30]. Stosując biosensor optyczny można oznaczać aktywność enzymów [31], a także śledzić reakcje immunologiczne [32,33]. Biosensory tego typu pozwalają na monitorowanie przemian biochemicznych z możliwością ich zdalnego analizowania.

Optody znalazły również zastosowanie w diagnostyce medycznej do oznaczania *in vivo*: fizjologicznego pH, zawartości tlenu, stężenia elektrolitów, glukozy, temperatury [34]. Reprezentatywnym przykładem jest, jak się wydaje, sensor optyczny o średnicy 1 mm, składający się z trzech czujników, mierzący jednocześnie pH, stężenie tlenu i dwutlenku węgla we krwi pacjenta [35].

## 2. Budowa i zasada działania sensorów optycznych

Głównymi elementami sensora optycznego są: źródło światła, włókno optyczne, wskaźnik oraz system detekcji.

Jako źródła światła używane są obecnie głównie różnego typu lasery, włącznie z barwnikowymi, półprzewodnikowymi, a także diody emitujące światło (LED). Spotyka się też klasyczne źródła promieniowania z układem monochromatyzującym. Włókna optyczne służą do przesyłania światła analizującego i analizowanego oraz stanowią nośnik dla indykatora czy biokatalizatora. Stosowane wskaźniki są czułe na światło i jednocześnie reagują na zmiany stężenia, pH, czy innych parametrów fizykochemicznych substancji oznaczanej. Detektor stanowią fotodiody lub fotopowielacze z pomocniczym systemem optycznym w postaci monochromatorów, zwierciadeł, filtrów, soczewek itd. oraz układy wzmacniające i rejestrujące. W wielu przypadkach emisja światła i obróbka sygnału analizującego jest sterowana przez mikroprocesor. Rozwó

nowoczesnej techniki umożliwia bezpośrednio rejestrowanie i analizę zmian sygnału świetlnego przy zastosowaniu optycznego spektrografu, który jest wytwarzany w postaci miniaturowego modułu bezpośrednio przyłączonego do komputera.

## 2.1. Włókno optyczne

Typowe szklane włókno optyczne zbudowane jest z rdzenia i otaczającej go powłoki (rys. 2). Obydwie te warstwy wykonane są ze szkła o różnym współczynniku załamania światła. Zasada przesyłania światła w światłowodzie opiera się na zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia na granicy faz: rdzeń — powłoka rdzenia. Światło padające przesyłane jest przez światłowód, jeżeli spełniony pozostaje warunek dla półkąta akceptacji:

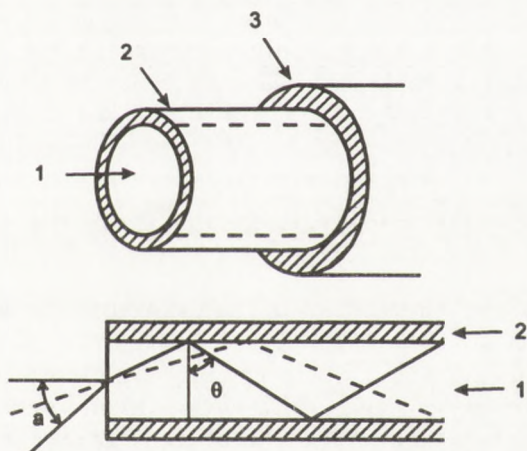
$$\sin a = \frac{\sqrt{n_1^2 - n_2^2}}{n_0} \quad (1)$$

gdzie:  $a$  — półkąąt stożka akceptacji,

$n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$  — współczynniki załamania światła odpowiednio powietrza, rdzenia i powłoki.

W zależności od materiału użytego do budowy rdzenia i powłoki włókna optycznego wyróżniamy światłowody typu: szkło-szkło, kwarc-kwarc, kwarc-tworzywo sztuczne, tworzywo-tworzywo. W przypadku chemicznych i biochemicznych sensorów optycznych stosuje się na ogół włókna tradycyjne, typu szkło-szkło.

W praktyce spotyka się optody jedno- lub dwuwłóknowe (rys. 1a,b). Sen-



Rys. 2. Schemat budowy włókna optycznego: 1 - rdzeń włókna, 2 - powłoka włókna, 3 - osłona włókna,  $a$  - półkąąt stożka akceptacji,  $\theta$  - kąt padania promienia świetlnego na powierzchnię graniczną rdzeń - powłoka.

sory dwuwłóknowe stosuje się w przypadku wykorzystania zjawiska absorpcji. Sygnał świetlny dochodzący do wskaźnika ulega absorpcji i po odbiciu wraca do detektora zachowując tę samą długość fali. Dlatego sygnał próbkujący i analizowany muszą być przesłane oddzielnymi włóknami [36,37].

Układ z jednym włóknem, korzystniejszy z praktycznego punktu widzenia, można stosować wykorzystując zjawisko fluorescencji substancji oznaczanej lub indykatora, w tym wypadku nazywanego fluoroforem. W wyniku pochłaniania kwantu promieniowania, cząsteczki fluoroforu przechodzą ze stanu podstawowego elektronowego w stan wzbudzony. Powrót cząsteczek do stanu podstawowego związany z emisją promieniowania nazywany jest luminescencją. W szczególności powrót ze stanu singletowego, o krótkim czasie życia rzędu:  $10^9$ - $10^7$  s, na dowolny poziom oscylacyjny stanu podstawowego odpowiadający jest za fluorescencję, przy czym długość fali światła emitowanego jest większa, niż pochłanianego. Sygnał próbkujący i analizujący różnią się zatem długością fali i światło może „wędrować” tym samym włóknem, a natężenie światła rozproszonego jest nieistotne. Układ detekcyjny natomiast jest bardziej złożony, wymaga bowiem wprowadzenia do włókna światła wzbudzającego i odbioru sygnału fluorescencyjnego, emitowanego tym samym włóknem oraz skierowania go do detektora [38].

