

Élelmiszerminták mérésére alkalmas aszorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben

Developing of Ascorbic Acid Biosensor in FIA (flow injection analysis) System Suitable for the Analysis of Food Samples

VÍG Attila¹, IGLÓI Attila¹, ADÁNYI Nóra², BÓKA Beáta¹, CSUTORÁS Csaba¹, KISS Attila¹

¹EGERFOOD Regionális Tudásközpont, Eszterházy Károly Főiskola

3300 Eger Leányka u. 6., tel.: +3636520400, fax:+3636520438, vigattila@ektf.hu, www.ektf.hu/ret

²Analitikai Osztály, Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet

1022 Budapest Herman Ottó út 15. tel.: +3613558244 fax: +3613558928 n.adanyi@cfri.hu, www.keki.hu

ABSTRACT

The aim of our present work was to improve the flow-through biosensor system previously developed. Ascorbate oxidase enzyme was immobilized on a natural protein membrane (pig's small intestine) in a thin layer enzyme cell. The enzyme cell was connected to a flow injection analysis (FIA) system with an amperometric detector. During the optimization of biosensor several parameters were examined and for measuring analyte concentrations subtraction of the signal given in the presence of enzyme from the signal given in the absence of enzyme was applied.

1. BEVEZETÉS

Aszorbinsav meghatározására számos módszer található a szakirodalomban, a klasszikus analitikai eljárások közül elsősorban a titrimetriás meghatározást alkalmazzák, amely pontos, viszont időigényessége miatt sorozat elemzésekben nem használható [1]. A műszeres módszerek között a HPLC-s meghatározás terjedt el, amely rendkívül költséges módszer [2]. Az utóbbi években kezdték el fejleszteni a bioszenzorokat különböző szubsztrátok elemzésére (pl. glükóz szenzorok), melyek olcsóságukkal, nagy pontosságukkal, specifitásukkal tűnnek ki. A bioszenzorok az analitikai módszerek új generációját jelentik, ahol a mérőfelületen valamilyen biológiailag aktív anyag van rögzítve (pl. enzim, sejtorganellum, antitest, stb.). A kapott biokémiai jel detektálása is többféle módon történhet a reakcióktól és az igényektől függően (potenciometria, amperometria, konduktometria, optikai módszerek).

Az eddigi kutatások során többfajta elektrokémiai eljárást dolgoztak ki C-vitamin (aszorbinsav) vizsgálatára, azonban a kifejlesztett rendszereknek jelentős hiányosságai voltak minden esetben (specifitás, érzékenység, költségesség, stb.).

C-vitamin tartalmú gyógyászati készítmények elemzésére próbálták meg alkalmazni a kalixarénnel módosított szénpaszta elektródot ciklikus voltametriával [3]. Ez direkt elektrokatalitikus módszernek tekinthető, Pb(II) ionok alkalmazásával sikerült az aszorbinsav leválási potenciálját 5-600mV-ról 200mV-ra csökkenteni, azonban így sem sikerült reális minták esetében megfelelő specifitást elérniük.

Szintén direkt amperometriás meghatározást választottak angol kutatók gyümölcsök minőségének, érettségének vizsgálatára [4]. A fent említett zavaró anyagok kiküszöbölésére méretkizárásos membránt alkalmaztak a választott +350mV potenciálon.

Aszorbát oxidáz enzim rögzítésével török kutatóknak nagyfokú szubsztrátspecifitást sikerült elérniük gyümölcslevek és C-vitamin tabletták elemzésénél [5]. Az enzimet zselatin gélben rögzítették glutaraldehid alkalmazásával oxigén elektród felületén. A mérés során az enzimreakcióban elfogyasztott oxigén mennyiségét mérték, aminek során azonban számos zavaró hatással kell számolni (hőmérsékletfüggés, reális mintákban az oldott oxigén zavaró hatása, nagymértékű háttérzaj, rossz érzékenység).

Brazil kutatók potenciometriás detektálással dolgoztak ki enzimátikus módszert aszorbinsav mérésére [6]. Szintén aszorbinsav oxidázt használtak, amelyet etilén-vinilacetát kopolimer membrán felszínéhez kötöttek. A mérést grafit elektróddal végezték, de a már említett hibákat nem sikerült kiküszöbölniük.

