

МОДИФИЦИРАНИ ГРАФИТОВИ ЕЛЕКТРОДИ – БАЗА ЗА РАЗРАБОТВАНЕ НА СЕЛЕКТИВНИ ГЛЮКОЗНИ БИОСЕНЗОРИ

Т. Додевска^{1}, Е. Хорозова², Н. Димчева²*

¹Кат. Неорганична химия и физикохимия, УХТ, Пловдив

²Кат. Физикохимия, ПУ „Паисий Хилендарски”

ABSTRACT

Electrocatalytic reduction of H_2O_2 on graphite electrodes modified with microdepositions of Pt and Pd (composed of two different mixture ratios of Pt to Pd: 10% : 90% and 30% : 70%) was characterized. Applicability of the two modified graphite materials as basic transducers for the development of glucose biosensors was demonstrated. The comparison of the operational parameters of both types of glucose biosensors suggests improved sensitivity and superior selectivity of the biosensor based on graphite modified with 30% Pt : 70% Pd.

Ключови думи: модифицирани графити, електроредукция, биосензор, глюкоза, глутатион, пикочна киселина, аскорбинова киселина.

ВЪВЕДЕНИЕ

Основен проблем при разработването на електрохимичните биосензори е реализирането на работна система, при която се свежда до минимум или се елиминира електрохимичното превръщане на органичните съединения, съпътстващи определяемия субстрат във физиологичните течности. При количественото определяне на глюкоза към пречещите агенти се отнасят аскорбинова, пикочна киселина, глутатион и др. Пътищата за повишаване селективността на аналитичното определяне чрез ензимни електроди принципно се свеждат до: съимобилизация с пероксидаза [1-5], използване на медиатори за оптимизиране на електронния обмен [6-8] или имобилизиране на ензими в полимерни филми на полиелектролити [9], което обаче значително усложнява електрохимичната система. Модифицирането на електродната повърхност с хексацианоферати [10-12] е нов подход за реализиране на електроредукция на H_2O_2 , но приложим само в работна среда с $pH < 7$.

Целта на настоящата работа е да бъде изследвана каталитичната активност на графитови електроди, модифицирани с микроотложения от Pd + Pt в съотношения съответно Pd+Pt 90:10% и Pd+Pt 70:30% в процеса на електроредукция на водороден пероксид. На базата на получените индикаторни пероксидни електроди да бъдат създадени селективни глюкозооксидазни ензимни електроди и да бъдат охарактеризирани по отношение на основните работни параметри при количествено определяне на глюкоза.

МАТЕРИАЛИ И АПАРАТУРА

Glucose oxidase (GOD) (E.C. 1.1.3.4.) – от *Aspergillus niger* (Fluka Biochemica) с активност 50 U.mg^{-1} , върху Pd:Pt (70:30)/СГМЗ беше имобилизирана GOD 198 U.mg^{-1} ; β -D- glucose (Valerus, Bulgaria); H_2O_2 , пикочна киселина, L-аскорбинова киселина, лимонена киселина, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ от Fluka; желатин (Chimtek-Благоевград). Всички водни и буферни разтвори бяха приготвени с бидестилирана вода. Като базови електроди бяха използвани графити от типа “ГМЗ” (структурни характеристики: $S=0.8 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; $\rho=1.56 \div 1.7 \text{ g.cm}^{-3}$; порьозитет 20-25%), модифицирани с микроколичества Pd и Pt. Отлагането на каталитичноактивните компоненти (Pd+Pt) върху въглеродния материал беше извършено електрохимично в потенциостатичен режим ($E_{\text{отлож}}=0.05 \text{ V}$ (спрямо обратим водороден електрод)) чрез кратковременна ($10''$) електролиза от следния електролит: 2% $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 3N H_2SO_4 + 2% PdCl_2 в 0.1N HCl в съотношение Pd:Pt 90:10% и Pd:Pt 70:30%. Получените модифицирани електроди Pd:Pt (90:10)/СГМЗ $10''$ и Pd:Pt (70:30)/СГМЗ $10''$ непосредствено преди ензимната имобилизация се подлагат на катодно-анодно циклиране в потенциалната област от -0.6 V до 0.2 V (Ag/AgCl) 30 min с последващо поляризиране при 1.5 V (Ag/AgCl) за 2 min (ФЦБ, pH=7). Електрохимично активираните базови електроди се поставят в разтвор на GOD (50 mg/ml във ФЦБ с pH=7) за 1 час. След приключване на адсорбцията, ензимните електроди се оставят на въздуха в продължение на 30 min и върху работната повърхност се нанася защитно покритие от 5% разтвор на желатин във ФЦБ, pH=7, съдържащ GOD (25 mg/ml). Изсушаването на защитния слой става в ток от Ag.

