

Determination of the Glucose and Sucrose by FIA with Electrochemical Detection (Stanovení glukózy a sacharózy průtokovou analýzou s elektrochemickou detekcí)

Martin Bartoš, Elen Páčová, Ivana Prchalová and Tomáš Mikysek
University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical
Chemistry, Studentská 573, CZ-532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: martin.bartos@upce.cz

Abstract

Determination of glucose is based on electrochemical detection of products originated from reaction of glucose with enzyme glucose oxidase (GOx). Determination of sucrose follows the same procedure after its hydrolysis to mixture of glucose and fructose. The flow system consisted of two channel peristaltic pump, batch loop, and detector with porous graphite as working electrode. The agent (solution of GOx) was injected into flow of sample. Interferents (e.g. ascorbic acid) have no effect on determination, just increase background current. Optimum conditions are: 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, linear range of glucose (sucrose) concentration 10^{-4} až 10^{-2} M, enzyme solution 5 units/ml, working potential +1.00 V (vs. Ag/AgCl/sat.KCl).

Key words: Glucose, Sucrose, Glucose Oxidase, FIA, Electrochemical detection.

Úvod

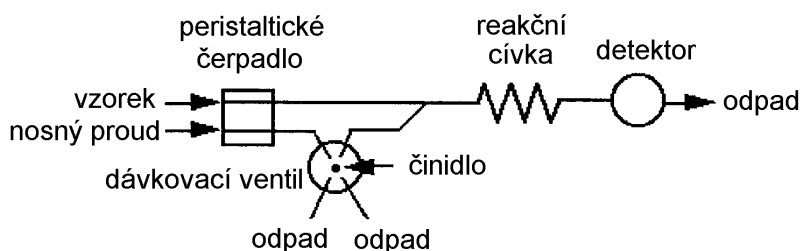
Pro stanovení koncentrace glukózy ve vzorcích se složitější matricí se často používají postupy založené na její oxidaci, tj. různé varianty oxidimetrických a coulometrických titrací a amperometrie.^{1,2,3} Glukóza vyžaduje poměrně energickou oxidaci, tj. použití silných oxidačních činidel nebo relativně vysokého pracovního napětí při oxidaci elektrochemické. Přítomnost jiných oxidovatelných látek ve vzorku může proto představovat vážnou komplikaci stanovení. Z tohoto důvodu je zvláště ve složitých matricích (krev a jiné tělní tekutiny, nápoje a potraviny) stále více používáno nepřímé stanovení založené na měření produktů reakce glukózy s vhodným enzymem⁴, kterým je v naprosté většině případů (i když ne výhradně) glukóza oxidáza^{5,6}. Enzym reaguje prakticky pouze s jedním polohovým izomerem glukózy, což umožňuje vysokou selektivitu stanovení - ovšem pouze pokud se podaří zajistit vysokou selektivitu při měření koncentrace produktů reakce enzymu. Peroxid vodíku se ve vzorcích obvykle nevyskytuje, a proto může pocházet pouze z oxidace glukózy. I když jej lze stanovit různými metodami², větší význam má pouze amperometrie. Obvykle je oxidován na elementární kyslík, oxidace ale probíhá při relativně vysokém napětí, při kterém mohou být oxidovány i jiné oxidovatelné látky, např. kyselina askorbová. Redukce peroxidu na vodu je sice poněkud selektivnější, je ale komplikována vysokým záporným přepětím. Enzym je obvykle ukotven spolu s pomocným činidlem (mediátorem) přímo na povrchu elektrody. Tento tzv. glukózový biosenzor je dnes široce využíván především při stanovování hladiny glukózy v krvi diabetiků.

V této práci je navržen jednoduchý průtokový systém pro občasná stanovení glukózy a sacharózy především v potravinách, který nevyžaduje výrobu biosenzoru, není příliš citlivý na přítomnost rušících elektroaktivních látek a byl realizován z relativně dostupných komponent.

