Marian Filipiak, Jerzy Krauze, Jacek Anioła

UKŁAD POMIAROWY Z ELEKTRODĄ ENZYMATYCZNĄ DO OZNACZANIA GLUKOZY

Enzymy, ze względu na swoją wysoką specyficzność działania i czułość, od wielu lat są stosowane w analityce do ilościowego oznaczania różnych związków. Ostatnio coraz powszechniej działanie enzymów, głównie unieruchomionych, wykorzystuje się praktycznie także w konstrukcji przyrządów analitycznych. Jednym z przykładów mogą być bioczujniki. W literaturze szeroko opisano zalety tych przyrządów i możliwości ich stosowania [1-6]. Bioczujniki (biosensory) są to urządzenia działające w oparciu o substancje biologicznie czynne w połączeniu z przetwornikami, takimi jak elektroda czy fotodetektor.
W niniejszej pracy przedstawiono analityczny układ pomiarowy, służący do ilościowego oznaczania glukozy w sposób ciągły typu „flow-injection analysis system". Układ ten oparty jest na wykorzystaniu elektrody tlenowej z membraną zawierającą unieruchomioną oksydazę glukozową. Enzym ten katalizuje reakcję utleniania glukozy, w wyniku czego następuje spadek stężenia tlenu w środowisku, który można mierzyć przy pomocy elektrody tlenowej typu Clarke'a. Jeżeli elektrodę tlenową wyposaży się w membranę enzymatyczną zawierającą oksydazę glukozową, pomiar spadku stężenia tlenu może świadczyć o stężeniu glukozy w przepływającym roztworze [4].

1. Część doświadczalna

1.1. Metody

1.1.1. Otrzymywanie membran enzymatycznych

Membrany enzymatyczne otrzymywano przez unieruchamianie oksydazy glukozowej wraz z albuminą na siatce nylonowej przy pomocy aldehydu glutarowego. Na siatkę nylonową o wymiarach 3x1 cm wylewano i równomiernie rozprowadzano 25 μl 5-procentowego roztworu albuminy zawierającego w 1 cm^3 5 mg oksydazy glukozowej (Merck, 109,48 J/cm^3) i 6 μl 50-procentowego aldehydu glutarowego. Po upływie 24 godzin z siatki wycinano membrany o średnicy 8 mm, które zakładano na czoło elektrody tlenowej Radiometer E-5046. Membranę enzymatyczną na elektrodzie pokrywano membraną dializacyjną.

1.1.2. Układ pomiarowy i sposób oznaczania glukozy

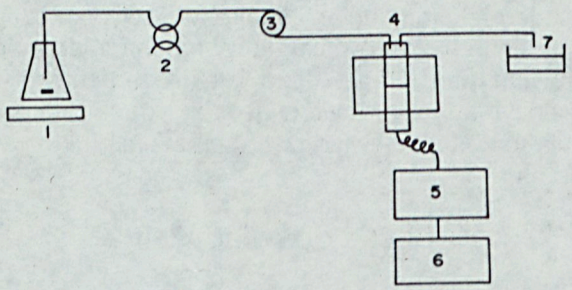
Układ pomiarowy składał się z elementów przedstawionych na rys. 1. Woda ze zbiornika przechodziła przez zawór i pompę perystaltyczną do komory pomiarowej. W jednym z wejść zaworu umieszczono wężyki o różnej długości umożliwiające wprowadzanie prób o objętości 30, 60, 70, 90 i 125 μl. W komorze pomiarowej znajdował się bioczujnik w postaci elektrody tlenowej zaopatrzonej w membranę z oksydazą glukozową. Szybkość przepływu wody przez układ, regulowana przy pomocy pompy perystaltycznej, wynosiła 0,20, 0,46, 0,77, 1,07 i 1,21 cm^3/min.

Pomiary przeprowadzano najczęściej w temperaturze 25°C.

W badaniach wpływu temperatury na wielkość sygnału elektrody w zakresie od 15 do 60°C, przed wykonaniem pomiaru układ inkubowano przez 15 min. w danej temperaturze, po czym przeprowadzano oznaczenie. 15 minutowy czas inkubacji stosowano również w pomiarach glukozy w roztworach w różnych pH. Pomiary przeprowadzano w 0,1M buforach octanowych (pH 4-5), fosforanowych (pH 5,5 - 7,5) i amoniakalnych (pH 8 – 9).