## 2.2. Wskaźnik

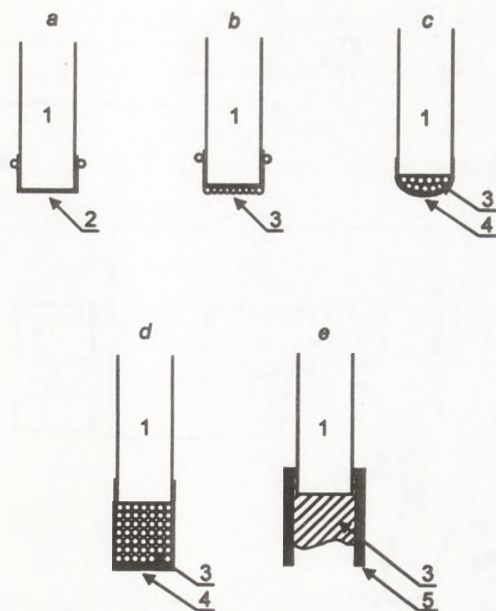
W metodach analitycznych z wykorzystaniem optod, szczególnie biosensorych optycznych rejestruje się najczęściej zmiany absorbancji lub fluorescencji wskaźnika, wywołane przez oznaczaną substancję, czy też parametr fizykochemiczny.

Najbardziej popularnymi wskaźnikami, zmieniającymi intensywność fluorescencji pod wpływem zmian pH, są: fluoresceina [11,39], izotiocyanian fluoresceiny (FITC) [40,41], karboksyfluoresceina [5], kwas 8-hydrokso-1,3,6-pirenotrisulfonowy (HPTS) [42,43], fluoresceinoamina [44,45,46]. Drugą, znaczną grupę fluoroforów stanowią związki, których fluorescencja jest efektywnie gaszona przez tlen. Są to: kwas pirenobutyrowy [47,48], dibutyran perylenu [49], dichlorek tris(2,2-dipirydylo) rutenu (II) [50,51,52].

W przypadku pomiaru zmian absorbancji stosuje się np. nitrazynę, błękit bromotymolowy [5].

Wskaźnik często jest immobilizowany bezpośrednio na włóknie optycznym. W zależności od miejsca unieruchomienia indykatora rozróżnia się, jak już wspomniano, sensory optyczne wewnętrzne i zewnętrzne (rys. 1).

Biosensory optyczne należą do zewnętrznych sensorów optycznych (rys. 1a,b). W tego typu sensorach indykator umieszczony jest na końcu włókna optycznego lub wiązki włókien. Możliwości „mocowania” wskaźnika przy końcu włókna pokazano schematycznie na rys. 3. W najnowszych rozwiązaniach stosuje się metodę immobilizacji wskaźnika, bezpośrednio na powierzchni włókna optycznego z zastosowaniem wiązania kowalencyjnego. W tym



Rys. 3. Sposoby mocowania wskaźnika w zewnętrznym sensorze optycznym wg [1]: a - wskaźnik mocowany bezpośrednio na membranie, b - wskaźnik w postaci granulatu przyklejony do membrany, c - wskaźnik na końcu włókna oddzielony od analizowanego roztworu selektywną membraną, d - wskaźnik w selektywnej membranie rurkowej zakończonej warstwą blokującą dostęp światła do próbki, e - mieszanina wskaźnika i monomeru w rurce kapilarnej do bezpośredniej polimeryzacji na włóknie. Oznaczenia: 1 - końcówka włókna optycznego, 2 - membrana ze wskaźnikiem, 3 - indyktor, 4 - membrana przepuszczalna dla reagentu, 5 - rurka kapilarna.

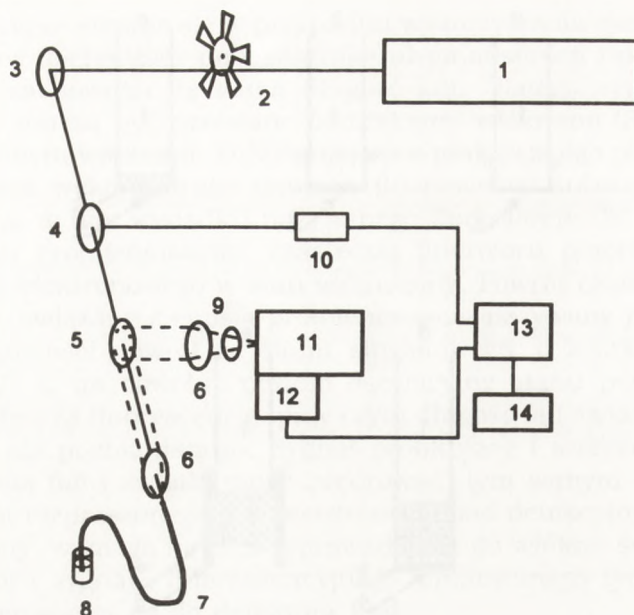
celu wykorzystuje się metody modyfikacji nośnika używane przy konstrukcji elektrod enzymatycznych.