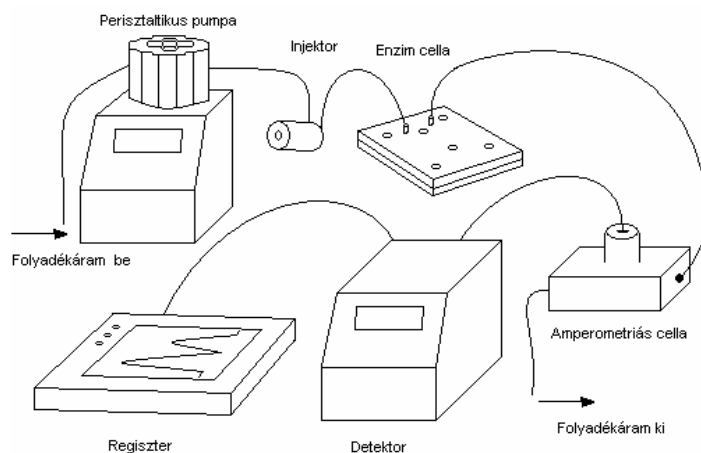
Az eddigi leghatékonyabb módszer készítői SIRE (Sensors based on Injection of the Recognition Element) típusú szenzort alkalmaztak [7]. Ebben az esetben is átfolyó rendszerben végzik a méréseket, az enzimet a mérendő oldathoz keverik, és együtt injektálják. A mérés során az aszkorbinsav enzim nélkül illetve enzimmel együtt mért amperometriás jelének különbségéből következtettek az aszkorbinsav mennyiségére. A módszer nagyon pontos, specifikus módszer, a háttér zavaró hatása sem jelentkezik. Hátrányának mondható a drágasága, mivel viszonylag sok enzim szükséges egy méréshez és a felhasznált enzim nem használható újra. A nem átfolyó cellás módszerek hátránya az átfolyó rendszerű (FIA Flow Injection Analysis) bioszenzorokkal szemben, hogy sorozat elemzésekre nem használhatók, azaz az automatizálhatóságuk korlátozott [8].

Az általunk fejlesztett aszkorbinsav bioszenzort elsősorban élelmiszerminták vizsgálatára kívánjuk alkalmazni, minthogy számos élelmiszerhez adnak L-aszkorbinsavat természetes antioxidánsként. A FIA rendszerű [9,10] bioszenzor alkalmazása során az enzimreakció hatására bekövetkező aszkorbinsav jel csökkenés mérésére került sor a teljes aszkorbinsav jellel szemben. Kísérleteinkben a következő paramétereket vizsgáltuk: aszkorbinsav jel potenciál függése, bioszenzor jel koncentráció függése, bioszenzor pH függése, ionerősség és vezető só hatása a mért jelre, Cu^{2+} ionok hatása a szenzor működésére, optimális áramlási sebesség.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A kísérleti műszer összeállítás

A folyadékáramlást Gilson Minipuls3 perisztaltikus pumpa biztosítja. A minták injektálást Rheodyne 7725i injektorral végezzük 50 μl minta bemerő hurokkal. A jelek detektálását ESA Coulochem III elektrokémiai detektorral, ESA 5040 amperometriás mérőcellával és szénüveg elektróddal végezzük. Az adatok regisztrálása Radelkis OH-105 polarográffal történik. (1. ábra.) Az enzimcella két plexilemezből és közötté elhelyezkedő teflonlapból áll. Az enzimet glutáraldehiddel természetes fehérje membránra (sertés vékonybél) rögzítjük. Méréseinkhez enzim nélküli, vak cellát is használunk, ami teljesen megegyezik az enzimcellával, a különbség, hogy a sertésbélhez nem rögzítünk enzimet.



1. ábra

A készülék sematikus rajza

2.2. Vegyszerek

Aszkorbát oxidáz (EC 1.10.3.3) (Sigma, Calbiochem), HPO_3 (alt., Merck), L-aszkorbinsav, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , (alt., Spektrum -3D).