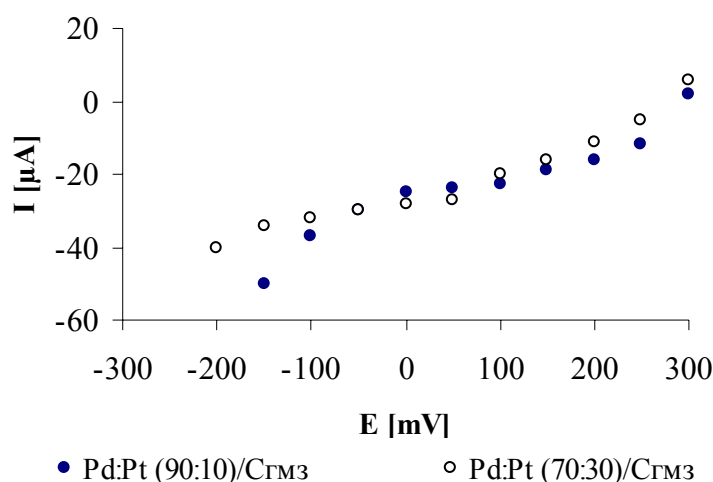
При електрохимичните изследвания беше използвана триелектродна клетка с разделени електродни пространства, сравнителен електрод – Ag/AgCl, противоелектрод-Pt-проводник. Електрохимичната система включва следните апаратни модули: бипотенциостат BiPAD (Tacussel, Villeurbanue, France); генератор EG-20 (Elpon, Lubawa, Poland); термостат УН (VEB MLW Prufgerate Werk, Medingen, Frietal, Germany).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Модифицирани графитови електроди като катализатори за електроредукция на водороден пероксид

Модифицираните с микроколичества от Pd+Pt в съотношения 90%:10% и 70%:30% графитови електроди бяха изследвани по метода на поляризационните

криви в интервал от -200 до 300 mV (Ag/AgCl) (фиг.1). В изследваната област от потенциали и за двата електрода се наблюдават катодни токове на електроредукция на H_2O_2 . На двете поляризационни криви се очертават потенциални области с почти пределни стойности на тока, които са в зависимост от природата на каталитично-активния компонент върху графитовата матрица. За електрода Pd:Pt (90:10)/Сгмз областта с гранични стойности на катодния ток е от 0 до 100 mV, докато за Pd:Pt (70:30)/Сгмз се наблюдава уширение и изместване на този диапазон в катодна страна – от -150 до 50 mV.



Фигура 1. Поляризационни криви на модифицирани графитови електроди в присъствие на $10^{-4}M H_2O_2$; ФЦБ, pH=7; 20^0C ; сравнителен електрод Ag/AgCl

Амперометричният сигнал на модифицираните графитови електроди като функция от концентрацията на H_2O_2 беше изследван в потенциалните области както следва: от 0 до 100 mV за Pd:Pt (90:10)/Сгмз и от -50 до 50 mV за Pd:Pt (70:30)/Сгмз. Чувствителността (dI/dC) и областта на линейна концентрационна зависимост на сигнала на модифицираните електроди, определени за съответните потенциали на поляризация, са представени в табл.1. И при двата електрода чувствителността нараства с изместване на приложения потенциал в катодна страна. При Pd:Pt (90:10)/Сгмз границата на линейност на сигнала не зависи от приложения потенциал, докато при Pd:Pt (70:30)/Сгмз областта на линейност на електродния сигнал е двукратно по-голяма и нараства с изместване на потенциала на поляризация в анодна страна. От представените данни е видно, че най-висока чувствителност $dI/dC= 0.816 \pm 0.02 \mu A.\mu M^{-1}$ при електроредукция на H_2O_2 проявява Pd:Pt (70:30)/Сгмз при $E=-50$ mV.