### 3. Biosensory

Zaznaczono już, że nowa generacja biosensorów powstała na bazie chemicznego sensora optycznego. W tym przypadku na powierzchni włókna optycznego immobilizowany jest enzym katalizujący odpowiednią reakcję biochemiczną. Wśród tego typu sensorów wyróżnia się:

1) optobiosensory pośrednie, w których z enzymem koimmobilizowany jest dodatkowo optycznie czuły wskaźnik, przetwarzający na sygnał świetlny zmiany stężenia substancji powstającej lub zanikającej w wyniku reakcji enzymatycznej,

2) optobiosensory bezpośrednie, gdzie na włóknie optycznym unieruchomiony jest jedynie enzym, natomiast zużywany substrat lub powstający w wyniku reakcji enzymatycznej produkt są optycznie czułe. Rejestrowane zmiany optyczne są bezpośrednio miarą stężenia substancji oznaczanej.



Rys. 4. Schemat układu pomiarowego z wykorzystaniem optosensora wg [53]. Oznaczenia: 1 - laser argonowy, 2 - przerywacz wiązki, 3 - zwierciadło, 4 - dzielnik wiązki, 5 - zwierciadło z otworem, 6 - soczewki, 7 - włókno optyczne, 8 - analizowana próbka, 9 - filtr, 10 - fotodioda, 11 - monochromator, 12 - fotopowielacz, 13 - wzmacniacz, 14 - rejestrator.

Schemat układu pomiarowego z zastosowaniem optobiosensorów przedstawiono na rys. 4. W dalszej części artykułu skupiono się głównie na biosensorach optycznych, wykorzystujących zjawisko fluorescencji.

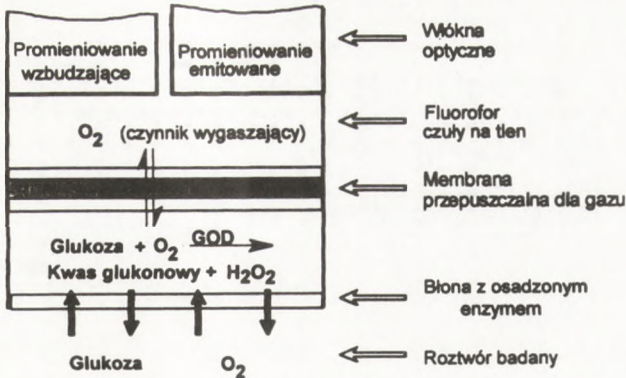
## OPTOBIOSENSORY POŚREDNIE

*Optobiosensory oparte na pomiarze tlenu.* Zasada działania sensorów tego typu oparta jest na detekcji dynamicznego wygaszania fluorescencji wskaźnika, immobilizowanego na włóknie optycznym, przez tlen cząsteczkowy (trypletowy). Membrany do unieruchamiania indykatora muszą charakteryzować się bardzo dobrą przepuszczalnością tlenu [54]. Jako fluorofory stosuje się wcześniej wymienione pochodne pirenu. Intensywność fluorescencji w obecności tlenu opisuje zależność Sterna-Volmera:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K \cdot p_{O_2} \quad (2)$$

gdzie:  $I_0$  — intensywność fluorescencji w nieobecności  $O_2$ ,  $I$  — intensywność fluorescencji w obecności  $O_2$ ,  $K$  — stała tłumienia,  $p_{O_2}$  — ciśnienie cząstkowe tlenu.

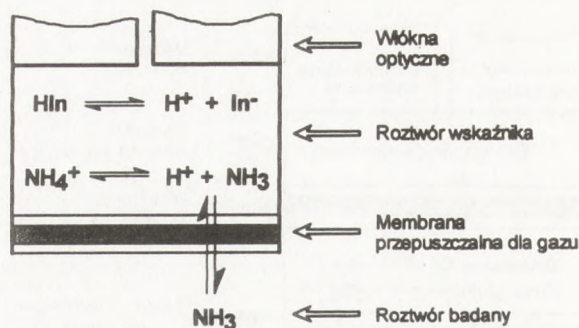




Rys. 5. Schemat działania optobiosensora glukozowego.

Zgodnie z równaniem (2), wzrost ciśnienia cząstkowego tlenu w próbce wiąże się ze zmniejszeniem intensywności fluorescencji (I) wskaźnika. Jest ona miarą ciśnienia cząstkowego tlenu w próbce. Sensory te zostały wykorzystane do konstrukcji biosensorów optycznych, służących do oznaczania związków w reakcjach enzymatycznych, w których jednym z substratów jest tlen. Przykładem jest optobiosensor glukozowy (rys. 5). Glukoza i tlen dyfundują do warstwy sensora, zawierającej oksydazę glukozową (GOD), gdzie glukoza jest utleniana do kwasu glukonowego. Zużycie tlenu, będące miarą stężenia glukozy w roztworze, rejestrowane jest jako wzrost intensywności fluorescencji fluoroforu. Spotyka się różne rozwiązania konstrukcyjne optosensora glukozowego. Lübbers i współ. [24,55] osadzali GOD przez sieciowanie aldehydem glutarowym (AG) w albuminie. Warstwę żelu o grubości 50  $\mu\text{m}$  mocowali na końcu włókna optycznego. Czas odpowiedzi takiego sensora wynosił jedną minutę. Opisaną konstrukcję wykorzystano również do oznaczania mleczanu, ksantyny [56], etanolu [24,55], stosując odpowiednio enzymy: oksydazę mleczanową, ksantynową i alkoholową. Tretnak i Wolfbeis [57] immobilizowali GOD w albuminie w obecności katalazy, która powoduje rozkład nadtlenu wodoru powstałego w wyniku reakcji. Do unieruchamiania enzymu i indykatora na włóknie optycznym zastosowano warstwę hydrożelu — poli(2-hydroksyetylometakrylanu) [58]. W innym glukozowym biosensorze optycznym unieruchamiano enzym przez kowalencyjne wiązanie na porowatej membranie nylonowej. Taki optosensor charakteryzował się zakresami detekcji glukozy 0,1-20 mM i czasem odpowiedzi 1-6 min.