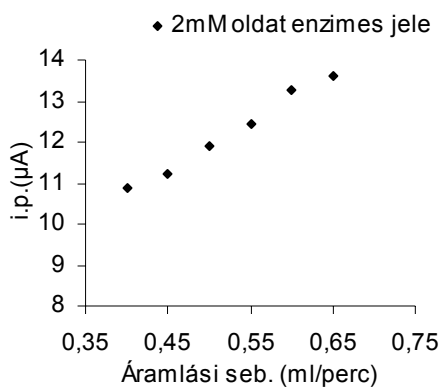
2.3. Aszkorbinsav oldat stabilizálása és oldat készítés

A metafoszforsavból 20 g/dm^3 koncentrációjú törzsoldatot készítettünk Milli-Q, HPLC vízzel (hűtőben tárolva kb. 1 hónapig stabil). A törzsoldatból az irodalmi leírásoknál 5-ször hígabb: 4 g/dm^3 hígítást készítettünk, ezzel az oldattal készültek a megfelelő koncentrációjú KH_2PO_4 és Na_2HPO_4 oldatok, s a puffer elegyek. Az így készült, megfelelő kémhatású pufferből készítettük a 10mM koncentrációjú aszkorbinsav törzsoldatot, ami stabilnak mutatkozott legalább 19 óráig hűtőben tárolva.

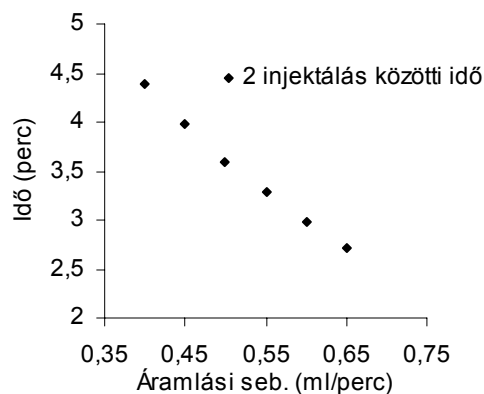
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

Az előkísérletek során vizsgáltuk az enzim reakció kinetikáját, valamint az optimális áramlási sebességet.

Az enzim reakció sebességének tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a megfelelően detektálható átalakuláshoz lassabb áramlási sebesség szükséges. Figyelembe véve, hogy a hosszabb tartózkodási idő az enzimreakciónak, ellenben a nagyobb áramlási sebesség az elektród regenerációjának kedvez, 0,55ml/perc áramlási sebességet találtuk a legalkalmasabbnak (itt a regenerálódási idő 3,3 perc). Továbbá ezen a sebességen már nem volt megfigyelhető a csúcsok torzulása sem (2. és 3. ábra).

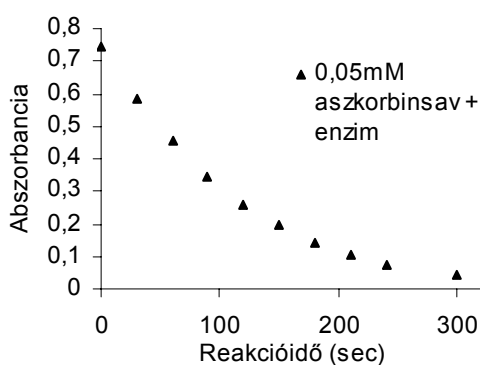


2. ábra
Jel áramlási sebesség függése

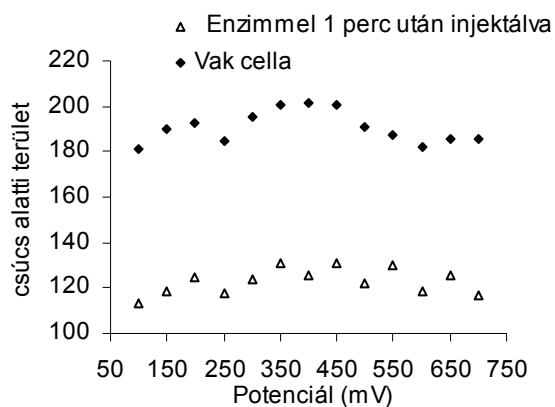


3. ábra
Regenerálódási idő az áramlás függvényében

Az amperometriás detektálás alkalmazásakor lehetőség van az O_2 fogyás mérésére negatív potenciálon, illetve az aszkorbinsav fogyás mérésére pozitív potenciálon, mivel a keletkező dehidroaszkorbinsav és víz nem ad amperometriás jelet. Vizsgálataink során mi az utóbbi mérését választottuk, mivel így szélesebb koncentráció tartományban működik a szenzor, valamint a szenzor érzékenysége is megfelelő. Az aszkorbinsav amperometriás jelét egymás után mértük referencia cellával majd enzim cellával, és a két jel különbsége volt arányos a minta aszkorbinsav tartalmával.

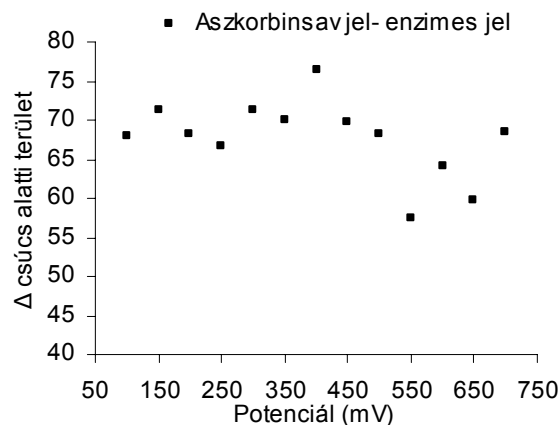


4. ábra
Szubsztrát bomlása 20 U aktivitású enzimmel



5. ábra

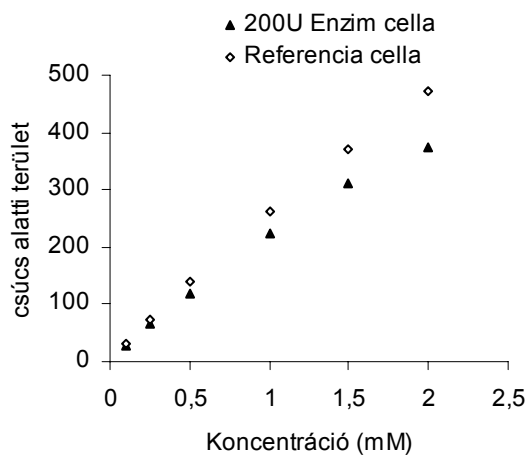
Aszkorbinsav mérése a potenciál függvényében
(1mM stand., 66mM puff., pH=6,7)



6. ábra

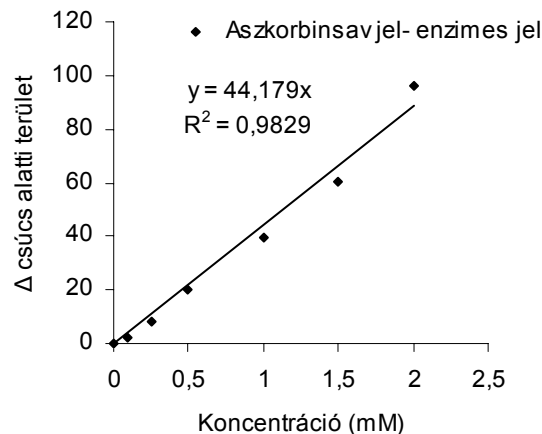
Jelkülönbségek a különböző potenciálokon

A megfelelő polarizációs potenciál meghatározásához adott koncentrációjú aszkorbinsav jel potenciál-függését illetve ugyanezen koncentrációnál meghatározott idő után enzimmel injektált jelek változásait vizsgáltuk. Ezek összehasonlítása alapján a 400mV potenciál tűnt a legmegfelelőbbnek a vizsgálatok szempontjából, mivel 350-450mV potenciál szakaszon mutat maximális értéket a jel, továbbá a görbe meredeksége itt egyfajta platóba megy át (5. és 6. ábra).