Таблица 1. Операционни характеристики на модифицирани графитови електроди при електрохимична редукция на H_2O_2 ; ФЦБ, рН=7; 20⁰С; сравнителен електрод Ag/AgCl

потенциал [mV]	чувствителност dI/dC [$\mu A \cdot \mu M^{-1}$]		линейна област [μM]	
	Pd:Pt (90:10)/C _{ГМЗ}	Pd:Pt (70:30)/C _{ГМЗ}	Pd:Pt (90:10)/C _{ГМЗ}	Pd:Pt (70:30)/C _{ГМЗ}
-50	---	0.816	---	600
0	0.616	0.582	300	650
50	0.599	0.535	300	700
100	0.593	---	300	---

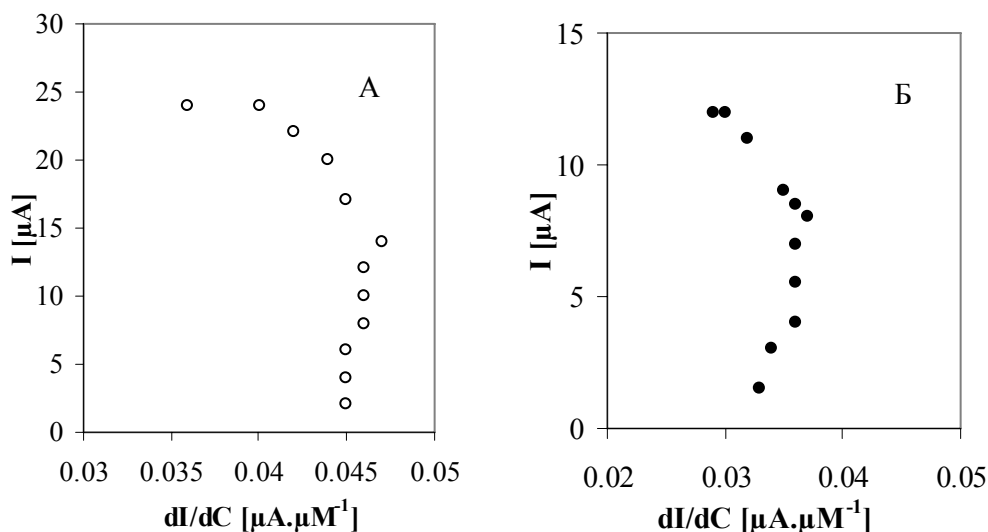
Като оптимален работен потенциал за Pd:Pt (90:10)/C_{ГМЗ} беше определен E=0 mV, при който електродната чувствителност е $dI/dC = 0.616 \pm 0.02 \mu A \cdot \mu M^{-1}$. При сравнение на функционалните характеристики на двата индикаторни електрода се констатира 1.3 пъти по-висока чувствителност и двойно по-дълга област на линейност на сигнала при Pd:Pt (70:30)/C_{ГМЗ}.

Операционни характеристики на ензимни глюкозооксидазни електроди

По описаната процедура за имобилизация на GOD на базата на изследваните пероксидни модифицирани графитови електроди бяха получени глюкозооксидазни ензимни електроди. На същите беше изследвана температурната зависимост на основните им функционални характеристики в интервала от 15 до 30⁰С при избраните работни потенциали (табл. 2). На фиг. 2 са представени експерименталните данни за двата ензимни електрода в координати на Eadie-Hofstee (стационарният ток като функция от електродната чувствителност) за 20⁰С. Показано е наличието на три ясно обособени участъка. При ниски субстратни концентрации чувствителността на електродите остава практически постоянна. Този вертикален участък вероятно се дължи на дифузионни ограничения върху процесите в електрохимичната система. В диапазона от концентрации на глюкоза от 380 до 600 μM за Pd:Pt (70:30)/C_{ГМЗ} и съответно от 220 до 300 μM за Pd:Pt (90:10)/C_{ГМЗ} се установява наклонен участък, указващ ензимно-кинетичен контрол. От експерименталните данни за този концентрационен интервал чрез регресионен анализ беше изчислена привидната Михаелисова константа K_m^{app} . За високи субстратни концентрации $C_{гг.} > 600 \mu M$ за Pd:Pt (70:30)/C_{ГМЗ} и $C_{гг.} > 300 \mu M$ за Pd:Pt (90:10)/C_{ГМЗ} в Eadie-Hofstee координати се обособява хоризонтална област, която се обяснява с ефекта на субстратно блокиране на имобилизирания ензим (ток на насищане). Откриваемият минимум на анализа и за двата електрода е 10 μM .

При изследване поведението на ензимните електроди при 15⁰С беше установено, че липсват обособени дифузионно- и кинетично лимитирани области. Отчитайки факта, че при тези работни условия концентрацията на O₂ (втори субстрат при ензимно-катализиран процес) е висока и по всяка вероятност защитната желатинова мембрана е най-слабо еластична, предполагаем че процесът е силно комплициран, поради което не може ясно да

се диференцират етапите му. Това е причината да не може да се дефинира стойността на K_m^{app} за тази температура.