Na zasadzie detekcji zużycia tlenu można również oznaczać etanol. Völkl i współ. [59] osadzali oksydazę alkoholową i kwas pirenobutyrowy w żelu agarowym na powierzchni membrany teflonowej. Wolfbeis i Posch [60] koimmobilizowali z kolei oksydazę alkoholową, katalazę i wskaźnik w przepuszczalnej membranie silikonowej i mocowali na włóknie. Optosensor pozwalał oznaczać etanol w zakresie 10-500 mM, a czas odpowiedzi wynosił 2 min.

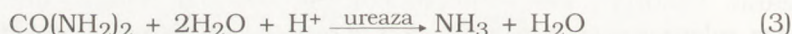


Rys. 6. Schemat działania optobiosensora do oznaczania amoniaku.

Autorzy ci zaproponowali również różne warianty rozwiązań dla biosensora do oznaczania  $\text{H}_2\text{O}_2$  [61].

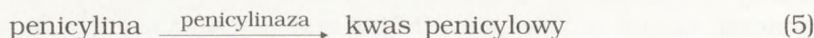
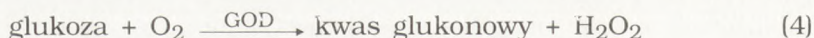
*Optosensory oparte na pomiarze amoniaku.* Oddzielną grupę stanowią bioczujniki optyczne, w których oznaczaną substancją jest amoniak [12,62]. Zasadę działania takiego czujnika optycznego [2] zilustrowano na rys. 6. W warstwie oddzielonej od badanego roztworu membraną teflonową, umieszcza się wskaźnik czuły na zmiany pH oraz chlorek amonu. Cząsteczki amoniaku dyfundują przez selektywną membranę do warstwy roztworu indykatora. Zmiana stężenia gazu powoduje zmianę odczynu roztworu wskaźnikowego, który jest rejestrowany w postaci zmian optycznych: fluorescencji lub absorpcji. W konstrukcji tego biosensora najistotniejszą rolę odgrywa selektywna, przepuszczalna dla amoniaku membrana. W tego typu sensorach gazowych czas odpowiedzi jest dłuższy, rzędu kilku do kilkunastu minut.

Na podobnej zasadzie działa optobiosensor do oznaczania mocznika, bowiem w wyniku reakcji hydrolizy mocznika katalizowanej przez ureazę powstaje amoniak:



W tym celu na włóknie optycznym immobilizowano ureazę w albuminie sieciowanej aldehydem glutarowym. Optobiosensor ten zastosowano do oznaczenia mocznika w próbkach surowicy. Otrzymane rezultaty pozostawały w bardzo dobrej zgodności z danymi uzyskanymi przy stosowaniu metod konwencjonalnych [28].

*Optobiosensory oparte na pomiarze pH.* Na włóknie optycznym immobilizuje się enzym oraz wskaźnik, czuły jednocześnie na zmiany pH, zachodzące w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym. W ten sposób można oznaczać glukozę [25,63], mocznik [63] i penicylinę [39,41,44,63,64,65].



Zgodnie z tymi reakcjami enzymatycznymi następuje obniżenie pH w mieszaninie reakcyjnej, co jest rejestrowane za pomocą zmian optycznych wskaźnika. Spadek pH roztworu powoduje zmniejszenie intensywności fluorescencji wskaźnika i jest miarą stężenia oznaczanej glukozy czy penicyliny.

Pierwszy taki optobiosensor zaproponowali Goldfinch i Lowe [63]. Unieruchamiali oni oddzielnie oksydazę glukozową, ureazę lub penicylinazę ze wskaźnikiem pH na przezroczystej błonie, którą umieszczali między źródłem światła i detektorem — fotodiodą.

Trettnak i współ. [25] w swoim optobiosensorze, do pomiaru glukozy, umiejscowili warstwę hydrożelu z immobilizowaną oksydazą glukozową i HPTS na błonie poliestrowej w układzie dwuwłóknowym. Czas odpowiedzi sensora wynosił 8-12 min. W biosensorze optycznym do oznaczania penicyliny enzym inkludowano w żelu poliakrylamidowym, albo w albuminie sieciowanej — aldehydem glutarowym. Jako wskaźnik stosowano: fluoresceinę lub HPTS. Zakres oznaczanych stężeń penicyliny wynosił: 0,25-10 mM, czas odpowiedzi: 20-60 s. Był on porównywalny z czasem uzyskanym dla pomiaru za pomocą elektrody enzymatycznej [66]. Jeszcze krótszy czas odpowiedzi, od 20 do 45 s, otrzymano konstruując optobiosensor z koimmobilizowaną penicylinazą i fluoresceiną na szkle porowatym, umocowanym na końcu włókna optycznego [39].