Experimentální část

Aparatura (viz obr. 1) byla sestavena z dvoukanalového peristaltického čerpadla (MS CA-2/860C, Ismatec, Švýcarsko; průtok 1 ml/min), dávkovacího ventilu (Dávkovací analytický

ventil smyčkový C, Ecom s.r.o. Praha) se smyčkou o objemu 50 μl , reakční teflonové hadičky o průměru 0,5 mm a délce 50 cm a průtokového detektoru Eca cell 353b (Istran Bratislava, Slovensko) připojeného k přístroji Polarographic analyzer PA 4 (Laboratorní přístroje Praha; přístroj umožňuje nastavit různou velikost tlumení signálu a tím do značné míry potlačit vliv proudových oscilací vytvářených peristaltickým čerpadlem). Průtoková cela má v sobě zabudován držák porézní pracovní elektrody, referentní argentchloridovou a pomocnou platinovou elektrodu. Použita byla pracovní elektroda E53C, která je tvořena vodivým prstencem vyplněným uhlíkovou „drtí“.



Obr. 1. Schéma aparatury.

K nastavování a kontrole pH roztoků byl použit Laboratorní digitální pH-metr Gryf 107 (Laboratorní přístroje Gryf, Havlíčkův Brod).

Chemikálie

Při měřeních byl používán enzym Glucose oxidase (Sigma-Aldrich) o aktivitě 234900 jednotek/g (katalog. číslo G-7141) a 6000 jednotek/g (G-6766). Ostatní chemikálie byly p.a. čistoty od výrobců Lachema Neratovice a Lachema Brno. Argon a kyslík v tlakových láhvích byly od firmy Linde Technoplyn. Použitá demineralizovaná voda s vodivostí pod 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pocházela z přístroje Demiva 5 roi (Watek s.r.o, Ledec nad Sázavou).

Příprava fosfátového pufru (pH 7,0): 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 900 ml vody, pH tohoto roztoku bylo upraveno 10 % roztokem NaOH na 7,0 a objem roztoku byl doplněn na 1000 ml.

Příprava vzorků a standardů

Všechny proměřované roztoky byly připravovány rozpuštěním resp. zředěním fosfátovým pufrům. Čerstvě připravený roztok glukózy je nutné nechat buď delší dobu stát (až 1 den) nebo jej krátkodobě zahřát k varu (několik minut na vodní lázni), aby se ustálila rovnováha mezi různými formami glukózy (enzym reaguje pouze s β ,D-glukopyranózou).

Před stanovením sacharózy je nutné provést v jednom podílu vzorku inverzi sacharózy na glukózu a fruktózu. Inverze sacharózy: 1 ml konc. HCl na každých 10 ml roztoku, zahřát na max. 70°C po dobu max. 10 minut, ochladit, přidat cca 10 ml fosfátového pufru, upravit pH roztokem 10 % NaOH na 7,0 a doplnit v odměrné baňce fosfátovým pufrům. Před analýzou je tento roztok dále vhodně naředěn fosfátovým pufrům.

Optimální koncentrace glukózy v proměřovaných roztocích je cca 10^{-4} až $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, optimální koncentrace roztoku GOx je 5 jednotek/ml. K vyhodnocení měření je vhodné použít kalibrační graf. Koncentrace glukózy se zjistí z rozdílu signálů neinvertovaného a invertovaného podílu vzorku.

Roztoky, které nejsou čiré, je nutné před dávkováním do FIA systému přefiltrovat, jinak dochází k ucpávání detektoru.

Měření praktických vzorků

Glukóza a sacharóza byly stanoveny v nápojích Coca-Cola, Sprite a Jablečný nápoj Toma a v Horském medu JSG. Před analýzou byly vzorky nápojů odplyněny na ultrazvukové lázni. Coca-Cola a Sprite obsahovaly přibližně stejné koncentrace obou cukrů - cca 21 g/l glukózy a cca 65 g/l sacharózy. Jablečný nápoj Toma obsahoval 6,1 g/l glukózy a 16,7 g/l sacharózy. Vitamín C, obsažený v nápoji, mírně zvedal základní linii, ale nerušil stanovení. Horský med JSG obsahoval 26 % glukózy a 4,0 % sacharózy.

