

УДК 612.122

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ЙОДИДНОГО ЭЛЕКТРОДА

© 2013 г. Е. Каракус*, Ш. Пекиардимчи**, Е. Килич**

*Технический университет Илдыза, 34240, Эсенлер, Стамбул, Турция,

** Университет Анкары, 06210, Анкара, Турция

e-mail: karakus@yildiz.edu.tr

Поступила в редакцию 1.02.2012 г.

Разработан потенциометрический биосенсор для определения глюкозы путем иммобилизации глюкозооксидазы на йодид-селективном электроде. Пероксид водорода, образующийся при окислении глюкозы глюкозооксидазой, окислялся в присутствии молибдата натрия и дихлорметана на йодид-селективном электроде. Концентрация глюкозы рассчитывалась по уменьшению концентрации йодида, определяемого йодид-селективным биосенсором. Чувствительность глюкозного биосенсора к ионам йодида и глюкозы была в пределах концентраций 1.0×10^{-1} – 1.0×10^{-6} М и 1.0×10^{-2} – 1.0×10^{-4} М соответственно. Разработанные глюкозные биосенсоры использовались для определения глюкозы в образцах сыворотки крови человека и показали результаты, совпадающие с клиническими определениями.

DOI: 10.7868/S0555109913020062

Сахарный диабет является глобальной проблемой, поскольку от него страдает значительный процент населения. Его основной диагностический признак – хронически повышенный уровень глюкозы. Постоянный контроль глюкозы в крови может замедлить возникающие впоследствии осложнения, такие, как микроангиопатии, паталогические изменения почек или нервной системы, которые сопутствуют диабету [1]. Точное, быстрое и доступное по стоимости измерение концентрации глюкозы имеет большое значение для промышленного и медицинского применения [2–4].

Многочисленные процессы и методики разработаны для создания новых глюкозных биосенсоров, основанных на электрохимических [5], колориметрических [6], кондуктометрических [7], оптических методах [8], а также методах флуоресцентной спектроскопии [9]. Среди них наибольший интерес вызывают электрохимические глюкозные биосенсоры, лидирующие в этой области в течение последних 40 лет благодаря их непревзойденной чувствительности и селективности. Кроме того, электрохимические методы имеют низкий предел обнаружения, быстрый отклик, стабильны в течение длительного времени и недороги. Такие глюкозные сенсоры подразделяются на 4 основные группы, в зависимости от используемых принципов измерения: потенциометрические, амперометрические, кондуктометрические и импедансные.

Ферменты являются важными компонентами таких датчиков, так как они используются для распознавания целевых молекул с высокой точностью в сложной системе. Интерес к использованию ферментных электродов постоянно растет. По этой причине исследователи пытаются использовать ферменты с улучшенными свойствами, повышенной операционной стабильностью, стабильные при хранении за счет использования различных методов иммобилизации. В последнее время такой фермент, как глюкозооксидаза, стал широко использоваться при определении концентраций глюкозы [10–14]. Такие электроды обычно состоят из сенсорного электрода, который регистрирует изменения концентрации реагентов или продуктов реакции, катализируемых выбранным ферментом, иммобилизованным на поверхности сенсора [15]. Таким образом, были разработаны многочисленные датчики для быстрого мониторинга уровня глюкозы в физиологических жидкостях, для использования *in vivo* или *in vitro* [15–24].

Ферментативное окисление различных биологических субстратов может сопровождаться образованием пероксида водорода, в частности, окисление глюкозы, катализируемое глюкозооксидазой, также сопровождается образованием этого соединения. Действие классических глюкозных биосенсоров основано на мониторинге потребления кислорода или образования пероксида водорода. К сожалению, амперометрическое определение пероксида водорода проводится при вы-

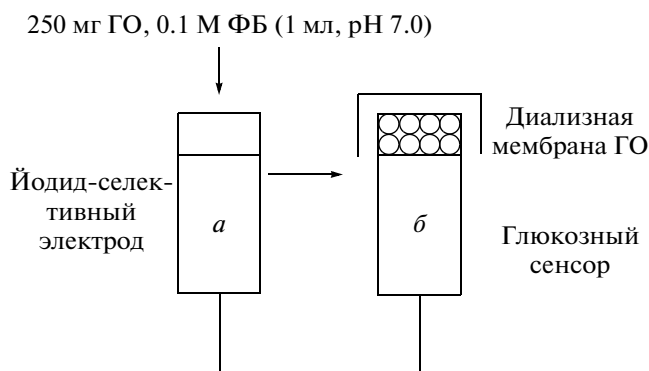
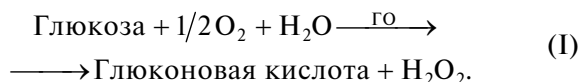


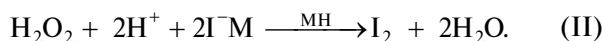
Рис. 1. Схема изготовления глюкозного биосенсора. *a* — йодид-селективный датчик, *b* — глюкозный биосенсор, основанный на ГО и йодид-селективном электроде.

соком анодном потенциале [20]. В потенциометрических глюкозных биосенсорах, описанных в литературе, используются различные методы компоновки электродов [25, 26]. Совместная иммобилизация глюкозооксидазы и пероксидазы на электроде позволяет проводить потенциометрическое определение глюкозы на основе биоэлектрокаталитической детекции пероксида водорода, который образуется в результате каталитического окисления глюкозы.

Цель работы — разработка нового потенциометрического сенсора для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы (ГО) и молибдата натрия, иммобилизованных на йодид-ион-селективном электроде. На первой стадии глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы:



На второй стадии образовавшийся пероксид водорода и йодид-ионы реагируют с молибдатом натрия (МН), в результате реакции образуются йод и вода:



Уменьшение концентрации йодида пропорционально концентрации глюкозы. Были исследованы условия для оптимальной работы ГО биосенсора на основе йодидного электрода: время жизни, время отклика, оптимум pH, оптимальная температура, оптимальный рабочий диапазон концентрации и влияние посторонних факторов. Кроме того, было проведено исследование возможности использования разработанного глюкозного биосенсора для определения уровня глюкозы в образцах сыворотки крови человека.

МЕТОДИКА

Реагенты и аппаратура. В работе использовали глюкозооксидазу (ГО, ЕС 1.1.3.4) типа VII из *Aspergillus niger*, молибдат натрия, глюкозу, йодид натрия, мочевую кислоту, аскорбиновую кислоту, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaF, NaBr, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ фирмы “Sigma” (США). Все остальные химические вещества, используемые в работе, были аналитической чистоты. Стандартные и буферные растворы готовили на дистиллированной воде. Образцы сыворотки крови были предоставлены биохимической лабораторией больницы Ибн-Сина Университета Анкары (Турция).

Потенциометрические измерения и измерения pH проводились pH-метром ORION 720A (“Aelec”, США). Йодид-электрод (ORION 940011) был использован для определения уменьшения количества ионов йодида в результате окисления. Значения потенциалов даны по отношению к Ag/AgCl электроду (ORION 90-02). Измерения проводились в 25 мл стеклянной ячейке. В ходе всех экспериментов использовали магнитную мешалку. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Приготовление глюкозных биосенсоров. 250 мг ГО (50 тыс. ед.) растворяли в 1 мл 0.1 М фосфатного буфера (ФБ), pH 7.0. 100 мкл этого раствора наносили на йодистый электрод и оставляли на ночь. Поверхность электрода покрывали диализной мембраной. Приготовленный глюкозооксидазный биосенсор помещали в 0.01 М NaI на 2 ч (рис. 1).

Чувствительность ГО-биосенсора, приготовленного указанным способом, определяли, измеряя потенциал калибровочных растворов NaI в пределах 10^{-1} – 10^{-6} М, pH 7.0. Чтобы оценить чувствительность глюкозного биосенсора в отношении глюкозы, измерения проводили в калибровочных растворах глюкозы в 0.1 М ФБ, pH 7.0, содержащих 10 мл дихлорметана, 5.0 мл 5%-ного молибдата натрия и 2.5 мл 0.01 М йодида натрия.

Измерение ответа биосенсора. Измерение потенциала для глюкозного биосенсора проводили в стационарных условиях в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, и Ag/AgCl-электродом в качестве электрода сравнения. Биосенсор погружали на глубину 1.5 см, раствор перемешивали магнитной мешалкой. Значение pH определяли с помощью комбинированного стеклянного pH-электрода Orion. Все экспериментальные работы проводились при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Калибровочные кривые получали путем построения графика на основании измеренных потенциалов серии стандартных растворов глюкозы относительно логарифма концентрации глюкозы.

Определения глюкозы в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови человека были отобраны у больных сахарным диабетом. Уровень глюкозы

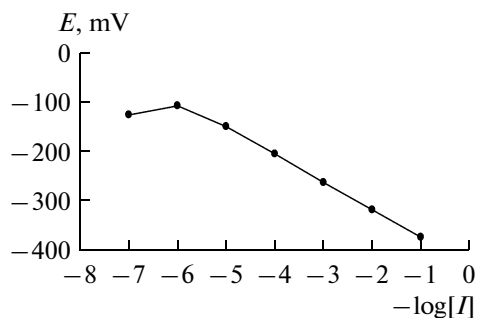


Рис. 2. Отклик глюкозного электрода ($E, \text{ mV}$) на йодид в 0.01 М фосфатном буфере при рН 7.0.

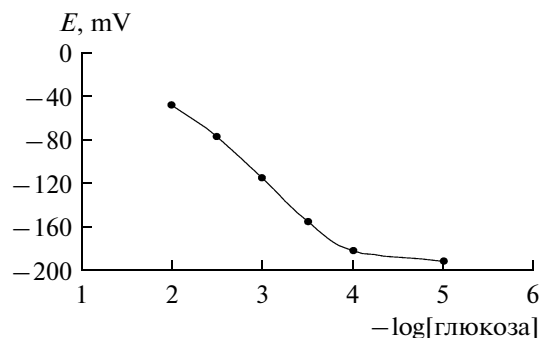


Рис. 3. Калибровочный график глюкозного электрода в 0.01 М фосфатном буфере при рН 7.0.

в диапазоне концентраций от 75–115 мг/л был определен в образцах стандартным методом [27]. Глюкозный биосенсор помещали в 25 мл 0.1 М фосфатного буфера, рН 7.0, содержащего 0.5 мл сыворотки, после этого к раствору добавляли растворы глюкозы. После каждого добавления измеряли значение потенциала против растворов глюкозы, взятых в различных концентрациях, и рассчитывали уменьшение количества йодида натрия. Концентрация глюкозы в сыворотке крови человека рассчитывалась в соответствии с калибровочным графиком. Полученные результаты были сопоставлены с данными анализов, проведенных в больнице Ибн Сина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Функционирование разработанного глюкозного биосенсора основано на реакции окисления глюкозы, катализируемой ГО, и превращения йодида в йод, катализируемого молибдатом натрия. Раствор глюкозы для калибровки содержал 10 мл дихлорметана, 2.5 мл 0.1 М йодида натрия, рН 7.0, и 5.0 мл 5%-ного молибдата натрия. Реакционную смесь доводили до 25 мл 0.1 М фосфатным буфером с тем же значением рН.

После окисления глюкозы в стандартных калибровочных растворах (10^{-1} – 10^{-6} М) с помощью полученного глюкозного электрода, содержащего ГО, образуется перекись водорода по реакции (1), которая реагирует с йодидом на йодидном электроде (реакция 2) в присутствии дихлорметана. Образовавшийся йод при этом переходит в фазу дихлорметана, а молибдат аммония катализирует окисление йодида. В противном случае, образовавшийся йод реагирует с йодидом в реакционной смеси с образованием трийодида (3).



Уменьшение количества йодид-иона определяется с помощью йодидного электрода. Концентрация глюкозы, таким образом, определяется опосредованно по уменьшению концентрации йодида,

который детектируется йодид-селективным биосенсором.

Чувствительность глюкозного биосенсора по отношению к йодиду и глюкозе. Для того, чтобы определить отклик глюкозного биосенсора на йодид-ионы и глюкозу, потенциометрические измерения проводились с использованием стандартных растворов для каждого реагента.

Калибровочные кривые для глюкозного биосенсора, йодид-ионов и глюкозы показаны на рис. 2 и 3. Чувствительность биосенсора к йодид-ионам и глюкозе была высокой в диапазоне концентраций 10^{-1} – 10^{-6} М и 10^{-2} – 10^{-4} М соответственно, что позволяет использовать этот тип сенсора для определения глюкозы в биологических жидкостях. Линейный диапазон отклика глюкозного биосенсора был в пределах 10^{-2} – 10^{-4} М и отвечал уравнению Нернста в пределах этого диапазона концентраций глюкозы (рис. 3). Наклон зависимости отклика биосенсора, выраженный в мВ/[глюкоза], составлял 65.2 ± 0.2 .

Влияние концентрации буфера. Чтобы изучить влияние концентрации буфера на отклик биосенсора и изменение наклона его линейного участка были проведены измерения с 5 различными концентрациями ФБ, взятыми в диапазоне 0.05–0.15 М. На рис. 4а показана зависимость изменения потенциала от концентрации глюкозы. Оптимальной концентрацией буфера, обеспечивающей наибольший отклик, была принята концентрация 0.05 М.

Влияние рН. Влияние рН на отклик глюкозного биосенсора исследовали в 0.05 М фосфатном буфере, проводя измерение при 6 различных значениях рН в диапазоне 5.0–8.0. Было показано, что величина отклика глюкозного биосенсора увеличивалась при увеличении рН до 7.0 и снижалась при рН выше 7.0 (рис. 4б). При значениях рН 7.0 ГО денатурируется из-за депротонирования в активном центре. При значениях рН менее 7.0 фермент также может быть денатурирован и следовательно иметь сниженную активность [27, 28].

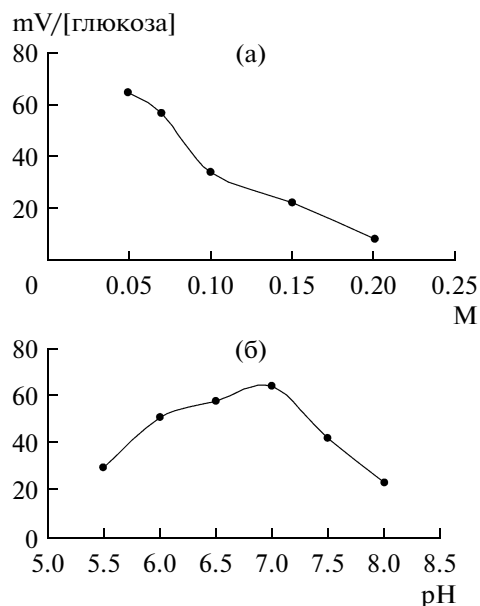


Рис. 4. Влияние концентрации фосфатного буфера (а) и рН (б) на чувствительность глюкозного биосенсора на основе йодид-селективного электрода.

Уменьшение отклика биосенсора с увеличением рН является общим свойством потенциометрических систем [27]. Таким образом, для всех измерений в дальнейшем использовали значение рН 7.0, как оптимальное.

Влияние температуры. Влияние температуры на отклик глюкозного биосенсора на основе йодидного датчика изучали при концентрации глюкозы 1.0 мМ и рН 7.0. Измерения проводили при 7 различных температурах от 10 до 50°C. Как видно из рис. 5, значение потенциала биосенсора увеличивалось с увеличением температуры до 25°C и снижалось при температуре выше 25°C, по-видимому, из-за снижения активности ГО. Активность фермента возрастала в определенных пределах при увеличении температуры, поэтому проведение экспериментов при оптимальной температуре является очень важным. При этом важно отметить, что высокая температура может привести к тепловой инактивации фермента и снижению концентрации O_2 [29].

Коэффициент селективности. Соединения, которые могут оказывать влияния на показания глюкозного биосенсора, можно разделить на две группы: одна группа соединений мешает обнаружению йодид-иона, другая мешает протеканию реакции с молибдатом натрия, поскольку он конкурирует с йодидом. К таким соединениям относятся аскорбиновая и мочевая кислоты, присутствующие в некоторых биологических образцах.

Приготовленный глюкозный биосенсор тестировали на чувствительность к Fe^{+3} , Cu^{+2} , F^- ,

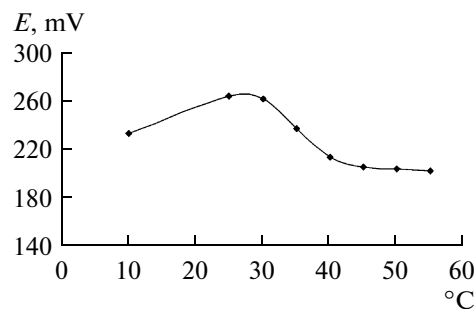


Рис. 5. Влияние температуры на отклик глюкозного биосенсора на 1 мМ концентрацию глюкозы.

Br^- , Cl^- , аскорбиновой и мочевой кислоте при рН 7.0. Соединения, часто обнаруживаемые в биологических жидкостях, реагируют с пероксидом водорода при том же потенциале, при котором проводятся потенциометрические измерения биосенсором в растворе 1.0 мМ глюкозы, как было показано Шринивасан и Рехнитц [30]. Были получены значения их потенциалов и рассчитаны коэффициенты селективности. Влияние Fe^{+3} , Cu^{+2} , F^- и Br^- на ответ глюкозного биосенсора было незначительным, 10^{-5} М аскорбиновая кислота не оказывала никакого эффекта. Мочевая кислота нерастворима в фосфатном буфере при рН 7.0, и ее влияние на биосенсор также не было обнаружено.

Влияние скорости перемешивания. Для изучения влияния скорости перемешивания на величину отклика глюкозного биосенсора измерения проводили в 0.05 М фосфатном буфере, рН 7.0, при 3 различных скоростях перемешивания – 100, 250 и 750 об/мин после достижения стабильного потенциала. Перемешивание в режиме 100 и 750 об/мин требовало больше времени для достижения стабильного потенциала по сравнению с 250 об/мин, который в дальнейшем и был использован. Снижение скорости перемешивания до 100 об/мин не оказывало никакого влияния на

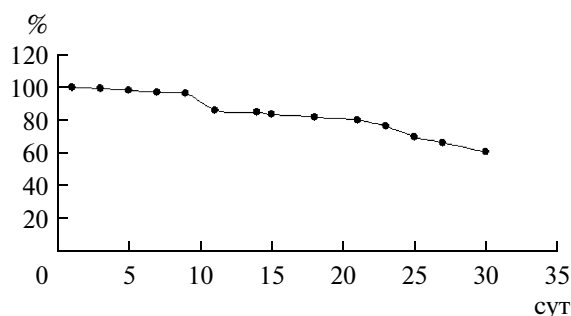


Рис. 6. Время эффективной работы глюкозного биосенсор на основе йодид-селективного электрода при хранении (4°C).

Измерение содержания глюкозы в образцах сыворотки крови человека с помощью разработанного глюкозного биосенсора и референтного глюкозного анализатора (госпиталь Ибн-Сина)

Образцы сыворотки	Концентрация глюкозы, мг/л*		Воспроизводимость, %
	госпиталь Ибн-Сина	йодид-селективный глюкозный сенсор	
1	86	84.7 ± 1.3	98.49
2	256	255.8 ± 2.1	99.9

* Значения являются средними из 4 экспериментов.

величину сигнала, но увеличивало время отклика биосенсора. Это можно объяснить более медленным протеканием ферментативной реакции при низкой скорости перемешивания. При высокой скорости перемешивания (750 об/мин) скорость ферментативных реакций также уменьшалась из-за возможного изменения конформации фермента, что также приводило к снижению аналитического сигнала. По указанным причинам скорость перемешивания 250 об/мин была определена как оптимальная.

Время отклика. Время отклика глюкозного биосенсора определяли как время, необходимое для достижения стабильного потенциала после того, как биосенсор и электрод сравнения были погружены в калибровочный раствор. Время отклика в наших измерениях составляло 1–2 мин.

Хранение глюкозного биосенсора. Срок хранения глюкозного биосенсора при температуре 4°C рассчитывали, определяя значения потенциала в калибровочных растворах и строя калибровочные кривые в течение одного месяца. Угол наклона калибровочной кривой, выраженной в мВ/[глюкоза] не изменялся в течение 10 дней, а затем постепенно снижался в течение 30 дней. Можно заключить, что разработанный глюкозный биосенсор достаточно стабилен в течение месяца (рис. 6).

Воспроизводимость показаний глюкозного биосенсора. Биосенсор был протестирован на точность повторения получаемых результатов путем воспроизведения калибровочной кривой пять раз в течение одного дня и угла наклона калибровочного графика, представленного в мВ/[глюкоза]. Относительное стандартное отклонение полученных углов наклона оказалось менее 0.5% для разработанных глюкозных биосенсоров.

Определение уровня глюкозы в образцах сыворотки крови человека с помощью глюкозного биосенсора. Уровень глюкозы в сыворотке крови человека измеряли с помощью разработанного глюкозного биосенсора, полученное значение сравнивали с результатами определения в больнице. Содержание глюкозы в двух различных образцах крови приведены в таблице.

Была показана высокая корреляция между данными, полученными при измерении концен-

трации глюкозы в пределах 75–115 мг/л в сыворотке крови человека с помощью разработанного глюкозного биосенсора и йодидного электрода и результатами, полученными в больнице Ибн-Сина. Такие соединения, как аскорбиновая и мочевая кислота в образцах сыворотки крови человека не оказывали влияния на измерение концентрации глюкозы.

Авторы выражают признательность за финансовую поддержку TUBITAK (проект № 106 T 359).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wencel D., Higgins C., Klukowska A., MacCraith B.D., McDonagh C. // Mater. Sci. 2007. V. 25. № 3. P. 767–779.
2. Mascini M., Guilbault G.G. // Biosensors. 1986. P. 147–172.
3. Park J.H., Kim C.S., Choi B.C., Ham K.Y. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. № 4. P. 321–324.
4. Tura A., Maran A., Pacini D. // Diabetes Res. Clin. Pract. 2007. V. 77. № 1. P. 16–40.
5. Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G. // Sensors. 2008. V. 8. № 4. P. 2043–2081.
6. Morikawa M., Kimizuka N., Yoshihara M., Endo T. // Chem. Eur. J. 2002. V. 8. № 24. P. 5580–5584.
7. Miwa Y., Nishizawa M., Matsue T., Uchida I. // Bull. Chem. Soc. Jp. 1994. V. 67. № 10. P. 2864–2866.
8. Mansouri S., Schultz J.S. // Nature Biotech. 1984. V. 2. № 10. P. 885–890.
9. Pickup J.C., Hussain F., Evans N.D., Rolinski O.J., Birch D.J.S. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 20. № 12. P. 2555–2565.
10. Wingard L.B., Jr. // Proc. Fed. Am. Sot. Exp. Biol. 1983. V. 42. № 2. P. 288–291.
11. Wingard L.B., Jr., Schiller J.G., Wolfson S.K., Jr., Liu L.L., Drash A.L., Yao S.J. // J. Biomed. Mater. Res. 1979. V. 13. P. 921–935.
12. Guilbault G.G., Neto G.O. Immobilized Cells and Enzymes. Ed. J. Woodward. Oxford: IRL Press, 1985. P. 55–74.
13. Scheller F.W., Pfeiffer D., Schubert F., Renneberg R., Kirstein D. // Biosensors: Fundamentals and Applications. Ed. A P. F. Turner et al. Oxford: Oxford University Press, 1987. P. 315–346.

14. *Velho G.D., Reach G., Thevenot D.R.* // Biosensors: Fundamentals and Applications. Ed. A P. F. Turner et al. Oxford: Oxford University Press, 1987. P. 390–408.
15. *Abdulla H.M., Greenway G.M., Platt A.E., Fielden P.R.* // *Analyst*. 1989. V. 114. № 1. P. 785.
16. *Jeykumari D.R.S., Narayanan S.S.* // *Biosens. Bioelectron*. 2008. V. 23. № 9. P. 1404–1411.
17. *Al-Hitti İ. K., Moody G.J., Thomas J.D.R.* // *Analyst*. 1984. V. 109. № 9. P. 1205–8.
18. *Alva S., Gupta S.S., Phadke R.S., Govil G.* // *Biosens. Bioelectron*. 1991 V. 6. № 8. P. 663–668.
19. *Abd-Rabboh H.S.M., Meyerhoff M.E.* // *Talanta*. 2007. V. 72. № 3. P. 1129–1133.
20. *Ghindilis A.L., Kurochkin I.N.* // *Biosens. Bioelectron*. 1994. V. 9. № 4–5. P. 353–357.
21. *Tinkilic N., Cubuk O., Isildak I.* // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 452. № 1. P. 29–34.
22. *Wang J.* // *Electroanalysis*. 2001. V. 13. № 12. P. 983–989.
23. *Wang H.J., Zhou C.M., Peng F., YuInt H.* // *J. Electrochem. Sci*. 2007. V. 2. № 4. P. 508–516.
24. *Wang X.D., Zhou T.Y., Chen X., Wong K.Y., Wang X.R.* // *Sens. Actuators B*. 2008. V. 129. № 2. P. 866–873.
25. *Couves L.D., Porter S.J.* // *Synthetic Metals*. 1989. V. 28. № 1–2. P. 761–768.
26. *Folly R.O.M., Valdman B., Valero F., Solà C.* // *Biotechnol. Tech*. 1996. V. 10. № 11. P. 867–870.
27. *Karakuş E., Pekyardımcı Ş., Kılıç E.* // *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol*. 2005. V. 33. № 3. P. 329–41.
28. *Karakuş E., Pekyardımcı Ş., Kılıç E.* // *Process Biochem*. 2006. V. 41. № 6. P. 1371–1377.
29. *Kalaycı Ş., Somer G., Ekmekci G.* // *Talanta*. 2005. V. 65. № 1. P. 87–91.
30. *Srinivasan K., Rechnit G.A.* // *Anal. Chem*. 1969. V. 41. № 10. P. 12039.

Potentiometric Glucose Determination in Human Serum Samples with Glucose Oxidase Biosensor Based on Iodide Electrode

E. Karakuş^a, Ş. Pekyardımcı^b, and E. Kılıç^b

^a *Yıldız Technical University, 34240, Esenler, Istanbul, Turkey*

^b *Ankara University, 06210, Ankara, Turkey*

e-mail: karakus@yildiz.edu.tr

Received February 1, 2012

Abstract—Glucose potentiometric biosensor was prepared by immobilizing glucose oxidase on iodide-selective electrode. The hydrogen peroxide formed after the oxidation of glucose catalysed by glucose oxidase (GOD) was oxidized by sodium molybdate (SMo) at iodide electrode in the presence of dichloromethane. The glucose concentration was calculated from the decrease of iodide concentration determined by iodide-selective sensor. The sensitivity of glucose biosensor towards iodide ions and glucose was in the concentration ranges of 1.0×10^{-1} — 1.0×10^{-6} M and 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-4} M, respectively. The characterization of proposed glucose biosensor and glucose assay in human serum were also investigated.