Istotnym problemem i ograniczeniem w zastosowaniu tego typu optobiosensorów jest stabilność stosowanego w nich enzymu. Pojemność buforowa roztworu wpływa w dużym stopniu na odpowiedź sensora. Stosowanie dużej pojemności buforowej kompensuje tworzenie lub zużycie kwasu, a zmiany pH nie są rejestrowane. Duże zmiany pH przy niskiej pojemności buforowej, mogą z kolei inaktywować enzym i ograniczać zakres odpowiedzi.

W praktyce stosuje się kompromis między niewielkim sygnałem optobiosensora w szerokim zakresie stężeń z dużą pojemnością buforową a intensywnym sygnałem w wąskim zakresie stężeń, przy niskiej pojemności buforowej. Dodatkowo sensory opisywanego typu czułe są na zmiany siły jonowej i temperatury. Stąd też parametry te powinny być kontrolowane w warunkach zastosowania danego optobiosensora. Spotykane w literaturze typy optycznych biosensorów pośrednich wyszczególniono w tab. 1.

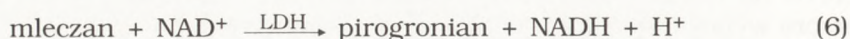
TABELA 1  
OPTOBIOSENSORY POŚREDNIE

Substancja analizowana	Czynnik oznaczany	Enzym
etanol	O <sub>2</sub>	oksydaza alkoholowa
glukoza	O <sub>2</sub>	oksydaza glukozowa
glukoza	pH	oksydaza glukozowa
nadtlenek wodoru	O <sub>2</sub>	katalaza
mleczan	O <sub>2</sub>	oksydaza mleczanowa
penicylina	pH	penicylinaza
mocznik	NH <sub>3</sub>	ureaza
mocznik	pH	ureaza
ksantyna	O <sub>2</sub>	oksydaza ksantynowa

## OPTOBIOSENSORY BEZPOŚREDNIE

Czujniki te rejestrują zmiany: absorpcji, fluorescencji, chemiluminescencji i bioluminescencji, wynikające z powstawania lub zaniku optycznie czułych substratów i produktów reakcji enzymatycznych [67]. Najliczniejszą grupę stanowią biosensory optyczne oparte na pomiarze intensywności fluorescencji zredukowanej formy dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH), która jest miarą substancji oznaczanej (rys. 7).

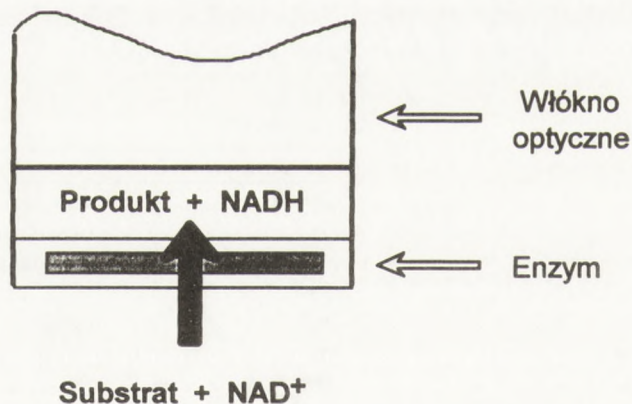
Wangsa i Arnold [29] pierwsi przedstawili optobiosensor do oznaczania mleczańu i pirogronianu:



gdzie:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  — odpowiednio forma utleniona i zredukowana dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego; LDH — dehydrogenaza mleczanowa.

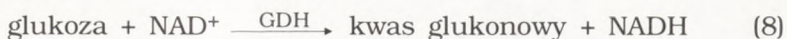
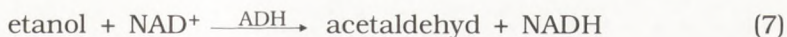
Powstający, w tej reakcji NADH jest rejestrowany przez zmianę sygnału fluorescencji. W przypadku oznaczania pirogronianu wymagana jest niska wartość pH i obecność NADH. Miarą stężenia powstającego pirogronianu jest zmniejszony sygnał fluorescencji. Natomiast w przypadku oznaczania mleczanu obserwowany jest jego wzrost. Czas odpowiedzi wynosi od 5 do 12 min. Opiswany optobiosensor testowano w szpitalu klinicznym Uniwersytetu Iowa do oznaczania mleczanu w próbkach surowicy, uzyskując bardzo dobrą zgodność z wynikami analiz przeprowadzonych z zastosowaniem metod klasycznych [2].

Inny NADH-optobiosensor zaproponowali Kleiner i Harris [68]. Służył on do oznaczania kwasów żółciowych w zakresie stężeń od 2 do 200  $\mu\text{M}$  z wykorzystaniem dehydrogenazy 3-hydroksysterydowej. Użycie w biosensorach



Rys. 7. Schemat działania NADH-optobiosensora.

NAD<sup>+</sup> pozwala oznaczać również etanol [69] i glukozę [70] według następujących schematów reakcji:

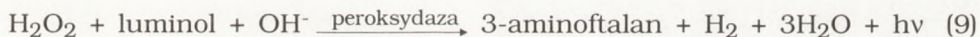


gdzie: ADH, GDH — odpowiednio, dehydrogenaza alkoholowa i glukozowa.

