

УДК 537.534.8:577.15

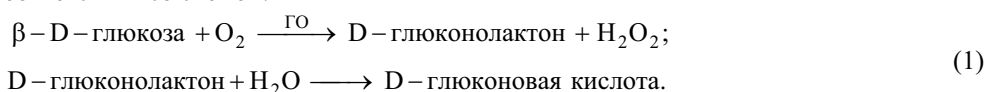
**ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА МСВИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОСЕНСОРА НА ГЛЮКОЗУ****В.Н. Мельников, В.А. Литвинов, В.Т. Коппе, В.В. Бобков, В.В. Товстяк***Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077**E-mail: plip@lin.com.ua*

Поступила в редакцию 13 марта 2006 г.

Работа посвящена вопросам применения метода масс-спектрометрии вторичных ионов с использованием жидкой матрицы для исследования взаимодействия компонентов в водных (или буферных) растворах сложных биоорганических систем. Пробы водных растворов исследуемых систем для анализа растворяются в глицериновой матрице. В процессе анализа исследуется поведение вторичных ионов, характерных для продуктов реакции. Проведено исследование системы “глюкоза + глюкозооксидаза в Na-фосфатном буфере”, моделирующей взаимодействие между компонентами биосенсора на глюкозу. В результате окисления глюкозы, катализируемого глюкозооксидазой, в растворе образуется глюконовая кислота (продукт реакции). Глюконовая кислота надежно регистрируется по пикам ее депротонированной молекулы в масс-спектре отрицательных вторичных ионов. Исследовано влияние некоторых параметров системы “глюкоза + глюкозооксидаза в Na-фосфатном буфере” на выход глюконовой кислоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: масс-спектрометрия вторичных ионов, глицериновая матрица, глюкозооксидаза, глюконовая кислота, биосенсор на глюкозу.

Одним из многообещающих классов биомолекулярных устройств являются биосенсоры. Биосенсоры – это аналитические устройства, работа которых основана на распознавании анализируемого вещества с помощью биологического элемента [1]. Многочисленные применения нашли биосенсоры на глюкозу [2, 3]. Обычно в биосенсорах на глюкозу используется реакция окисления глюкозы. Эта реакция катализируется ферментом глюкозооксидазой (ГО) в соответствии со схемой:



Несмотря на значительные усилия, направленные на создание биосенсоров, до настоящего времени остается актуальной проблема разработки недорогих и простых в применении устройств для контроля глюкозы. Для выяснения механизмов взаимодействий, происходящих в биосенсоре, необходима разработка новых методов диагностики, позволяющих прямо и однозначно анализировать взаимодействие компонентов в биосенсоре или в ячейке, моделирующей работу биосенсора.

Метод масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) хорошо зарекомендовал себя при анализе металлов и полупроводников [4–6]. Он отличается высокой элементной чувствительностью, позволяет получать однозначную информацию о связях компонентов в анализируемой системе; во многих случаях позволяет идентифицировать компоненты системы (в том числе продукты взаимодействия). Однако при анализе органических и биоорганических веществ метод МСВИ еще требует значительной методической доработки. Это особенно относится к анализу биоорганических многокомпонентных систем, находящихся в жидкой (водной) среде. Данная работа посвящена рассмотрению вопросов применения метода МСВИ с использованием жидкой (глицериновой) матрицы для исследования взаимодействия компонентов в водных (или буферных) растворах сложных биоорганических систем. Проведено исследование системы “глюкоза + глюкозооксидаза в Na-фосфатном буфере”, моделирующей взаимодействие между компонентами биосенсора на глюкозу.

МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

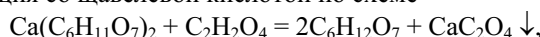
Исследования проведены с использованием масс-спектрометрии вторичных ионов и методики жидкой матрицы, когда анализируемое вещество (или анализируемая система) для проведения анализа помещается в матрицу из слаболетучей жидкости [7, 8]. Использование жидкой матрицы имеет два основных достоинства: во-первых, она позволяет проводить исследование неповрежденных молекул растворенных веществ при значительно больших, чем при статическом режиме МСВИ [9], плотностях тока пучка первичных ионов; во-вторых, допускает корректное проведение исследований при сравнительно невысоком (не сверхвысоком) вакууме.

В данной работе в качестве жидкой матрицы был использован глицерин. Выбор именно глицерина обусловлен двумя основными факторами:

- а) он имеет довольно малую упругость пара (при комнатной температуре $\sim 10^{-2}$ Па);
- б) глицерин является хорошим растворителем многих органических веществ.

Измерения проведены с использованием глицерина производства фирмы “Vaishali Pharmaceuticals” (Индия), содержание воды – 0,175 %, хлоридов – не более 0,0005 %, тяжелых металлов – менее 0,0001 %.

Моделирование взаимодействия компонентов биосенсора на глюкозу осуществлялось в 100 мМ Na-фосфатном буфере с pH 7,3–7,4. Буферный раствор получали смешиванием водных растворов Na_2HPO_4 (100 мМ, 4 части) и NaH_2PO_4 (100 мМ, 1 часть). Использованы реактивы марки ЧДА. Модельные растворы содержали одновременно D-глюкозу и глюкозооксидазу. Использована D-глюкоза марки ХЧ и глюкозооксидаза из *Aspergillus niger*. Активность фермента – 181,5 ед/мг; одна единица фермента превращает 1 мкмоль β-D-глюкозы в D-глюконолактон в минуту. Для проведения сопоставлений измерялись также масс-спектры отдельных компонентов, составляющих модельный раствор. Нахождение характерных вторичных ионов для продукта реакции – глюконовой кислоты ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$) – проведено при исследовании масс-спектра вторичных ионов ее раствора в буфере. Глюконовая кислота для этих качественных экспериментов получалась в результате взаимодействия глюконата кальция со щавелевой кислотой по схеме



с последующей фильтрацией и выпариванием раствора глюконовой кислоты до 50%-й концентрации. Пробы модельного раствора, а также растворов его компонентов и глюконовой кислоты в буфере во всех случаях для исследований методом МСВИ помещались в глицериновую матрицу в соотношении 1 : 5,6.

При проведении нами многочисленных измерений масс-спектров вторичных ионов для растворов различных органических веществ в глицериновой матрице и при различных их концентрациях было обнаружено, что выход простых ионов C^\pm ($m = 12$ Да)* и CH^\pm ($m = 13$ Да) определяется глицериновой матрицей и очень слабо

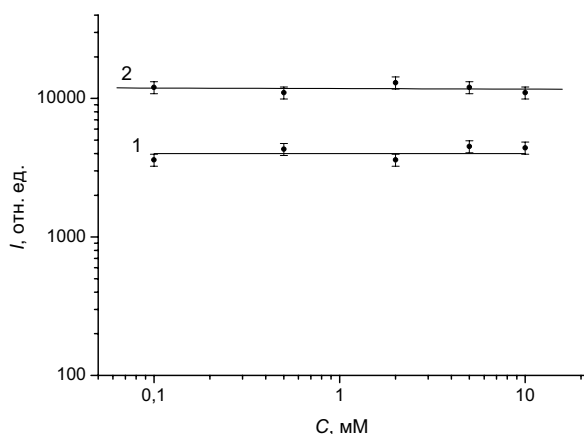


Рис. 1. Зависимости тока вторичных ионов C^- (1) и CH^- (2) от концентрации органического красителя бромтимолового синего в глицериновой матрице

зависит от растворения того или иного вещества в матрице. В качестве иллюстрации на рис. 1 показано изменение интенсивностей пиков ионов C^- и CH^- от концентрации красителя бромтимолового синего в глицерине. В то же время, как было показано нами ранее [10], изменение выхода сложных вторичных ионов, характерных для глицерина, и вторичных ионов, характерных для бромтимолового синего, достигает в этом диапазоне концентраций красителя двух порядков. С учетом сказанного, для уменьшения влияния неконтролируемых факторов на измеренные интенсивности пиков в масс-спектрах вторичных ионов проводилась нормировка масс-спектров по интенсивностям пиков, соответствующих ионам с $m = 12$ Да и $m = 13$ Да.

При исследовании вещества в жидкой матрице важно правильно выбрать вторичные ионы для анализа, которые, с одной стороны, характеризовали бы растворенное вещество, с другой, были бы свободны от наложения пиков ионов, выбитых из матрицы. В данной работе использован подход, предложенный в работе [11]. В случае веществ, которые не приводят к усилению эмиссии ионов, характерных для глицерина (в масс-спектре отрицательных вторичных ионов это ионы $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3^-$ ($m = 91$ Да); $((\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3)_2-\text{H})^-$ и др.; положительных – $(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3)\text{H}^+$ ($m = 93$ Да); $(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3)_2\text{H}^+$ и др.), выбор таких ионов можно осуществить путем деления интенсивности пиков в масс-спектре раствора исследуемого вещества (Ob) на интенсивность соответствующих пиков в масс-спектре глицерина (Gl), полученного при идентичных экспериментальных условиях. В результате этой операции находится ряд значений “коэффициентов превышения” – $K_{Ob/Gl}^\pm(m_i) = I_{Ob}^\pm(m_i) / I_{Gl}^\pm(m_i)$. Чем больше величина найденного коэффициента $K_{Ob/Gl}^\pm(m_i)$, тем в большей степени происхождение вторичного иона с массой m_i связано именно с растворенным веществом. Развитием этого подхода является определение характерных вторичных ионов в масс-спектрах проб растворов тех или иных систем в буфере относительно масс-спектра раствора пробы буфера в глицерине. При этом интенсивности пиков в масс-спектре исследуемого объекта делятся на интенсивности пиков в масс-спектре пробы буферного раствора (Buf) в глицерине. Характерными можно считать ионы, для которых коэффициенты превышения заметно больше, чем коэффициенты превышения для пиков, характерных для глицерина, т.е. если $K_{Ob/Buf}^+(m_i) > K_{Ob/Buf}^+(93)$ или $K_{Ob/Buf}^-(m_i) > K_{Ob/Buf}^-(91)$. При анализе масс-спектров вторичных ионов мы обычно использовали этот подход.

Анализировались масс-спектры положительных и отрицательных вторичных ионов. Как показали результаты предварительных исследований, масс-спектр положительных вторичных ионов менее информативен относительно процессов, протекающих с образованием глюконовой кислоты, поэтому все основные эксперименты проведены с использованием масс-спектра отрицательных вторичных ионов. В качестве первичных ионов использовались ионы Ag^+ с энергией 16 кэВ. Ток пучка выбирался с учетом результатов, приведенных в рабо-

* Здесь и далее, если это не оговорено особо, при интерпретации вторичных ионов в соответствии с их массой или расчете массовых чисел ионов по их химической формуле имеются в виду основные изотопы элементов.

те [12], и составлял 0,025 мкА. Размер облучаемого участка $\sim 10 \times 1,7$ мм, плотность тока ионов составляла при этом 0,15 мкА/см². Диапазон исследованных масс вторичных ионов 1–300 Да. Приготовление рабочих растворов, моделирование процессов в них и измерения выполнялись при комнатной температуре.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование масс-спектров компонентов растворов, моделирующих биосенсор на глюкозу

Проведено исследование масс-спектров отрицательных вторичных ионов для проб объектов, являющихся компонентами модельных растворов: Na-фосфатный буфер ($C = 100$ мМ), растворы в буфере глюкозооксидазы ($T = 1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл), глюкозы ($C = 300$ мМ), а также глюконовой кислоты ($C = 300$ мМ).

На рис. 2 в виде столбчатой диаграммы приведен фрагмент масс-спектра отрицательных вторичных ионов для раствора в глицерине пробы 100 мМ Na-фосфатного буфера, а на рис. 3 масс-спектр характерных вторичных ионов для 100 мМ Na-фосфатного буфера после обработки этого фрагмента масс-спектра по описанной выше методике. К характерным вторичным ионам отнесены ионы, для пиков которых выполняются условия $K_{Buf/Gl}^-(m_i) > 2$ и $I \geq 100$ отн. ед. Диапазон масс на рис. 2 и 3 ограничен областью до 200 Да, поскольку именно здесь расположены пики всех наиболее интересных с точки зрения рассматриваемой задачи вторичных ионов. Из сопоставления рисунков видно, что большинство из наиболее интенсивных пиков в масс-спектре ($m = 12; 13; 16; 17; 24; 25$ Да и др.) не являются характерными для буфера и на рис. 3 отсутствуют. Наиболее интересные характерные вторичные ионы для буфера, имеющие достаточно большие интенсивности пиков, это ионы с $m = 63$ Да – PO_2^- , $m = 79$ Да – PO_3^- , $m = 97$ Да – $H_2PO_4^-$ (фрагменты молекул составляющих буфера), а также ионы с $m = 189$ Да – $(C_3H_8O_3)H_2PO_4^-$, являющиеся комбинацией молекулы глицерина и фрагмента $H_2PO_4^-$ компонента NaH_2PO_4 буфера. Подчеркнем важную роль анализа масс-спектра вторичных ионов пробы буфера, поскольку при последующих измерениях масс-спектры вторичных ионов для тех или иных систем будут сравниваться преимущественно именно с этим масс-спектром.

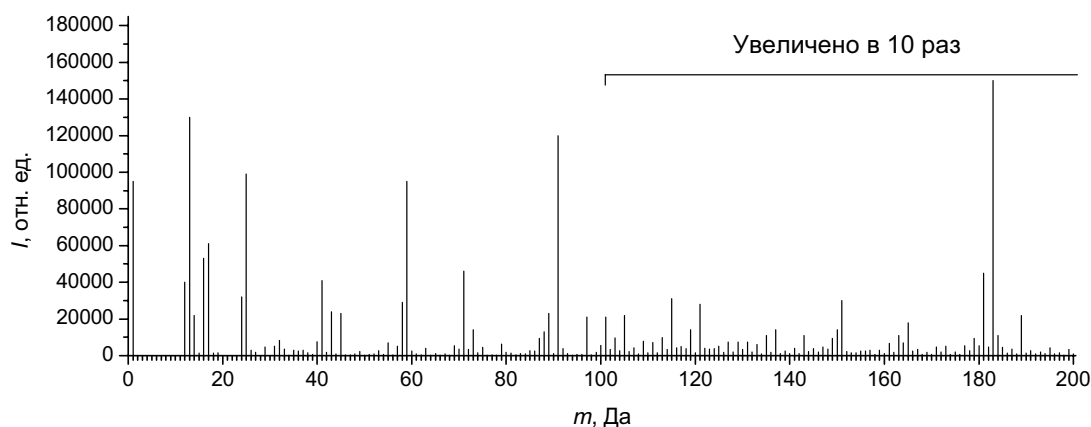


Рис. 2. Фрагмент масс-спектра отрицательных вторичных ионов для 100 мМ Na-фосфатного буфера. Интенсивность пика ионов H^- ($m = 1$ Да) уменьшена в 20 раз; пиков ионов O^- ($m = 16$ Да) и OH^- ($m = 17$ Да) – в 10 раз; интенсивности пиков ионов на участке масс 100–200 Да увеличены в 10 раз. Для проведения измерений с использованием метода МСВИ проба буфера помещалась в глицериновую матрицу в соотношении 1 : 5,6

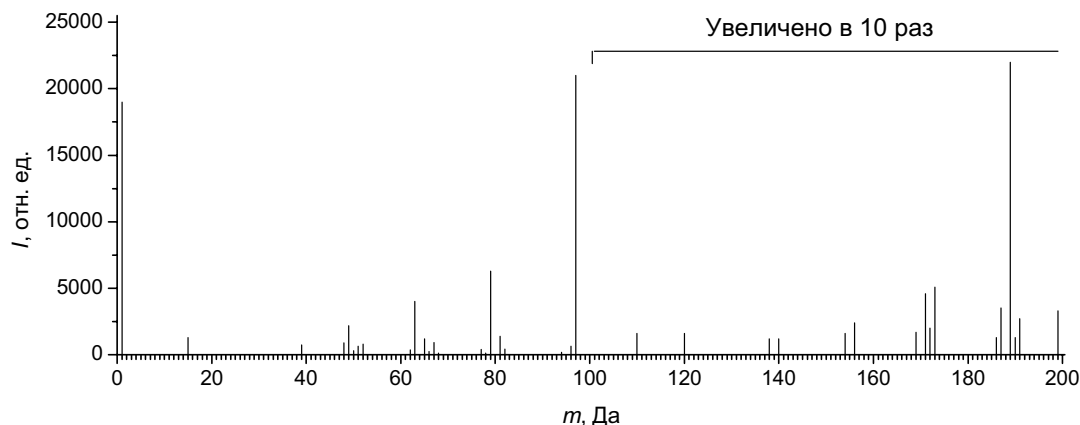


Рис. 3. Масс-спектр отрицательных характерных вторичных ионов для 100 мМ Na-фосфатного буфера (по результатам обработки фрагмента масс-спектра, приведенного на рис. 2, при $K_{Buf/Gl}^-(m_i) > 2$ и $I \geq 100$ отн. ед.). Интенсивность пика ионов H^- ($m = 1$ Да) уменьшена в 100 раз; интенсивности пиков ионов на участке масс 100–200 Да увеличены в 10 раз

Далее был исследован масс-спектр глюконовой кислоты в буфере. Молекулярный вес глюконовой кислоты равен 196,16 Да; структурная формула показана на рис. 4. Установлено, что характерными вторичными ионами для глюконовой кислоты, наиболее подходящими для определения ее в модельном растворе, являются вторичные ионы депротонированной молекулы кислоты $[(C_6H_{12}O_7) - H]^-$ ($m = 195$ Да) и $[(^{13}CC_5H_{12}O_7) - H]^-$ ($m = 196$ Да). Важным моментом здесь является то, что на участке масс $m = 195, 196$ Да вторичные ионы, характерные для буфера, отсутствуют (см. рис. 3).

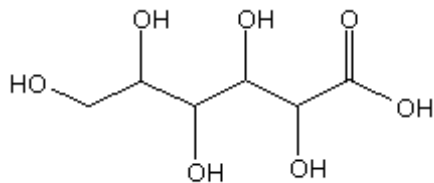


Рис. 4. Структурная формула глюконовой кислоты

Исследованы также масс-спектры отрицательных вторичных ионов для проб раствора глюкозы ($C = 300$ мМ) и раствора глюкозооксидазы ($T = 1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл) в 100 мМ Na-фосфатном буфере. В этих экспериментах наибольший интерес представляло нахождение характерных вторичных ионов для глюкозы и анализ масс-спектров на участке масс 195, 196 Да. В масс-спектре раствора глюкозы (фрагмент масс-спектра приведен на рис. 5) можно отметить только один достаточно интенсивный пик, связанный с глюкозой (рис. 6). Это пик ионов $[(C_6H_{12}O_6) - H]^-$ ($m = 179$ Да) – депротонированная молекула глюкозы. В масс-спектре раствора глюкозооксидазы регистрируется серия характерных вторичных ионов, основными из которых являются ионы CN^- ($m = 26$ Да) и CON^- ($m = 42$ Да). Интенсивности пиков ионов с массами 195 и 196 Да в масс-спектрах растворов глюкозы и глюкозооксидазы в буфере находятся на уровне их интенсивности в масс-спектре буфера.

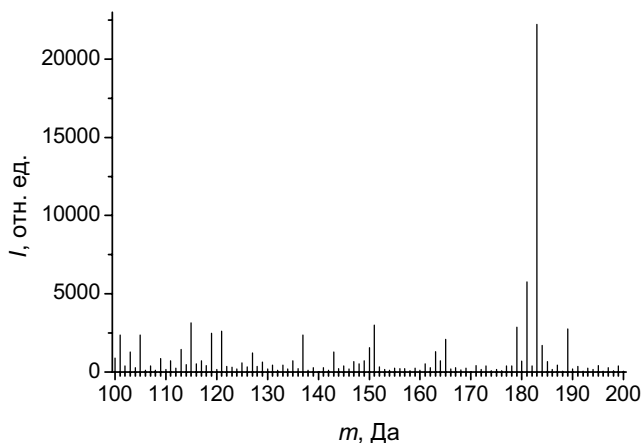


Рис. 5. Фрагмент масс-спектра отрицательных вторичных ионов раствора глюкозы в буфере (300 мМ). Проба раствора помещалась в глицериновую матрицу для МСВИ-анализа в соотношении 1 : 5,6

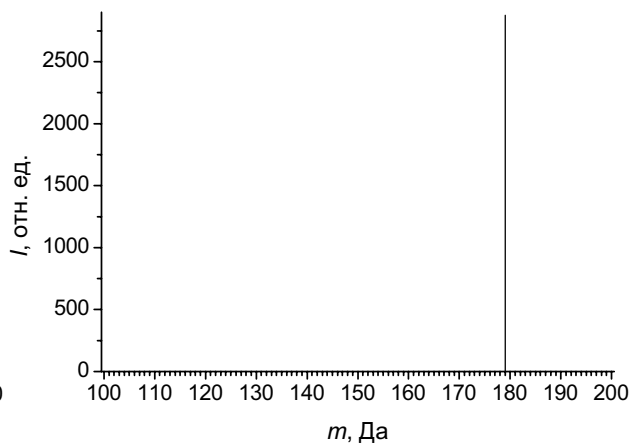


Рис. 6. Масс-спектр характерных вторичных ионов для глюкозы (по результатам обработки масс-спектра, приведенного на рис. 5)

Исследование взаимодействия компонентов в модельном растворе

Проведено исследование масс-спектра отрицательных вторичных ионов для раствора в глицерине (1 : 5,6) пробы модельной системы, содержащей одновременно глюкозооксидазу ($1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл) и глюкозу (300 мМ) в 100 мМ Na-фосфатном буфере. Модельный раствор создавался смешиванием буферных растворов глюкозооксидазы и глюкозы с концентрациями $3,72 \cdot 10^{-3}$ г/мл и 600 мМ соответственно в соотношении 1 : 1. Исходный 600 мМ раствор D-глюкозы получали растворением навески глюкозы в Na-фосфатном буфере и выдерживанием раствора при комнатной температуре в течение 24 ч для полной мутаротации D-глюкозы [13]. Выдержка модельного раствора после смешивания компонентов составляла 30 мин. Интенсивности наиболее интересных с точки зрения рассматриваемой задачи пиков вторичных ионов приведены в таблице. В таблице для сравнения приведены интенсивности этих же пиков для проб буфера и компонентов модельного раствора в буфере.

Таблица. Интенсивности пиков характерных отрицательных вторичных ионов в масс-спектре для модельного раствора и для растворов его отдельных компонентов в буфере

m , Да	I , отн. ед.					Интерпретация
	Буфер	ГО	Глюкоза	ГО+Глюкоза	ГО+Глюкоза*	
179	930	1000	2900	1600	2800	$[(C_6H_{12}O_6) - H]^-$
183	15000	33000	22000	21000	27000	$[(C_3H_8O_3)_2 - H]^-$
189	2200	3000	2700	2700	2700	$(C_3H_8O_3)H_2PO_4^-$
195	430	370	430	3400	400	$[(C_6H_{12}O_7) - H]^-$
196	80	100	60	280	100	$[(^{13}CC_5H_{12}O_7) - H]^-$

* Смешивание компонентов проводилось непосредственно в глицерине.

Видно, что в случае модельного раствора надежно регистрируется продукт реакции окисления глюкозы – глюконовая кислота ($m = 195, 196$ Да). Коэффициент превышения для пика ионов $[(C_6H_{12}O_7) - H]^-$ в сравнении с масс-спектром буферного раствора составляет $K_{ГК/Буф}^-(195) \approx 7,9$. Масс-спектр раствора глюкозы в буфере содержит характерный для глюкозы пик ионов $[(C_6H_{12}O_6) - H]^-$. Коэффициент превышения для этого пика по буферу $K_{Глюк/Буф}^-(179) \approx 3,1$. Вследствие протекания реакции окисления глюкозы ее концентрация в растворе уменьшается, что подтверждается уменьшением интенсивности пика ионов $[(C_6H_{12}O_6) - H]^-$ с 2900 отн. ед. (раствор глюкозы) до 1600 отн. ед. в модельном растворе (см. табл.).

Проведено выяснение влияния глицерина на протекание реакции в модельной системе. При этом смешивание буферных растворов компонентов проводилось непосредственно в глицерине: раствор глюкозооксидазы ($3,72 \cdot 10^{-3}$ г/мл) вводился в глицерин в объемном соотношении 1 : 11,2, затем к этой смеси добавлялся раствор глюкозы (600 мМ) объемом равным объему раствора глюкозооксидазы, чтобы в итоге получить соотношение проба-глицерин, равное 1 : 5,6. Полученная смесь выдерживалась при комнатной температуре в течение 60 мин., затем проводилось ее исследование с помощью метода МСВИ. Установлено, что интенсивности пиков ионов с $m = 195$ Да и $m = 196$ Да при анализе этого образца находятся на уровне фоновых пиков (см. табл.). Это позволяет заключить, что реакция окисления глюкозы в этих условиях не происходит. Этот важный факт позволил в дальнейшем фиксировать малые времена взаимодействия между компонентами в модельной системе растворением пробы модельного раствора в глицерине.

В дальнейшем проведено исследование серии модельных растворов при изменении некоторых параметров взаимодействия. На рис. 7, *а-в* приведены фрагменты записи масс-спектров ($m = 192-197$ Да) в некоторых из этих случаев. Рис. 7, *а, б* соответствуют концентрациям глюкозы 50 мМ и 100 мМ; рис. 7, *в* – концентрации глюкозы 50 мМ при ограничении доступа кислорода к раствору. Концентрация глюкозооксидазы во всех этих случаях составляла $1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл, выдержка модельного раствора до помещения пробы в глицерин – 60 мин.

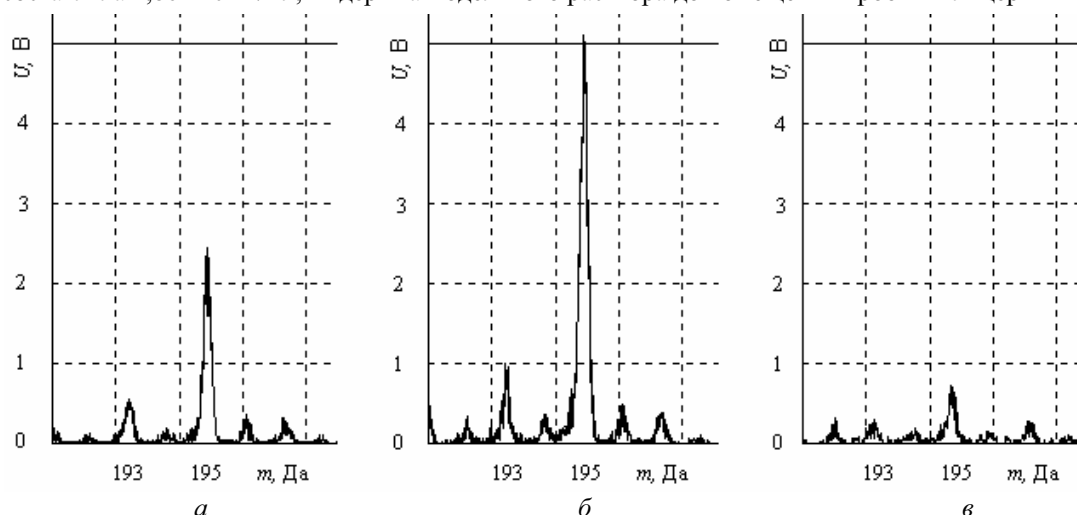


Рис. 7. Фрагменты записи масс-спектра вторичных ионов для модельного раствора при изменении некоторых параметров взаимодействия. Концентрация глюкозооксидазы в растворе $1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл, время выдержки раствора до помещения пробы в глицерин 60 мин. *а* – концентрация глюкозы 50 мМ; *б* – концентрация глюкозы 100 мМ; *в* – концентрация глюкозы 50 мМ, доступ кислорода к раствору ограничен

Видно, что в случае модельного раствора, результаты для которого приведены на рис. 7, *а, в* в растворе происходит окисление глюкозы с образованием глюконовой кислоты. Увеличение концентрации глюкозы в растворе в 2 раза (до 100 мМ) приводит к увеличению выхода глюконовой кислоты также примерно в 2 раза (см. рис. 7, *б*). Для протекания реакции окисления глюкозы в модельной системе по схеме (1) необходим кислород. Концентрация кислорода, растворенного в воде из воздуха, составляет менее 1 мМ [14]. Следовательно, окисление большого количества глюкозы в растворе может быть объяснено только поступлением кислорода в раствор во время реакции. Для проверки данного утверждения был проведен опыт с ограничением доступа кислорода к модельному раствору во время экспозиции, при этом раствор выдерживался не в открытой кювете, а в медицинском шприце с тонкой иглой. Результаты для этого случая приведены на рис. 7, *в*. Видно, что в условиях ограничения доступа кислорода к раствору во время реакции образовалось существенно меньше глюконовой кислоты (см. рис. 7, *а* и *в*), а значит, прореагировало значительно меньшее количество глюкозы.

ВЫВОДЫ

В работе показана возможность исследования процессов взаимодействия биоорганических объектов в водных или в буферных растворах с помощью метода МСВИ. Для проведения МСВИ-анализа предлагается использовать методику введения проб растворов в глицериновую матрицу.

Показана возможность применения данной методики для исследования взаимодействия компонентов в системе “глюкоза + глюкозооксидаза в Na-фосфатном буфере”, моделирующей взаимодействие между компонентами биосенсора на глюкозу. В результате окисления глюкозы, катализируемого глюкозооксидазой, в растворе образуется глюконовая кислота, которая надежно регистрируется по пикам отрицательных вторичных ионов $[(C_6H_{12}O_7)-H]^-$ ($m = 195$ Да) и $[(^{13}CC_5H_{12}O_7)-H]^-$ ($m = 196$ Да). Помещение модельного раствора в глицерин останавливает реакцию окисления глюкозы. В условиях свободного доступа кислорода воздуха к раствору реакция идет с окислением больших количеств глюкозы, значительно превышающих те, что могут быть окислены с использованием кислорода, растворенного в воде. Ограничение доступа воздуха к модельному раствору тормозит реакцию. Разработанные подходы к исследованию взаимодействия компонентов в системе “глюкоза + глюкозооксидаза в буфере” с помощью метода МСВИ являются основой для дальнейших исследований этой системы при изменении тех или иных ее параметров.

Подчеркнем, что предлагаемый способ исследования процессов в водных или буферных растворах сложных биоорганических систем с использованием масс-спектрометрии вторичных ионов является универсальным. Он позволяет анализировать протекание реакций в таких системах по поведению характерных вторичных ионов для компонентов системы, в том числе для продуктов реакции.

Работа выполнена при поддержке Научно-Технологического Центра Украины, проект № 2155.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Vo-Dinh T., Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2000. – V. 366. – P. 540–551.
2. Fraser D.M. Glucose biosensors - the sweet smell of success // *Medical Device Technology.* – 1994. – V. 5. – P. 44–47.
3. Rosenzweig Z., Kopelman R. Analytical properties and sensor size effects of a micrometer-sized optical fiber glucose biosensor // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – P. 1408–1413.
4. Wittmaack K. Secondary ion mass spectrometry as a means of surface analyzes // *Surf. Sci.* – 1979. – V. 89. – P. 668–700.
5. Черепин В.Т. Ионный зонд. – Киев: Наукова Думка, 1981. – 328 с.
6. Мельников В.Н. Вторичная ионная эмиссия и процессы на поверхности полупроводников группы $A^{III}B^V$ при воздействии молекулярных газов: Автореф. дисс. ... канд. физ.-мат. наук. – Харьков: Принтал, 1987. – 24 с.
7. Покровский В.А., Мосин В.В. Бомбардировка быстрыми атомами в масс-спектрометрии: метод и его применение // *Теор. и эксп. хим.* – 1987. – № 1. – С. 62–78.
8. Suizdak G. *Mass Spectrometry for Biotechnology.* – New York: Academic Press, 1996. – 161 p.
9. Benninghoven A. Surface investigation of solids by the Statical method of secondary ion mass-spectrometry (SIMS) // *Surf. Sci.* – 1973. – V. 35. – P. 427–457.
10. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstyk V.V. Concentration effects in secondary ion emission for solutions of organic dyes in glycerol // 4th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2004". – Münster, September 26-29, 2004. – P. 91.
11. Мельников В.Н., Литвинов В.А., Коппе В.Т., Бобков В.В., Товстяк В.В. Исследование глюкозооксидазы методом МСВИ с использованием глицериновой матрицы // *Взаимодействие ионов с поверхностью (ВИП-2005)*. Матер. XVII Междунар. конф. М.: Изд. МАИ, 2005. – Т. 1. – С. 411–414.
12. Мельников В.Н., Литвинов В.А., Коппе В.Т., Бобков В.В., Товстяк В.В. Исследование процессов, протекающих в глицериновых растворах органических красителей при МСВИ анализе // *Вісник ХНУ. Сер. фізична “Ядра, частинки, поля”.* – 2005. – № 657. – В.1 (26). – С. 63–68.
13. Давыдова М.Е., Курова В.С., Сухачева М.В., Куплетская М.Б., Рябов А.Д., Нетрусов А.И. Стабильность и каталитические свойства глюкозооксидазы из *Penicillium funiculosum G-15* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2002. – Т. 43. – № 6. – С. 366–370.
14. Кэй Дж., Лэби Т. Таблицы физических и химических постоянных. – М.: Физматгиз, 1962. – 248 с.

ON THE APPLICATION OF SIMS METHOD TO INVESTIGATION OF GLUCOSE BIOSENSOR COMPONENTS INTERACTION

V.N. Melnykov, V.A. Litvinov, V.T. Koppe, V.V. Bobkov, V.V. Tovstyk

Kharkov National University, Svobody sq. 4, Kharkov 61077

E-mail: plip@lin.com.ua

This work is dedicated to the issues of application of secondary ion mass-spectrometry with liquid matrix when studying interaction of components in aqueous (or buffer) solutions of complex bioorganic systems. For the purposes of analysis, the probes from the aqueous solutions of the systems under study are dissolved in glycerol matrix. The behavior of the secondary ions characteristic of the reaction products is then studied in the course of this analysis. Investigation of the system "glucose + glucose oxidase in Na-phosphate buffer" was carried out which serves as a model for interactions among glucose biosensor components. As a result of glucose oxydation catalyzed by glucose oxydase, gluconic acid (the reaction product) is formed in solution. Gluconic acid is reliably detected via peaks its deprotonated molecule in the mass-spectrum of the negative secondary ions. The effect of certain parameters of the system "glucose + glucose oxidase in Na-phosphate buffer" on gluconic acid production was studied.

KEY WORDS: secondary ion mass-spectrometry, glycerol matrix, glucose oxidase, gluconic acid, glucose biosensor.