Фигура 2. Зависимост на сигнала на ензимните електроди в Eadie - Hofstee координати; ФЦБ, рН=7; 20⁰С; сравнителен електрод Ag/AgCl
 А –Pd:Pt (70:30)/С2мз Б –Pd:Pt (90:10)/С2мз
 E= -50 mV E= 0 mV

При температура на работната среда 25⁰С беше констатирано рязко повишаване на електродната чувствителност и при двата ензимни електрода. Наблюдават се отново три етапа в работния режим - дифузионен, ензимно-кинетичен и субстратно блокиране. Нарастването на чувствителността обаче е за сметка на скъсяване на областта на стриктна линейна зависимост на сигнала от концентрацията на глюкоза (до 260 μM) при Pd:Pt (70:30)/Сгмз.

Най-висока електродна чувствителност при аналогичен режим на работа на електродите беше регистрирана при температура 30⁰С. Спазена е закономерността както при 20 и 25⁰С линейната област да бъде ½ от стойността на привидната Михаелисова константа.

Таблица 2. Операционни параметри на глюкозооксидазни ензимни електроди; ФЦБ, рН=7

температура [°C]	чувствителност dI/dC [μA·μM ⁻¹]		r ²		линейна област [μM]		K _m ^{app} [μM]	
	електрод А	електрод Б	електрод А	електрод Б	електрод А	електрод Б	електрод А	електрод Б
15	0.034	0.029	0.982	0.97	360	300	---	---
20	0.045	0.033	0.989	0.989	550	300	1270	580
25	0.109	0.044	0.974	0.988	260	300	450	550
30	0.123	0.049	0.981	0.993	260	300	500	550

Ензимен електрод А – базиран на Pd:Pt (70:30)/С2мз; E=-50 mV

Ензимен електрод Б – базиран на Pd:Pt (90:10)/С2мз; E=0 mV

Електроден отговор в присъствие на съпътстващи субстрати

Върху сигнала на ензимните електроди беше изследвано влиянието на съпътстващи субстрати като пикочна, аскорбинова киселина и глутатион, които нормално присъстват в биологичните проби. За ензимния електрод, базиран на Pd:Pt (70:30)/Сгмз, при установените работни условия $E = -50 \text{ mV}$ и $\text{pH} = 7.0$, беше констатирано, че тези субстрати не търпят електрохимично превръщане – в присъствието им в концентрации до $200 \text{ }\mu\text{M}$ не беше регистриран електроден отговор. Ензимният електрод създаден на базата на Pd:Pt (90:10)/Сгмз при оптимален работен потенциал 0 mV показва завишаване на амперометричния сигнал в присъствие на пикочна и аскорбинова киселина в концентрации над $40 \text{ }\mu\text{M}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Използването на индикаторен пероксиден модифициран графитов електрод Pd:Pt (70:30)/Сгмз като базов за създаването на ензимен глюкозооксидазен електрод предоставя възможност за работа при потенциал напълно елиминиращ пречещото влияние на съпътстващите субстрати. Реализираната 2.5 пъти по-висока електродна чувствителност при него в сравнение с този, базиран на Pd:Pt (90:10)/Сгмз (данни за 30°C), е резултат от синергичния ефект на два фактора – от една страна по-високата активност на базисния електрод (1.3 пъти повишаване на електродната чувствителност спрямо H_2O_2) и от друга - по-високата активност на използваната GOD. Този ензимен електрод показва и двукратно по-бърз отклик – времето за отговор не надвишаваше 1 min.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu J, Wang J (2001) Food technol biotechnol 39 : 55
2. Lindgren A, Ruzgas T, Gorton L (2001) Curr Top Anal Chem 2: 71
3. Nissum M, Schodt C, Welinder K (2001) Biochim Biophys Acta 1545: 339
4. Cosnier S, Lambert F, Stoycheva M (2000) Electroanalysis 12: 356
5. Gamburgzev S, Atanasov P, Ghingilis A, Wilkins E, Kaisheva A, Iliev I (1997) Sensors and Actuators B-Chemical 43: 70
6. Centonze D, Losito I, Malitesta C (1997) Electroanal Chem 435: 103
7. Богдановская В, Ефремов Б, Кузнецова Л (1997) Электрохимия 33: 459
8. Kulys J, Palaima A, Urbelis G (1998) Anal. Lett. 31: 569
9. Chaniotakis N.A. (2004) Anal Bioanal Chem 378: 89
10. Karyakin A, Karyakina E, Gorton L (2000) Anal Chem 72: 1720
11. De Luca S, Florescu M, Ghica ME, Lupu A, Palleschi G, Brett CMA, Compagnone D (2005) Talanta 68: 171
12. Puganova EA, Karyakin AA (2005) Sens Actuat B 109: 167