W pierwszym przypadku stosowano selektywną membranę w postaci mikroporowatego teflonu, oddzielającą buforowy roztwór enzymu i NAD<sup>+</sup> od roztworu analizowanego. Miało to szczególne znaczenie w przypadku oznaczania etanolu w surowicy krwi [60]. Zakres mierzonych stężeń etanolu mieścił się w przedziale od 0,9 do 9 mM. W drugim natomiast, w biosensorze optycznym do pomiaru glukozy w zakresie stężeń od 1,1 do 11 mM, enzym immobilizowano kowalencyjnie na siatce nylonowej i mocowano na pojedynczym włóknie optycznym [70].

Stosowanie NADH-biosensorów jest ograniczone koniecznością dodawania NADH/NAD<sup>+</sup> do analizowanego roztworu. W pomiarach *in vivo* jest to utrudnione lub niemożliwe.

Specyficzną grupę stanowią optobiosensory oparte na chemi- i bioluminescencji. W pierwszym przypadku, do oznaczania nadtlenku wodoru wykorzystuje się zjawisko luminescencji w wyniku reakcji katalizowanej przez peroksydazę:



Wzrost stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwiększa natężenie chemiluminescencji, co w konsekwencji powoduje wzrost rejestrowanego sygnału odbieranego przez włókno optyczne. Freeman i Seitz [71] skonstruowali czujnik do oznaczania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w którym peroksydazę immobilizowaną w żelu poliakrylamidowym zamocowali na światłowodzie. Czas odpowiedzi sensora wynosił 4 s, a minimalne oznaczane stężenie nadtlenku wodoru wynosiło 1 μM. Aizawa i współ. [72] unieruchamiali natomiast peroksydazę bezpośrednio na powierzchni fotodiody — detektora.

Koimmobilizacja drugiego enzymu katalizującego powstawanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, np. oksydazy glukozowej rozszerza zakres zastosowania biosensora optycznego z peroksydazą do oznaczania glukozy w zakresie stężeń do 50 mM [73,74,75].

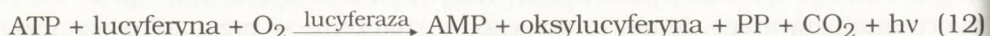
Kolejnym, drugim typem czujników są optobiosensory bazujące na detekcji bioluminescencji.

Bakteryjna lucyferaza utlenia aldehydy do kwasów z wydzieleniem światła w obecności FMNH<sub>2</sub> powstałego w reakcjach katalizowanych przez oksydoreduktazy [10]. Wzrost intensywności rejestrowanego sygnału świetlnego odbieranego przez włókno optyczne związany jest ze wzrostem stężenia NADH [76].



gdzie: FMN i FMNH<sub>2</sub> — odpowiednio, utleniona i zredukowana forma mononukleotydu flavinowego.

Coulet i współ. [77,78] skonstruowali optobiosensor bioluminescencyjny do oznaczania adenylozotryfosforanu (ATP) według schematu reakcji katalizowanej przez lucyferazę świetlika:



gdzie: AMP — adenylozomonofosforan; PP — pirofosforan.

W opisanych biosensorach enzymy immobilizowano na membranach nylonowych przytwierdzonych do końcówek włókien optycznych. Sensory te są bardzo czułe i pozwalają oznaczać bardzo małe stężenia:  $2,8 \times 10^{-10}$ – $1,6 \times 10^{-6}$  M dla ATP,  $1,1 \times 10^{-9}$ – $3 \times 10^{-6}$  M dla NADH i  $1 \times 10^{-7}$  M dla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wskazuje to na przypuszczalne możliwości wykorzystania bio- i chemiluminescencyjnych optobiosensorów do oznaczania śladowych ilości specyficznych substancji biochemicznych.

Spotykane w literaturze typy optycznych biosensorów bezpośrednich zamieszczono w tab. 2.

TABELA 2  
OPTOBIOSENSORY BEZPOŚREDNIE

Substancja analizowana	Czynnik oznaczany	Enzym
ATP	foton	lucyferaza (świetlika)
kwasy żółciowe	NADH	dehydrogenaza 3α-hydroksysterydowa
etanol	NADH	dehydrogenaza alkoholowa
glukoza	NADH	dehydrogenaza glukozowa
glukoza	foton	oksydaza glukozowa/peroksydaza
nadtlenek wodoru	foton	peroksydaza
mleczan	NADH	dehydrogenaza mleczanowa
NADH	foton	lucyferaza (bakteryjna)
fosforan p-nitrofenolu	p-nitrofenol	fosfataza zasadowa
pirogonian	NADH	dehydrogenaza mleczanowa

## 4. Podsumowanie

Włókna optyczne przyczyniły się do rozwoju instrumentalnych metod analizy chemicznej. Połączenie nowoczesnych włókien optycznych i oprzyrządowania optoelektronicznego z chemicznym układem reakcyjnym pozwoliło na zbudowanie sensora optycznego. Zastosowanie dodatkowo enzymów rozszerzyło zakres aplikacji tej metodyki pomiarowej na optyczne biosensory.

Istotną zaletą nowej generacji sensorów jest obok wysokiej czułości i selektywności możliwość prowadzenia pomiarów *in situ*, w specyficznym otoczeniu i warunkach. Z punktu widzenia praktycznych zastosowań, sprawdzonych dotychczas szczególnie w diagnostyce medycznej, bardzo obiecujące jest tworzenie multisensorów oznaczających *in vivo* jednocześnie kilka wielkości, np. pH, stężenie tlenu i dwutlenku węgla [35]. Obecnie prowadzone badania w wielu laboratoriach na świecie dotyczą zarówno nowych możliwości oznaczeń, lepszych rozwiązań konstrukcyjnych optod, wzrostu czułości i selektywności, obniżenia kosztów ich wytwarzania, jak również miniaturyzacji źródeł promieniowania i systemów detekcyjnych.