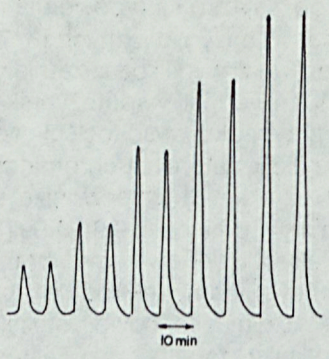
2. Omówienie wyników

Po wprowadzeniu do układu pomiarowego (rys.1.) roztworu glukozy na rejestratorze pojawiał się zapis w formie szczytu, którego wysokość była zależna od stężenia glukozy.

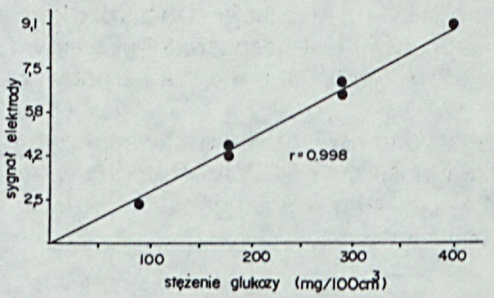


Rys.1. Schemat układu pomiarowego z elektrodą enzymatyczną do ciągłego oznaczania glukozy
1 – zbiornik z wodą, 2 – zawór, 3 – pompa perystaltyczna, 4 – komora pomiarowa, 5 – tlenomierz, 6 – rejestrator, 7 – zbiornik do zlewek.

Na rysunku 2. przedstawiono przykładowy zapis rejestratora, otrzymany przy oznaczaniu glukozy w stężeniach od 25 do 400 mg/100cm^3. Dająca się zauważyć niewielka, ale powtarzająca się niesymetryczność szczytów jest typowa w pomiarach typu „flow injection analysis" [5]. Na podstawie wysokości szczytów wykreślano krzywą kalibracyjną, wyznaczającą zależność między stężeniem glukozy a sygnałem elektrody. Rysunek 3. przedstawia



Rys.2. Zapis rejestratora przy oznaczaniu glukozy w układzie pomiarowym z bioczujnikiem. Objętość próby – 70 μl, szybkość przepływu – 0,46 cm^3/min., stężenia badanych roztworów glukozy – 25, 50. 100. 200 i 400 mg/100cm^3.



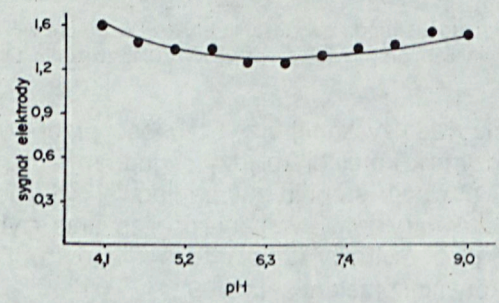
Rys.3. Zależność sygnału elektrody od stężenia glukozy w próbie wyznaczona w układzie pomiarowym z bioczujnikiem przy szybkości przepływu 0,46 cm^3/min. Objętość próby – 70μl

przykład takiej krzywej uzyskanej przy szybkości przepływu 0,46 cm^3/min. Zarówno współczynnik korelacji między sygnałem elektrody a stężeniem glukozy, jak i w pewnym stopniu zakres linowej zależności między tymi parametrami wykazywały pewne wahania przy zmianie szybkości przepływu cieczy przez układ pomiarowy (tabela 1.). W każdym przypadku wartość współczynnika korelacji przekraczała 0,99.

Tabela 1. Wpływ szybkości przepływu na zakres zależności liniowej między sygnałem elektrody a stężeniem glukozy oraz wartości współczynników korelacji i zmienności

Szybkość przepływu (cm^3/min.)	Zakres liniowej zależności sygnału od stężenia glukozy (mg/100 cm^3)	Współczynniki	
		korelacji	zmienności (%)
0,20	25 — 400	0,9917	—
0,46	25 — 400	0,9986	3,79
0,77	25 — 400	0,9993	3,81
1,07	25 — 400	0,9992	4,24
1,21	25 — 1000	0,9947	—