Výsledky a diskuse

Průtokový systém

Nejvhodnějším se ukázal být průtokový systém tvořený dvěma proudy. Jeden prochází dávkovací smyčkou, která dávkuje do proudu čistého pufru zónu GOx rozpuštěné v tomtéž pufru. Tento proud je ve vhodné vzdálenosti před detektorem smícháván s druhým proudem, tvořeným vhodně naředěným a pufrovaným vzorkem. Detektorem tedy protéká vzorek obsahující zónu GOx. Tato zóna se na záznamu projeví píkem, jehož výška je úměrná koncentraci glukózy. Oxidovatelné látky ve vzorku zvyšují úroveň proudového pozadí, ale obvykle neruší vlastní stanovení.

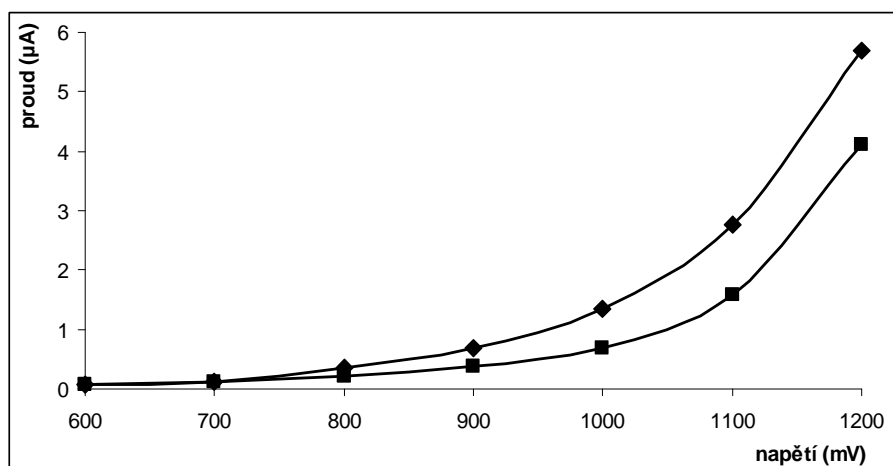
Porézní elektrody trpěly postupným ucpáváním. Jako vhodné protiopatření zabráňující ucpání elektrody se ukázalo uchovávání elektrody na suchu (po propláchnutí destilovanou vodou) resp. v 15 % methanolu. Ucpanou elektrodu bylo možné obnovit vyčištěním v ultrazvukové lázni.

Vliv pH a základního elektrolytu

Velký vliv na aktivitu enzymu a tím i na citlivost stanovení má pH roztoku. Výrobce udává aktivitu enzymu při pH 5,1. Jako nejvhodnější se ale ukázalo pH přibližně 7,0 (fosfátový pufr 0,1 mol/l). Naopak, při pH 4,7 (acetátový pufr) byla odezva asi 4x menší, než v pufru fosfátovém. Při jemnějším proměření v rozsahu pH 6,4 až 7,7 byl maximální signál získán při hodnotě pH 7,5. Vzhledem k citlivosti signálu na kolísání pH byl používán fosfátový pufr o pH 7,0, tj. o pH blízkém maximální tlumivé kapacitě pufru (pokles citlivosti ve srovnání s maximem byl necelých 20 %).

Polarizační napětí

Problém, který se nepodařilo vyřešit, představuje poměrně vysoké napětí potřebné na oxidaci peroxidu vodíku (případně redukované formy enzymu), a to zvláště na uhlíkových elektrodách. Signál se objevuje až v oblasti, kde začíná rozklad elektrolytu. Používané pracovní napětí (+1,00 V) je kompromis mezi dostatečně velkým signálem oxidace H₂O₂ a přijatelně vysokým proudem pozadí.



Obr. 2. Závislost velikosti signálu na vkládaném napětí: ■ fosfátový pufr; ◆ 10^{-3} M glukóza ve fosfátovém pufru.

Vliv kyslíku

U roztoků neobsahujících kyslík by neměl vznikat H_2O_2 , tzn. že detektor by neměl reagovat na dávkování enzymu. V rozporu s tímto předpokladem byl získán prakticky stejně velký signál pro roztoky bez kyslíku (vybublané argonem), se vzdušným kyslíkem i nasycené (probublané) kyslíkem z tlakové láhve. To vzbuzuje podezření, že měřený proud je způsoben nejen oxidací H_2O_2 , ale pravděpodobně i přímou oxidací redukované formy enzymu. Tomu by mohlo nasvědčovat i to, že samotný enzym (tj. bez glukózy) dává signál odpovídající roztoku glukózy o koncentraci přibližně 10^{-5} mol/l.