## Literatura

1. Seitz W. R., (1988), *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 19(2), 135-173.
2. Arnold A. M., Wangsa J., (1991), *Transducer-Based and Intrinsic Biosensors*, in: *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Ed. Wolfbeis O. S., vol. II, 16, CRC Press, London, 193-216.
3. Hirschfeld T., Deaton, Milanovich F., Kleiner S., (1983), EPA Report AD-89-F-2A074.
4. Narayanaswamy R., (1991), *Biosensors and Bioelectronics*, 6, 467-475.
5. Sutherland R., Daehne C., Place J. F., (1984), *Anal. Lett.*, 17, 43-47.
6. Peterson J. J., Goldstein S. R., Fitzgerald R. V., Buckhold D. K., (1980), *Anal. Chem.*, 52, 864-867.
7. Butler M. A., (1984), *Appl. Phys. Lett.*, 45, 1007-1009.
8. Dessy R. E., (1985), *Anal. Chem.*, 57, 1188A-1204A.
9. Kawahara F. K., Fiutem R. A., Silvus H. S., Newman F. M., Frazar J. H., (1983), *Anal. Chim. Acta*, 151, 315-318.
10. Giuliani J. F., Jarvis N. L., (1984), *Sens. Actuators*, 6, 107-110.
11. Munkholm Ch., Walt D. R., (1988), *Talanta*, 35(2), 109-112.
12. Arnold M. A., Ostler T. J., (1986), *Anal. Chem.*, 58, 1137-1140.
13. Jeffries J. B., Raiche G. A., Jusinski L. E., (1992), *Appl. Phys.*, B55, 76-79.
14. André J. C., Goure J. P., (1991), *Spectra* 2000, 160, 39-47.
15. Angel S. M., Langry K., Roe J., Colston Jr. W., Daley P. F., Milanovich F. P., (1990), *Proc. SPIE - Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors II*, 1368, 98-104.
16. Anis N. A., Eldefrawi M. E., Wong R. B., (1993), *J. Agr. and Food Chem.*, 41, 843-846.
17. Trettnak W., Reininger F., Zinterl E., Wolfbeis O. S., (1993), *Sens. Actuators*, B11, 87-91
18. Rogers K. R., (1993), *Immobilized Biomolecules for Detection of Environmental Pollutants*, in: *Uses of Immobilized Biological Compounds*, Eds. Guilbault G. G., Mascini M., Kluwer Academic Publishers, 477-487.
19. Höbel W., Polster J., (1992), *Fres. J. Anal. Chem.*, 343, 101-104.
20. Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T., Anis N. A., Valdes J. J., (1993), *Reusable Fiber*

- Optic Biosensors for Detection of Drugs and Toxicants*, in: *Uses of Immobilized Biological Compounds*, Eds. Guilbault G. G., Mascini M., Kluwer Academic Publishers, 387-395.
21. Dixon-Holland D. E., (1992), in: *Analysis of Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin*, Ed. Agawal V. K., Plenum Press, 57-67.
  22. Ogert R. A., Brown J. E., Singh B. R., Shriver-Lake L. C., Ligler F. S., (1992), *Anal. Biochem.*, 205, 306-309.
  23. Ogert R. A., Shriver-Lake L. C., Ligler F. S., (1993), *SPIE Advances in Fluorescence Sensing Technology*, 11, 1885-1889.
  24. Opitz N., Lübbers D. W., (1988), *Talanta*, 35, 123-127.
  25. Trettnak W., Leiner M. J., Wolfbeis O. S., (1988), *Biosensors*, 4, 5-26.
  26. Lee S.-J., Saleemuddin M., Scheper T., Loos H., Sahm H., (1994), *J. Biotechnol.*, 36, 39-44.
  27. Thordsen O., Lee S. J., Degelau A., Scheper T., Loos H., Rehr B., Sahm H., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 387-393.
  28. Rhines T. D., Arnold M. A., (1989), *Anal. Chim. Acta*, 227, 387-396.
  29. Wangsa J., Arnold M. A., (1988), *Anal. Chem.*, 60, 1080-1082
  30. Lee S. J., Scheper Th., Bückmann A. F., (1994), *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 29-32.
  31. Gautier S. M., Blum L. J., Coulet P. R., (1992), *Anal. Chim. Acta*, 266, 331-338.
  32. Thompson N. L., Axelrod D., (1983), *Biophys. J.*, 43, 103-106.
  33. Wolfbeis O. S., (1993), *J. Mol. Struct.*, 292, 133-136.
  34. Trettnak W., Wolfbeis O. S., (1989), *Anal. Chim. Acta*, 221, 195-198.
  35. Wolfbeis O. S., (1986), *Fres. Z. Anal. Chem.*, 325, 387-392.
  36. Gehrich J. L., Lübbers D. W., Opitz N., Hansmann D. R., Miller W. W., Tusa J. K., Yafuso N., (1986), *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, BME-33, 117-121.
  37. Arnold M. A., (1985), *Anal. Chem.*, 57, 565-566.
  38. Newby K., Reichert W. M., Andrada J. D., Benner R. E., (1984), *Appl. Opt.*, 23, 1812-1815.
  39. Terian T. D., Christian G. D., Ruzicka J., (1988), *Anal. Chem.*, 60, 1250-1256.
  40. Fuh M. S., Burgess L. W., Kirchfeld T., Christian G. D., (1987), *Anal. Chem.*, 112, 1159-1163.
  41. Fuh M. S., Burgess L. W., Cristian G. D., (1988), *Anal. Chem.*, 60, 433-435.
  42. Zhujun Z., Seitz W. R., (1984), *Anal. Chim. Acta*, 160, 47-55.
  43. Offenbacher H., Wolfbeis O. S., Fuerlinger E., (1986), *Sens. Actuators*, 9, 73-84.
  44. Munkholm C., Walt D. R., Milanovich F. P., Klainer S. M., (1986), *Anal. Chem.*, 58, 1427-1430.
  45. Saari L. A., Seitz W. R., (1982), *Anal. Chem.*, 54, 821-823.
  46. Milanovich F. P., Hirschfeld T. B., Wang F. T., Klainer S. M., (1984), *Proc. SPIE — Int. Soc. Opt. Eng.*, 494, 18-22.
  47. Wolfbeis O. S., Offenbacher H., Kroneis H., Marsoner H., (1984), *Mikrochim. Acta*, 1, 153-158.
  48. Peterson J. I., Fitzgerald R. V., (1984), *Anal. Chem.*, 56, 62-67.
  49. Lübbers D. W., Opitz N., (1983), *Sens. Actuators*, 4, 641-654.
  50. Lippisch M. E., Wolfbeis O. S., (1988), *Anal. Chim. Acta*, 205, 1-6.
  51. Bacon J. R., Demas J. N., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 2780-2785.
  52. Wolfbeis O. S., Leiner M. J. P., (1988) *Proc. SPIE*, 906, 42-46.
  53. Kawabata Y., Tsuchida K., Imasaka T., Ishibashi N., (1987), *Analytical Science*, 3, 7-9.
  54. Wolfbeis O. S., (1991), *Oxygen Sensors*, in: *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Ed. Wolfbeis O. S., vol. II, 10, CRC Press, London, 19-25.
  55. Uwira N., Opitz N. Lübbers D. W., (1984), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 169, 913-917.
  56. Völkl K. P., Grossman U., Opitz N., Lübbers D. W., (1981), *Adv. Physiol. Sci. Proc. Ind. Cong.*, 25, 99-103.
  57. Trettnak W., Wolfbeis O. S., (1988), *Analyst*, 113, 1519-1523.