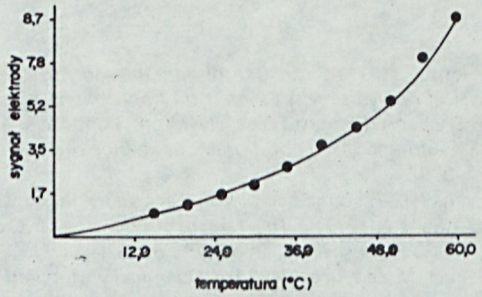
Wysokie wartości współczynników korelacji między sygnałem bioczujnika a stężeniem oznaczanego związku są typowe dla pomiarów elektrochemicznych z udziałem sensorów enzymatycznych [6, 7, 8].
Bradley i współpr. [8] porównali wyniki oznaczania cukrów w melasie różnymi metodami. Podają oni, że wartość współczynnika korelacji obrazującego dokładność metody w przypadku wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej wynosiła jedynie 0,82, natomiast chromatografii gazowo-cieczowej oraz przy pomocy bioczujnika YSI i bioczujnika skonstruowanego przez autorów – kształtowała się w granicach 0,98-0,99 [8]. Podobnie w systemie analizy ciągłej (FIA) z elektrodą tlenową i membraną enzymatyczną współczynnik korelacji między sygnałem elektrody a stężeniem glukozy osiągał wartość 0,9997, przy czym końcowe stężenie glukozy wynosiło 360mg/100cm^3 [9]. Jak wynika z tabeli 1., przy zastosowaniu naszego układu pomiarowego zależność między sygnałem elektrody a stężeniem glukozy miała charakter liniowy w zakresie do 400 mg/100 cm^3, a nawet przy najwyższej użytej szybkości przepływu rozszerzała się do 1000 mg/100 cm^3. Z punktu widzenia analityki medycznej jest to bardzo korzystny zakres stężeń glukozy, ponieważ możliwy jest bezpośredni pomiar w krwi pacjentów zarówno zdrowych (do 100 mg/100 cm^3), jak i z podwyższonym poziomem cukru.
W tabeli 1. zamieszczono również wartości współczynnika zmienności będącego miarą dokładności metody. Wartości tego współczynnika wahały się od 3,79 do 4,24%, co stanowi dokładność całkowicie wystarczającą dla celów np. diagnostyki medycznej.



Rys.4. Wpływ pH oznaczanej próby na wielkość sygnału elektrody enzymatycznej

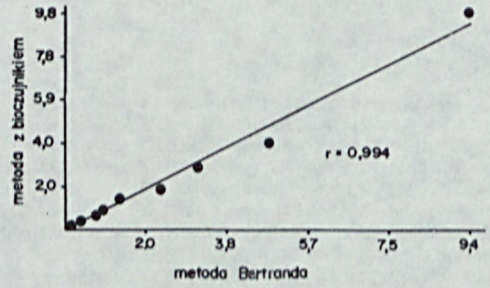
Oksydaza glukozowa w formie natywnej odznacza się trwałością w dość szerokim zakresie pH, chociaż enzym z Aspergillus niger wykazuje optimum aktywności przy pH 5,6 [10]. Na rysunku 4. przedstawiono zależność między wielkością sygnału elektrody z membraną enzymatyczną a pH próby, które kształtowało się od 4 - 9. Sygnał elektrody enzymatycznej jedynie w minimalnym stopniu zmieniał się w całym badanym zakresie pH. Pewien wpływ na wielkość sygnału elektrody wywierała temperatura roztworu, w jakiej przeprowadzano pomiar glukozy. Przy wzroście temperatury od 15 do 60°C sygnał wzrastał średnio o 5,6% w przeliczeniu na 1°C, chociaż początkowo wzrost był nieco wolniejszy (rys. 5.). W zakresie 15-25°C zależność między

wielkością sygnału elektrody a temperaturą była zbliżona do liniowej i można było ją określić równaniem $y = 3{,}42 \cdot t + 21{,}9$. Znaczy to, że wzrost temperatury o $1^{\circ}C$ powodował podwyższenie sygnału o około 4%.



Rys.5. Wpływ temperatury na wielkosc sygnału elektrody enzymatycznej

Układ pomiarowy z bioczujnikiem w postaci elektrody tlenowej i membrany albuminowej z oksydazą glukozową wykorzystano do oznaczania glukozy w 23 roztworach wodnych, a wyniki porównano z wielkościami naważek glukozy w przygotowanych roztworach, jak i rezultatami otrzymanymi metodą miareczkową Bertranda (rys. 6.). Stwierdzono wysoki stopień korelacji między wynikami uzyskanymi przy użyciu opracowanego bioczujnika a wielkościami naważek glukozy w próbach ($r = 0{,}9954$) i wynikami metody miareczkowej Bertranda ($r = 0{,}9945$). Na tej podstawie można sugerować, że przedstawiony układ pomiarowy mógłby być wykorzystany do oznaczania glukozy w płynach biologicznych i produktach spożywczych. Powszechnie w Polsce stosowana o-toluidynowa metoda oznaczania glukozy w moczu i krwi jest niespecyficzna, a także posiada szereg niedogodności, takich jak np. konieczność stosowania toksycznych i agresywnych odczynników (o-toluidyna, kwas octowy). Opisany powyżej układ pomiarowy stanowić może podstawę dla konstrukcji przyrządu analitycznego do oznaczania glukozy. Pomiar dokonywany przy pomocy takiego przyrządu byłby specyficzny, szybki i prosty, a także nie wymagałby używania jakichkolwiek odczynników. Poza tym, przy zastosowaniu do konstrukcji przyrządu odpowiednich podzespołów elektronicznych, istnieje możliwość pełnego zautomatyzowania pomiaru.