Stabilita signálu

Krátkodobě (desítky po sobě jdoucích nástřiků) lze signál považovat za téměř konstantní. Dlouhodobě lze u nové elektrody sledovat postupné zvyšování citlivosti, které po několika dnech dosáhne svého maxima a pak začne pomalu klesat. Výraznější vliv má postupné ucpávání porézní elektrody a opotřebování hadiček peristaltického čerpadla, které způsobují snižování průtoku roztoku detektorem.

Další parametry

Z dalších experimentů vyplynulo, že za daných podmínek (průtok každou větví 1,0 ml za minutu, vnitřní průměr hadiček 0,5 mm) je nejvhodnější koncentrace roztoku enzymu přibližně 5 jednotek/ml a délka reakční smyčky přibližně 50 cm.

Roztok enzymu v pufru, pokud byl uchovávan v chladu, bylo možné používat po dobu až jednoho měsíce. Používán byl i roztok připravený z méně kvalitního preparátu GOx - větší obsah balastních látek se na signálu prakticky nijak neprojevil.

Interference

Při vysokém pracovním napětí jsou oxidovány i další elektrochemicky aktivní látky přítomné ve vzorku. Největší význam v tomto smyslu má kyselina askorbová, běžně přítomná v nápojích a potravinách. Její přítomnost se projevuje zvýšeným proudem pozadí, ale výšku píku, která odpovídá koncentraci glukózy, neovlivňuje. Kromě toho ji lze poměrně jednoduše odstranit ponecháním roztoku vzorku v pufru na vzduchu nebo probubláváním roztoku kyslíkem.

Inverze je obvykle prováděna v silně kyselém prostředí (HCl) za zvýšené teploty. Vzhledem k vlastnostem používaného způsobu detekce je nutné pH roztoku po inverzi upravit na hodnotu co nejbližší 7,0. Při pečlivém provedení se kalibrační závislost pro glukózu a sacharózu prakticky neliší. Při vyhodnocení je nutné si uvědomit, že signál roztoku před inverzí odpovídá glukóze a signál roztoku po inverzi sumě glukózy a sacharózy.

Závěr

Stanovení glukózy „obrácenou“ FIA, při které je dávkováno činidlo do proudu vzorku, snižuje spotřebu drahého činidla a umožňuje stanovení glukózy a sacharózy v běžných materiálech (nápoje, potraviny) i v přítomnosti poměrně vysokých koncentrací interferujících látek. Aparatura je jednoduchá a sestavitelná z relativně snadno dostupných dílů.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou projektu SGSFCHT_2016001.

Literatura

1. Bott A. W.: *Curr. Sep.* 17, 25 (1998).
2. Tanaka T., Shutto E., Mizoguchi T., Fukushima K.: *Anal. Sci.* 17, 277 (2001).
3. Michalski E., Czarnecki K., Ignaczak M.: *Talanta* 5, 137 (1960).
4. *Encyclopedia of Analytical Science* Vol. 2, Academic Press, 1995.
5. Vodrážka Z.: *Biochemie I.* Academia, Praha 1992.
6. Hecht H. J., Schomburg D., Kalisz H., Schmidt R. D.: *Biosens. Bioelectron.* 8, 197 (1993).

Navrátil Tomáš, Fojta Miroslav a Schwarzová Karolina (editoři): Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXVI. Moderní Elektrochemické Metody, Jetřichovice 23. - 27. května 2016. ISBN 978-80-905221-4-5

Best servis Ústí nad Labem

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Praha

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Navrátil Tomáš, Fojta Miroslav a Schwarzová Karolina (editors): Proceedings of the International Conference Modern Elektrochemical Methods XXXVI, Jetřichovice, Czech Republic, May 23rd - 27th, 2016. ISBN 978-80-905221-4-5

Best servis Ústí nad Labem

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v. v. i., Prague

Institute of Biophysics of the AS CR, v. v. i., Brno

UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague