

ЕЛЕКТРОХИМИЧЕН БИОСЕНЗОР ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА L-АСКОРБИНОВА КИСЕЛИНА (ВИТАМИН С)

Меги Качакова, Нина Димчева***

**Биологически факултет,
специалност „Биология и химия“, IV курс*

***Химически факултет, катедра „Физикохимия“
ПУ „Паисий Хилендарски“, гр. Пловдив, ул. „Цар Асен“ № 24*

РЕЗЮМЕ

Ензимът аскорбат оксидаза (АОх) – представител на семейството на поли-медните оксидази, е хемисорбиран върху златни наночастици, отложени чрез електрохимична редукция на хексахлороауратни йони върху повърхността на стъкловъглероден електрод. Полученият ензимен електрод е изследван с волтамперни и хроноамперометрични методи.

Полученият ензимен електрод е използван за електроаналитично определяне на витамин С, като за целта е определено оптималното рН на работната среда и областта от потенциали, в която биосензорът показва ниски нива на шума и висока чувствителност. Като оптимални условия за работа на електрохимичния биосензор са определени рН = 7,0 и потенциали 150 и 200 mV (vs. Ag / AgCl), като електродната чувствителност, определена при тези условия, е съответно 2,56 и 4,03 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$, а откриваемият минимум е 1,5 μM . С получения електрохимичен биосензор за аскорбинова киселина е определено съдържанието на витамин С в реални обекти: ампули с вит. С, лимон

сок и хранителна добавка. Резултатите от анализите са съпоставени с паралелно определяне концентрацията на аскорбинова киселина чрез йодометрично титруване на проби от същите реални обекти. Получените резултати показват над 90% съвпадение между двата метода.

Ключови думи: биосензор, златни наночастици, имобилизирана аскорбат оксидаза, биоелектрокатализа, витамин С

ВЪВЕДЕНИЕ

Аскорбат оксидазата е ензим от групата на поли-медните оксидази (MCOs), който катализира окислението на L-аскорбиновата киселина (L-AA, витамин С) до дехидроаскорбинова киселина (DHA) в присъствието на молекулярен кислород при едновременната му редукция до вода, съгласно уравнението [1]:



Ензимът е бил използван в различни видове биосензори от първо поколение за електроаналитично определяне на L-аскорбат [2 – 5], при което основен принцип на анализа е амперометричното проследяване на кислородната консумация с кислороден електрод (Кларков тип). Аналогично на други MCOs обаче, аскорбат оксидазата е способна на обмен на електрони с повърхността на електрода [6 – 11]. Първата публикация, описваща директен обмен на електрони между АОх и електродната повърхност, датира от 1996 г. [9]. Волтаметрични изследвания на АОх върху златен електрод, модифициран с различни промотори, разкриват редокс процеси, които авторите отнасят към окислително-редукционното превръщане на T1 медния център на ензима. Въпреки присъствието на три типа медни редокс центъра (T1, T2 и T3) в структурата на този ензим, в по-късните научни публикации има данни само за един редокс процес, свързан с T1 медния клъстер, наблюдаван при катодните и анодните потенциодинамични криви на АОх [7, 10].

Едва наскоро присъствието на трите ясно определени двойки на анодни и катодни пикове, свързани с T1 и триядрения меден център (T2, T3) на АОх, са били наблюдавани от Ивнитски [6] при волтаметрични изследвания върху въглероден електрод в аеробни и анаеробни условия. Методът на ензимното закрепване е от изключителна важност при създаването на 3-то поколение биосензорни устройства. В този

контекст ефективна комуникация между ензима и електрода е била постигната при включването на АОх в различни видове полимерни слоеве, покриващи повърхността на основния електрод [7, 10, 12] или при захващането на ензима върху повърхността на платинен дисков електрод в полимерен композит, съдържащ въглеродни нанотръбички (MWCNTs) [13], както и свързване на АОх с бифункционален реагент към повърхността на въглероден *screen-printed* електрод [7].

Литературният преглед върху електрохимичните изследвания с имобилизирана аскорбат оксидаза показва, че като правило електрохимичните биосензори за определяне на аскорбинова киселина се основават на измерване консумацията на кислород (биологична потребност от кислород) при ензимно-каталитичното окисление на субстрата. В редките случаи, в които е наблюдавана електрохимична активност на ензима, тя не е послужила като основа за разработване на електрохимичен биосензор за аскорбинова киселина, тъй като като правило ензимите от семейството на поли-медните оксидази проявяват много силен афинитет към кислорода и катализират неговата електроредукция до вода, което потиска активността на другия каталитичен център (Т1), отговорен за окислението на L-аскорбата.

В светлината на горекананото настоящата работа е посветена на изследване електрохимията на хемисорбираната АОх и охарактеризирана на биоелектрично-каталитичното окисление на L-аскорбат като основа за разработване на трето поколение биосензори за витамин С, чието практическо приложение беше илюстрирано с анализа на съдържанието на L-аскорбат във фармацевтични продукти и лимонов сок. В настоящата работа е предложен принципно нов подход за имобилизирането на аскорбат оксидазата, без аналог в достъпната специализирана литература: ензимът АОх беше хемисорбиран върху златни наночастици, отложени чрез електрохимична редукция на хексахлороауратни йони върху повърхността на стъкловъглероден електрод. При разработването на ензимните електроди бяха варирани в широки граници експерименталните условия както за отлагането на златните наноструктури, така и за закрепването на ензима, като за един определен тип приготвяне на ензимния електрод беше наблюдавана директна електрохимия на ензима. Като следствие от това беше разработен електроаналитичен метод за определяне на витамин С, който е много по-селективен от традиционния метод за анализа му – йодометричното титруване.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Материали

При разработване на настоящата работа са използвани следните реактиви и материали:

Аскорбат оксидаза (АОх) (Е.С. 1.10.3.3) от Cucurbita Sp. (Sigma-Aldrich) с хомогенна активност $215,66 \text{ U mg}^{-1}$ (1 U окислява $1,0 \mu\text{mol}$ от L-аскорбата до дехидроаскорбат за 1 минута при pH 5,6 и 25°C).

L-аскорбинова киселина (Fluka), Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich); $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Acros) със спецификации „чза“.

Концентрацията на L-аскорбинова киселина се определя с ензимни електроди в реални обекти: ампули витамин С, съдържащи 100 mg mL^{-1} L-аскорбат, произведени от Натурфарма, България; хранителна добавка Resveratrol С, произведена от „Голд Таймс“ ООД, и сок от лимон.

Работният електрод е диск от стъкловъглерод (диаметър = $1,0 \text{ mm}$, Metrohm, България, видима повърхност от ок. $0,8 \text{ mm}^2$).

Буферните разтвори ($0,1 \text{ M}$) бяха направени от натриеви фосфати (едноосновен и двуосновен), разтворени в двойно дестилирана вода с pH 5,6 и 7,0, контролирани с pH метър pH 211 (Hanna Instruments, USA).

Останалите реактиви бяха с чистота над 98% или със спецификация „спектрално чисти“ и не бяха подлагани на допълнителна обработка преди употреба.

Методи

Всички измервания бяха провеждани в стандартна, триелектродна стъклена клетка с неразделени електродни пространства и работен обем $10 - 20 \text{ cm}^3$, сравнителен електрод – Ag / AgCl, 3M KCl, използван като сравнителен електрод, стъкловъглероден работен електрод и платинена жица, използвана като спомагателен електрод, свързани към електрохимична работна станция Palm Sens с компютърен контрол и PS Trace 2.13 софтуер (Palm Instruments, Нидерландия).

В серия от предварителни експерименти върху повърхността на стъкловъглеродния електрод бяха отложени златни наночастици с размери на Au-структури до 200 nm чрез електрохимични (потенциостатични или потенциодинамични) методи, последвано от адсорбция на ензима в продължение на един час при стайна температура.

Преди употреба работният електрод се почиства механично чрез полиране върху алуминиева паста, последвано от трикратно промиване в дестилирана вода с ултразвук. Преди ензимната имобилизация

Au модифицираният електрод се почиства електрохимично в 0,5 M H_2SO_4 с метода циклична волтаперометрия (CV, скорост на сканиране $0,1 V s^{-1}$) в интервала от потенциали от 0 до 1,7 V (спрямо Ag / AgCl, 3 M калиев хлорид) за най-малко 20 цикъла, след това внимателно се изплаква с двойно дестилирана вода. Адсорбцията на АОх се извършва при статични условия чрез потапяне на модифицирани електроди в разтвори, съдържащи 2 или 5 $mg mL^{-1}$ АОх разтвор в 0,1 M буфер на натриев фосфат, с pH = 5,6. След приключване на хемисорбцията несвързаният ензим се отделя от повърхността чрез на кисване на електрода в буфер с pH 5,6 в продължение на около $\frac{1}{2}$ час, при стайна температура и след това се изплаква с вода. Така полученият енизимен електрод се съхранява в 0,1 M натриев фосфатен буфер с pH = 5,6 в хладилник при температура $4^\circ C$ до следващите измервания.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

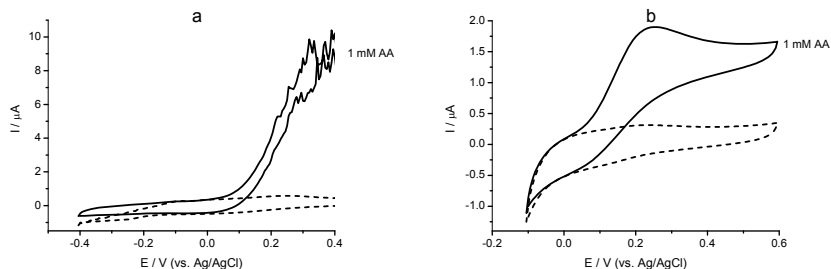
Електрохимична активност на имобилизирания ензим

Ензимните електроди, получени при имобилизиране на ензима АОх върху златни наночастици, отложени по електрохимичен път върху стъкловъглерод, бяха изследвани за електрохимична активност на ензима с помощта на метода квадратно вълнова волтаперометрия, като само един тип електрод показва такава – този, при който Au наночастици бяха отлагани при потенциал, изменящ се линейно с времето в диапазона от $-0,6$ до $0 V$. Чрез промяната на продължителността на процеса адсорбция и понижаване на температурата до $4^\circ C$ бяха установени оптималните условия за ензимна имобилизация.

Наблюдавахме поява на каталитична вълна в присъствието на ензимен субстрат върху цикличните волтаперни криви, което показва, че имобилизираният ензим е електрохимично и биокаталитично активен. Такова косвено доказателство за наличието на биоелектрокатализата е показана на Фиг. 1, изобразяваща циклична волтаперограма на ензимния електрод в отсъствието и в присъствието на L-аскорбинова киселина, при анаеробни условия (Фиг. 1a) и аеробни (Фиг. 1б) условия.

Както може да се види от цикличната волтаперограма на биоелектрокаталитичното окисление на L-аскорбат започва над $0 V$ и достига своя максимум при потенциал $240 mV$. При същия потенциал се наблюдава пик на окислително превръщане на T1 медния център на ензима в отсъствието на неговия субстрат. Токът достигнат при посочения по-

тенциал в отсъствие на кислород, е 3,5 пъти по-висок в сравнение с неговата стойност в присъствието на кислород, но е съпроводен с много голям шум. Поради тази причина за аналитични цели би следвало да се предпочитат аеробните условия за определяне на L-аскорбат, независимо от по-ниския електроден сигнал.



Фигура 1. Циклична волтамперограма на АОx/Au/GC електрода в 0,1 М фосфатен буфер рН = 5,6 (пунктирна линия) и в присъствие на 1 mM L-аскорбат (плътна линия): а) в деаериран с Ar буфер; б) при аеробни условия, 25°C; $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$; сравнителен електрод Ag / AgCl, 3M KCl

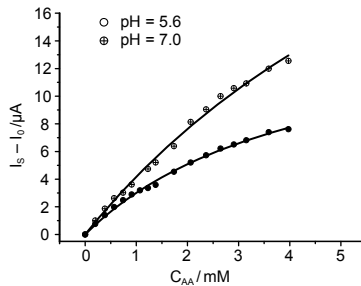
Амперометричен биосензор за L-аскорбат

Ензимният електрод беше тестван при количествено определяне на L-аскорбинова киселина (витамин С). Сред факторите, които влияят на ензима, като най-съществени следва да се отбележат: температура, рН на средата и работният потенциал.

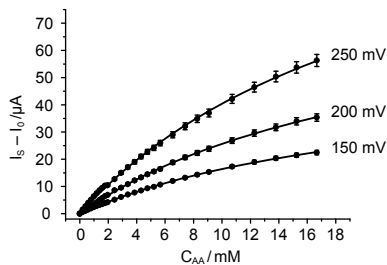
Амперометричните измервания с ензимния електрод бяха провеждани при постоянен потенциал при добавяне на аликвотни части от изходния разтвор на L-аскорбат. Беше установено, че рН на електролита (0,1 М фосфатен буферен разтвор), в който са извършени амперометричните измервания, значително влияе на електродния отклик. Независимо от факта, че окислително-редукционните пикове на имобилизираната АОx са по-ясно изразени при рН = 5,6, амперометричните измервания свидетелстват, че електродният отклик, регистриран в буфер с рН = 7,0, е $\approx 1,7$ пъти по-висок от този, получен в буфер с оптимално за ензима рН (Фиг. 2.).

Влиянието на работния потенциал на ензимния електрод беше изследван при рН = 7,0. При увеличаване на работния потенциал, токът при една постоянна концентрация на субстрата се увеличава значително

(Фиг. 3). При всички изследвани потенциали калибровъчните криви имат нелинеен ход с начална линейна област до концентрация на L-аскорбата 4,8 mM. Анализът на експерименталните данни показва, че те могат да бъдат описани от хиперболична крива, което подсказва, че ензимната кинетика се подчинява на механизма на Михаелис-Ментен. Електродната чувствителност значително се повишава с увеличаване на работния потенциал, докато константата на Михаелис остава непроменена в изучавания интервал от работни потенциали (Табл. 1). При прилагането на потенциал над 250 mV обаче нивото на шума силно се увеличава, като това пречи на прецизното определяне на електродния отклик.



Фигура 2. Отклик на ензимният електрод като функция от концентрацията на аскорбинова киселина при приложен потенциал 200 mV (спрямо Ag / AgCl, 3M KCl), 0,1 M натриев фосфатен буфер, pH 7,0 (празни кръгчета) и pH = 5,6 (пълни кръгчета); температура 25°C; 460 оборота в минута



Фигура 3. Сигнал на ензимния електрод като функция от концентрацията на аскорбинова киселина при работни потенциали 150, 200 и 250 mV, скорост на разбъркване: 460 оборота в минута; електролит: 0,1 M натриев фосфатен буфер, pH = 7,0; температура 25°C; RSD 3,9%

Таблица 1. Операционни параметри на аскорбатоксидазен ензимен електрод, диапазон на работния потенциал 150 – 250 mV (спрямо Ag / AgCl); фонов електролит 0,1 M фосфатен буфер, рН = 7,0; температура 25°C

Потенциал, mV	Чувствителност*, $\mu\text{A mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$	r^2	Линейна динамична област, mM	K_M^{app} , mM
150	2,56	0,993	4,8	22,39 \pm 3,7
200	4,03	0,989	4,8	22,59 \pm 4,6
250	6,35	0,978	4,8	23,39 \pm 9,1

* Електродната чувствителност се определя като наклона на линейната част на калибровъчната графика, разделена на геометричната площ на електрода.

При дадените експериментални условия (рН = 7,0; 200 mV) беше направена оценка на възпроизводимостта на сигнала – при 10 последователни измервания в присъствието на 100 μM или 2,8 mM аскорбинова киселина електродният отклик даде RSD от 3,9%. Границата на откриване (откриваем минимум) за посочените експериментални условия беше установена на 1,5 μM (при съотношение сигнал / шум 3 : 1).

В сравнение с други амперометрични биосензори за аскорбинова киселина описаният в настоящата работа предлага редица предимства. Аналитичната система се характеризира с относително бързо и лесно приготвяне, нисък работен потенциал, бърза реакция, широка динамична област и нисък откриваем минимум. Чувствителността на определянето (2,56 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$ при 150 mV) е значително предимство, тъй като тя е повече от 10 пъти по-висока от тази, постигната от Liu и др. с помощта на два вида електроди с комплексна архитектура със сандвичев тип структура [13, 14], показали чувствителност от 23,95 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ и 28,5 $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ съответно, постигната при много по-висок работен потенциал (400 mV спрямо НКЕ).

За да покажем приложимостта на разработения биосензорен метод за анализ на L-аскорбат, с ензимния електрод беше определяна концентрацията на L-аскорбинова киселина във фармацевтичен продукт (ампули вит. С), хранителна добавка и сок от прясно изцеден лимон. Както може да се види от Таблица 2, съдържанието на витамин С, определяно с ензимния електрод, показва много добър аналитичен добив: стойността му се изменя между 95 и 102%. С увеличаване обема на пробата отклонението на концентрацията на вит. С от определената чрез йодо-

метрично титруване намалява от +2% до –5%, най-вероятно поради натрупване на обемна грешка. По-значително отклонение между измерената с биосензора концентрация на витамин С и определената йодометрично се наблюдава при определянето му в по-сложни реални обекти – сок от лимон и хранителна добавка, което най-вероятно се дължи на пречещо влияние на някой от компонентите на реалните проби.

Таблица 2. Резултати от анализираното съдържание на витамин С в реални обекти с ензимен електрод; потенциал 200 mV (спрямо Ag / AgCl, 3M KCl); електролит 0,1 M буфер, рН = 7,0; температура 25°C

Обем на пробата, µl	Концентрация на L-АА в пробата (след разреждане)	Концентрация на L-АА, определена с биосензора	Аналитичен добив*, %
Ампули витамин С			
20	1,25 mM	1,27 mM	102
40	2,49 mM	2,43 mM	98
60	3,73 mM	3,55 mM	95
Лимонов сок			
100	37,00 µM	33,32 µM	90
200	60,21 µM	54,20 µM	90
Хранителна добавка			
50	199,56 µM	187,70 µM	94
100	351,15 µM	333,61 µM	95

* Аналитичният добив (в %) се определя от съотношението на концентрацията на L-аскорбиновата киселина, анализирана с биосензора и чрез йодометрично титруване (преизчислена след разреждането на пробата).

СТАБИЛНОСТ НА ЕНЗИМНИЯ ЕЛЕКТРОД

Стабилността при съхранение на ензимния електрод (съхраняван повече от 8 месеца при оптимално рН = 5,6 в хладилник при 4°C) беше проследена чрез редовни измервания на активността му при 200 mV в присъствието на 2,8 mM аскорбинова киселина. Токовият сигнал на прясно приготвен ензимен електрод остава практически непроменен в течение на 8 часа работа. Остатъчната активност на четвъртия ден от неговото приготвяне е 95% от първоначалният отклик. След това тя постепенно намалява и след 35-дневно съхранение достига до около 63% от първоначално регистрираната активност, като остава на същото ниво през следващите 7 месеца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описаният в настоящата работа амперометричен биосензор за аскорбинова киселина притежава редица предимства: аналитичната система се характеризира с относително бързо и лесно приготвяне, нисък работен потенциал, бърза реакция, широка линейна динамична област и нисък откриваем минимум. Чувствителността на определянето ($2,56 \mu\text{A mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$ при 150mV) е значително предимство, тъй като тя е повече от 10 пъти по-висока от тази, постигната от Liu и др. с помощта на два вида електроди с комплексна архитектура, тип сандвич [13, 14], с чувствителност $23,95 \text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ и $28,5 \text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ съответно, постигната при много по-висок работен потенциал (400mV спрямо НКЕ).

Ензимът показва активност при биоелектрокаталитична редукция на кислород или окисляване на L-аскорбат, като последното е по-ефективно при анаеробни условия.

Възможността за продължително съхранение на разработения биосензор е тествана в продължение на 8 месеца, като през първите 35 дни се наблюдава постепенното спадане на активността до 63% от първоначалната, след което това ниво се задържа през следващите 7 месеца. Подобрената стабилност и добрите аналитични показания на биосензора предлагат нови перспективи за прилагането му при мониторинг в реално време на съдържанието на витамин С (неокислен) в различни фармацевтични продукти и храни.

Авторите изказват благодарност на фонд „Научни изследвания“ към МОН (тема ДВУ-02/38) за финансовата подкрепа при настоящите изследвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Bento, L. O. Martins, G. Gato Lopes, M. Armenia Carrondo and P. F. Lindley, *Dalton Transactions*, 3507 (2005).
2. E. Akyilmaz and E. Dinçkaya, *Talanta*, **50**, 87 (1999).
3. N. Chauhan, T. Dahiya, Priyanka and C. S. Pundir, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **67**, 66 (2010).
4. N. Chauhan, J. Narang and C. S. Pundir, *Analyst*, **136**, 1938 (2011).
5. N. Tomita, A. Manzoli, F. L. Fertonani and H. Yamanaka, *Eclética Química*, **30**, 37 (2005).

6. D. M. Ivnitski, C. Khripin, H. R. Luckarift, G. R. Johnson and P. Atanassov, *Electrochimica Acta*, **55**, 7385 (2010).
7. K. Murata, N. Nakamura and H. Ohno, *Electroanalysis*, **19**, 530 (2007).
8. B. Patil, S. Fujikawa, T. Okajima and T. Ohsaka, Enzymatic Direct Electron Transfer at Ascorbate Oxidase-modified Gold Electrode Prepared by One-step Galvanostatic Method, in *Int. J. Electrochem. Sci.*, p. 5012 (2012).
9. T. Sakurai, *Chemistry Letters*, **25**, 481 (1996).
10. R. Santucci, T. Ferri, L. Morpurgo, I. Savini and L. Avigliano, *Biochem. J.*, **332**, 611 (1998).
11. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker and L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 2517 (2005).
12. H. Wang and S. Mu, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **436**, 43 (1997).
13. M. Liu, Y. Wen, J. Xu, H. He, D. Li, R. Yue and G. Liu, *Analytical Sciences*, **27**, 477 (2011).
14. M. Liu, Y. Wen, D. Li, R. Yue, J. Xu and H. He, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **159**, 277 (2011).