Rys. 6. Zależność między wynikami oznaczania glukozy otrzymanymi przy udziale układu pomiarowego z bioczujnikiem a rezultatami uzyskanymi metodą Bertanda

Literatura

1. J.Campbell, W.E.Hornby (1977) : *The Use of Immobilized Enzymes in Automated and Semiautomated Systems of Analysis.* [w:] *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins.* Red. T.M.S.Chang. Plenum Press, New York, London, s. 3.
2. G.G.Guilbault, J.M.Kaufmann (1987) : *Enzyme-based Electrode as Analytical Tools.* Biotechnol. Appl. Biochem. **9**, 95.
3. W.H.Mullen, G.P.Evans (1987) : *Biosensors in the Laboratory.* International Labmate **13**, 15.
4. L.C.Thomas, G.D.Christian (1977) : *The Use of Amperometric Oxygen Electrodes for Measurements of Enzyme Reactions.* Anal. Chim. Acta **89**, 83.
5. H.J.Wieck, G.H.Heider, M.Yacynych (1984) : *Chemically Modified Reticulated Vitreous Carbon Electrode With Immobilized Enzyme as a Detector.* Anal. Chim. Acta **158**, 137.
6. G.G.Guilbault (1988) : *Enzyme Electrode Probes.* Methods Enzymology **137**, 14.
7. W.Matuszewski, M.Trojanowicz (1988) : *Graphite-paste Enzymatic Glucose Electrode for Flow Injection Analysis.* Analyst **113**, 735.
8. Rapid Determination of the Glucose Content of Molasses Using a Biosensor. Praca zbior. Analyst **114**, 375.
9. M.Mascini, G.Paleschi (1983) : *A Flow-Through Detector for Simultaneous Determinations of Glucose and Urea in Serum Samples.* Anal. Chim. Acta **145**, 213.
10. J.R.Whitaker (1972) : *Principles of Enzymology for Food Sciences.* Marcell Dekker, Inc., New York s. 454.

Maria Filipiak, Jerzy Krauze, Jacek Anioła

UKŁAD POMIAROWY Z ELEKTRODĄ ENZYMATYCZNĄ DO OZNACZANIA GLUKOZY

SUMMARY

An analytical system was designed for the determination of glucose based on the use of a biosensor consisting of an oxygen electrode and a membrane in the form of a nylon net with a glucose oxidase immobilized on albium. The dependance between the concentration of glucose and the signal of the biosensor was found to be linear in character for the glucose concentrations up to 1000 mg/100 cm^3 and the correlation coefficient between these parameters was above 0.99. The measurement was evidenced to be very little affected by pH within the range 4-9 and significantly by temperature. A 1°C rise in temperature within the range 15-60°C gave an average increase of the signal amounting to 5.6%. The results of the determination of glucose obtained by means of this system were highly correlated with those obtained by the titrimetric method of Bertrand (r = 0.9945).

РЕЗЮМЕ

Создана измерительная система для определения глюкозы — с применением биодатчика, состоящего из кислородного електрода и мембраны в виде нейлоновой сетки с иммобилизованной в альбумине глюкозооксидазой. Определенная с помощью системы зависимость между концентрацией глюкозы и сигналом биодатчика имела линейный характер до концентрации 1000 мг/100 $см^3$, коэффициент соотношения же между этими параметрами составил больше 0,99. На измерение глюкозы минимальное влияние оказывало pH исследуемой пробы в интервале 4 — 9, температура же имела на результаты существенное влияние. Повышение температуры на 1°C в интервале от 15 до 60°C вызывало усиление сигнала биодатчика в среднем на 5,6%. Результаты определения глюкозы с помощью измерительной системы в высокой степени соответствовали результатам, полученным методом титрования по Бертранду (r = 0,9945).

BIBLIOTEKA AE w Poznaniu