

3. Тиеззи Е., Валенсин Д. Биофизика, 21, 401—408, 1976.
4. Breslow E. J. Biol. Chem., 239, 3252—3259, 1964.
5. Katz S., Shinaberry S. G., Heck E. Z., Squire W. Biochem., 19, 3805—3813, 1980.
6. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736—3742, 1963.
7. Peters T. Jr., Blumenstock F. A. J. Biol. Chem., 242, 1574—1578, 1967.
8. Shearer W. T., Bradshaw R. A., Gurd F. R. N. J. Biol. Chem., 242, 5451—5459, 1967.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 616—073:577.15.087

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В РАСТВОРАХ

А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН, Ц. М. АВАКЯН

Описана аналитическая система для определения концентрации β -D-глюкозы в различных биологических растворах с отдельным электронным блоком. Воспроизводимость измерений не ниже 5%, линейный диапазон определяемых концентраций—10—400 мг% (0,55÷22,0 мМ), время отклика— не более 40 сек.

Ключевые слова: глюкоза, иммобилизованная глюкозооксидаза.

Глюкоза является самым универсальным источником углерода и энергии для живых организмов. Нарушение ее концентрации в крови обычно свидетельствует о патологическом состоянии организма. Она является также важнейшим компонентом питательных сред при ферментации микроорганизмов. Количество глюкозы в ряде сельскохозяйственных культур влияет на качество изготавливаемых пищевых продуктов. Поэтому понятно, что быстрое и точное определение концентрации глюкозы в биологических растворах крайне актуально. Применяемые в широкой аналитической практике методы ее определения в полной мере не отвечают требованиям быстроты, точности и, что очень важно, специфичности определений, предъявляемых в настоящее время при решении многих задач. Единственным методом, отвечающим требованиям высокой специфичности и точности измерений, является ферментативный метод определения концентрации глюкозы [1]. Однако широкому распространению его до недавнего времени препятствовала неэкономичность проводимого анализа, связанная с невозможностью многократного использования фермента.

Методы иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях, разработанные в последние два десятилетия, позволили преодолеть эти трудности. Были созданы аналитические системы для полуавтоматического и автоматического определения концентрации глюкозы [3—5]. Использование различных ферментов в таких системах позволяет определять концентрации целого ряда органических веществ в многокомпо-

нентных растворах. Результаты исследований в этой области приведены в монографиях [2, 3].

Цель настоящей работы состояла в разработке аналитической системы, способной специфично и быстро определять концентрацию β -D-глюкозы в различных биологических жидкостях.

Материал и методика. В работе использовался фермент глюкозооксидаза (ГОД) (КФ 1.1.3.4.) производства Олайнского объединения «Биохимпрепарат». Имобилизацию ГОД осуществляли на силиохроме С-120 производства Ставропольского завода химреактивов и люминофоров и силикагелях производства ЕрОНеМ ВНИИ ИРЕА по методике Робинсона [9]. Кислородный электрод изготавливался по методике Ли и Цао [8], в качестве электродной пары применяли пару платина—серебро, корпус электрода изготавливали из органического стекла. В качестве мембраны использовали мембрану марки «ФТ» толщиной 10 мк. Элюцию проводили либо фосфатным буфером с рН 6,5, либо дистиллированной водой. Калибровочные растворы глюкозы приготавливались из 40%-ного стерильного раствора глюкозы. Регистрацию сигнала кислородного электрода осуществляли с помощью полярографа LP-60 или используя специально разработанный для этой цели электронный блок, имеющий выход на цифровой вольтметр или самописец.

Результаты и обсуждение. Амперометрическая аналитическая система для определения концентрации глюкозы представляет собой конструктивно объединенный в одно целое иммобилизованный ферментный препарат и ионселективный электрохимический датчик, регистрирующий изменение концентрации электрохимически активного продукта ферментативной реакции. Конструкция и особенности работы аналитической системы зависят от конкретных целей, для достижения которых создается система, и могут быть реализованы либо в виде погружаемого ферментного электрода, в котором фермент иммобилизован прямо на электрохимическом датчике, либо в виде проточного реактора с вытеснением. Мы использовали реактор с вытеснением, представляющий собой колонку из оргстекла длиной 110 мм и внутренним диаметром 4 мм. Колонку заполняли носителем с иммобилизованной ГОД и через нее с постоянной скоростью 5 мл/мин прокачивался либо стандартный буферный раствор, либо дистиллированная вода. На выходе камеры помещался кислородный мембранный электрод. Исследуемый образец инжектировался в нижней части камеры через устройство для ввода образца.

Рассмотрим наиболее существенные моменты в работе такой аналитической системы. Важнейшим в работе устройств подобного типа является ввод образца в систему. Во-первых, количество вводимого образца должно быть строго стандартизировано, так как от этого существенно образом зависит воспроизводимость результатов измерений. Этого можно достичь использованием автоматизированных пипеток, которые обеспечивают ввод точно отмеренного количества исследуемой пробы. Во-вторых, очень важны выбор метода введения образца в колонку и способ разделения образцов. Ряд авторов [6, 7] предлагают отделять образцы друг от друга и вводить их в систему с помощью перистальтического насоса, который сегментирует воздухом поток жидкости, отделяя образцы, и засасывает необходимое количество субстрата. Однако исследования последних лет [10] показали, что наиболее

надежно инжектирование образца вдвигающийся несегментированный воздухом проток реакционной смеси. Именно поэтому и мы применили инжектирование образца в нижней части колонки через отверстие, закрываемое упругой резиновой перегородкой.

Другим важным моментом является устройство камеры детектирования, в которой прореагировавшая смесь поступает к чувствительному элементу.

Нам удалось сконструировать камеру детектирования, в которой обеспечивается как равномерная подача раствора к измерительному электроду, так и предварительное перемешивание раствора. Это позволило добиться хорошей воспроизводимости результатов измерений, важным условием которой является равномерное перемешивание образца с буферным раствором до того, как образец достигнет иммобилизованного фермента. Как уже отмечалось, инжектирование образца в проток дает достаточно хорошие результаты. Перемешивание в этом случае осуществляется за счет турбулентности потока. В результате воспроизводимость измерений в нашей системе не ниже 5%.

Калибровочный график для модельных растворов приведен на рис., из которого видно, что линейность определяемых концентраций на-

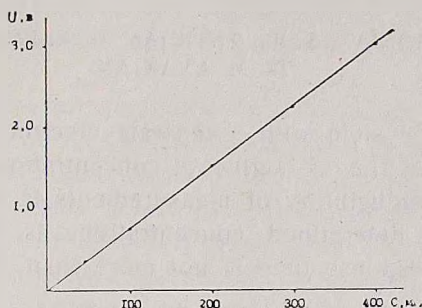


Рис. Калибровочная кривая по стандартным растворам глюкозы. По оси ординат отложена величина сигнала на выходе электронного блока, по оси абсцисс—концентрация—Д-глюкозы в калибровочных растворах.

ходится в пределах 10—400 мг% (0,55—22,0 мМ). Время отклика системы зависит от скорости потока, объема реактора, не занятого ферментом, времени отклика кислородного электрода. В нашей системе время отклика—30—40 сек, время полного анализа образца 1,5—4 мин. Оба эти параметра варьируют в зависимости от концентрации субстрата.

Испытания на специфичность аналитической системы показали, что она реагирует только на β -D-глюкозу, в то время как α -D-глюкоза, мальтоза, фруктоза, глюкозо-6-фосфат, сахароза практически не дают отклика.

Предварительные испытания показали принципиальную возможность применения данной системы для анализа культуральной жидко-

сти, определения концентрации глюкозы в плазме крови, моче и других жидких средах.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

ԱՆԱԼԻՏԻԿ ՍԻՍՏԵՄ ԼՈՒՄԻՆՅՈՒՆԵՐՈՒՄ ԳԼՅՈՒԿՈԶԱՅԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՅԻԱՅԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ա. Լ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ս. Շ. ԹԱԹԻԿՅԱՆ, Գ. Է. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Մ. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ

Նկարագրված է տարբեր կենսաբանական լուծույթներում β -D-գլյուկոզայի կոնցենտրացիայի որոշման համար նախատեսված առանձին էլեկտրոնային բլոկով անալիտիկ սխեմա: Չափումների վերաբերողականությունն է 5%-ից ոչ պակաս, որոշվող կոնցենտրացիաների գծային տիրույթը 10—400 մգ % է ($0,55 \pm 22,0$ մՄ), արձագանքման ժամանակը ազելի չէ 40 վրկ-ից:

ANALYTICAL SYSTEM FOR DETERMINATION OF GLUCOSE CONCENTRATION IN SOLUTIONS

A. L. SIMONIAN, S. Sh. TATIKIAN, G. E. KHACHATRIAN,
Ts. M. AVAKIAN

An analytical system with a separate electron unit is described for the determination of the β -D-glucose concentration in various biological solutions. The reproducibility of measurements is in terms of 5%, the linear range of the determined concentrations is 10—400 mg% ($0,55 \pm 16,5$ mM), the response time is not more than 40 seconds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Достижения в клинической ферментативной диагностике. М., 1977.
2. Имобилизованные ферменты. М., 1976.
3. Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс, 1981.
4. Ралис Э. В., Кулис Ю. Ю., Краняускас В. И., Швирмицкас Г. С. Методы определения ферментативной активности и их унификация. Вып. 4, Вильнюс, 1979.
5. Bauman E. K., Goodson L. H. Anal. Chem., 37, 11, 1965.
6. Campbell J., Chang T. M. S. Biochem. Biophys. Acta, 397, 1975.
7. Guilbault G. G. In: Comprehensive Anal. Chem., Amsterdam, 8, 1977.
8. Lee Y. H., Tsao G. T. Adv. Biochem. Eng., 13, 35, 1977.
9. Robinson P. J., Dunill P., Lilly M. D. Biochem. Biophys. Acta, 242, 659, 1979.
10. Wolff Ch.-M., Motolla H. A. Anal. Chem., 50, 1, 1978.