58. Shah R., Margerum S. C., Gold M., (1988), Proc SPIE, 906, 65-68.
59. Völkl K. P., Opitz N., Lübbers D. W., (1980), Fres. Z. Anal. Chem., 301, 162-165.
60. Wolfbeis O. S., Posch H. E., (1980), Fres. Z. Anal. Chem., 301, 78-83.
61. Posch H. E., Wolfbeis O. S., (1989), Mikrochim. Acta, I, 41-44.
62. Rhines T. D., Arnold M. A., (1988), Anal. Chem., 60, 76-81.
63. Goldfinch M. J., Lowe C. R., (1984), Anal. Biochem., 138, 430-434.
64. Xie X., Suleiman A. A., Guilbault G. G., (1992), Biotechn. Bioeng., 39, 1147-1150.
65. Höbel W., Papperger A., Polster J., (1992), Biosensors and Bioelectronics, 7, 549-557.
66. Kulp T. J., Camins L., Angel S. M., Munkholm C., Walt D. R., (1987), Anal. Chem., 59, 2849-2853.
67. Wang A. J., Arnold M. A., (1992), Anal. Chem., 64, 1051-1055.
68. Kleiner S. M., Harris J. M., (1988), Proc. SPIE — Optical Fibers in Medicine III, 906, 65-69.
69. Walters B. S., Nielsen T. J., Arnold M. A., (1988), Talanta, 35, 151-155.
70. Narayanaswamy R., Sevilla F., (1988), Anal. Lett., 21, 1165-1175.
71. Freeman T. M., Seitz W. R., (1978), Anal. Chem., 50(9), 1242-1246.
72. Aizawa M., Yoshihito L., Kuno H., (1984), Anal. Lett., 17, 555-558.
73. Blum L. J., (1993), Enzyme Microb. Technol., 15, 407-411.
74. Huang Y. L., Lee S. Y., Dremel B. A., Bilibevski U., Schmid R. D., (1991), J. Biotechnol., 18, 161-172.
75. Hansen E. H., Norgaard L., Perderson M., (1991), Talanta, 38, 275-282.
76. Arnold M. A., (1988), Proc. SPIE — Optical Fibers in Medicine III, 906, 128-131.
77. Blum L. J., Gautier S. M., Coulet P. R., (1988), Anal. Lett., 21, 717-726.
78. Coulet P. R., Blum L. J., Gautier S. M., (1993), *Luminescence Detection of Biological Reaction*, in: Uses of Immobilized Biological Compounds, Eds. Guilbault G. G., Mascini M., Kluwer Academic Publishers, 345-350.

## Optical biosensors

### Summary.

By combining modern fiber optics and opto-electronic instrumentation with chemical and biochemical reagent system, it is possible to produce optical biosensors also known as optodes. In the literature there are many papers describing selective and sensitive methods for sensing bioanalytes using such devices. The rapid development of this method indicates its importance in analytical chemistry. The present state of art of optodes is briefly reviewed. The representative optical biosensors are described.

### Key words:

biosensor, fiber optics, optode.

### Adres dla korespondencji:

Stanisław Bielecki, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.