7. ábra

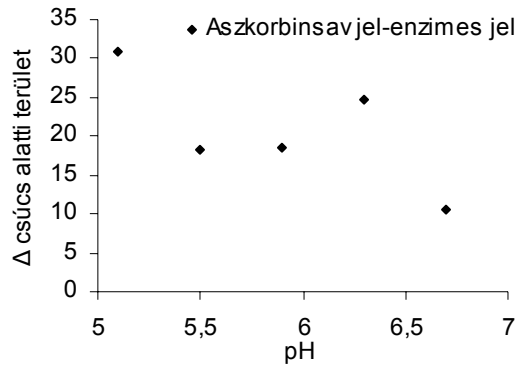
Koncentrációfüggés, 400 mV, pH=6,7



8. ábra

Kalibráció az enzim cellával

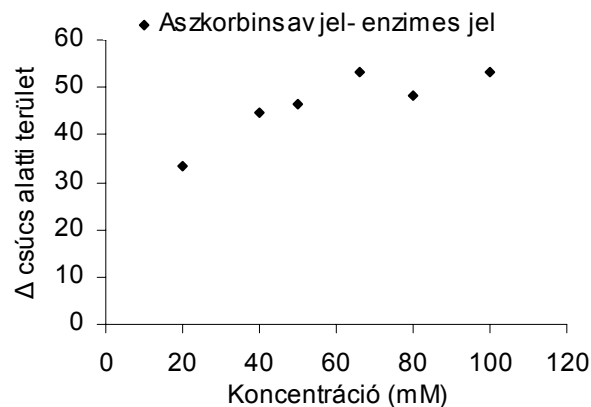
Az aszkorbinsav injektálásakor mért referencia jelek nem teljesen arányosak az eredeti koncentrációval (0,1-2 mM-ig vizsgálva), illetve a későbbiekben, a mintákban lévő elektrokémiailag aktív zavaró anyagok is adhatnak jelet (pl.: élelmiszer minta mátrixa), melyeket nem lehet elkülöníteni az aszkorbinsav jeltől. Azonban az enzimes cellával mért jel csökkenése csak az enzimreakcióhoz köthető így következtethetünk az aszkorbinsav jelenlétére, illetve mennyiségére a megfelelő kalibrációs egyenes segítségével. (7. és 8. ábra).



9. ábra

Aszkorbinsav mérése a foszfát puffer pH függvényében (66mM puffer, 400mV)

Az enzim működésének pH optimum 5,5 és 7,0 között van az irodalmi adatok alapján. Ez az optimum azonban az enzim immobilizálása során megváltozhat, ezért sor került a reakció pH függés meghatározására. A kapott eredmény alapján inkább a savas tartomány felé tolódott az enzim működésének optimuma, pH=5,5 alá. Tekintettel arra, hogy nemcsak a referencia jel nőtt az alacsonyabb pH-n, hanem a két jel különbsége is, ezért feltételezhető, hogy az enzim működése is aktívabb a pH 5,5 alatt. Ennek pontos meghatározására azonban még további vizsgálatok szükségesek (9. ábra).

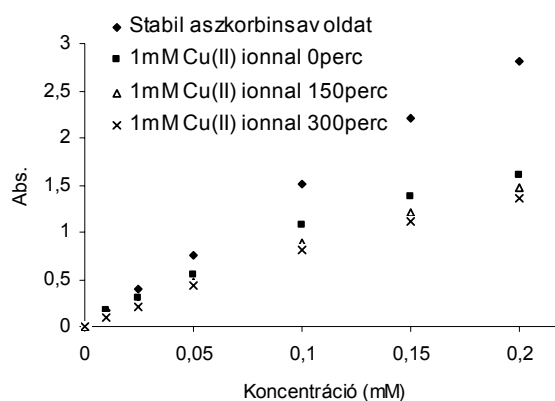


10. ábra

Aszkorbinsav mérése a puffer koncentrációjának függvényében, 400mV, pH=6,7

Az elektrokémiai vizsgálatok során fontos tényező a vezető só koncentrációja illetve az ionerősség is, mely nagyban befolyásolja a kapott jelek nagyságát, stabilitását. Jelen esetben a foszfát puffer koncentrációjának változtatásával vizsgáltuk a hatásokat (20mM-100mM konc.). (10. ábra).

Az aszkorbát oxidáz enzim egy 8 réz atomot tartalmazó oxido-reduktáz, ahol a Cu(II)→Cu(I) redoxireakció játszódik le. A Cu(II) ionokat tartalmazó oldat elvben segítheti az enzim gyorsabb regenerálódását és így a gyorsabb, hatékonyabb reakciót. Azonban ezen ion jelenléte a HPO₃-val stabilizált aszkorbinsav oldatban gyorsítja az aszkorbinsav bomlását is (11. ábra). A Cu(II) ion hatásának vizsgálatát az enzim reakcióra még a továbbiakban vizsgálni kívánjuk.



11. ábra
Aszkorbinsav oldat stabilitás, fotométerrel 265nm

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk vizsgált FIA rendszerben alkalmazott bioszenzor esetén az enzimreakció hatására bekövetkező aszkorbinsav jel csökkenés mérésére került sor a teljes aszkorbinsav jellel (referencia cella) szemben pozitív potenciálon. Mivel ebben az esetben a jel csökkenés csak az aszkorbinsav fogyáshoz köthető, ezért zavaró hatások mellett is lehetővé válik az aszkorbinsav mennyiségi meghatározása. Az általunk fejlesztett aszkorbinsav bioszenzor elsősorban élelmiszerminták vizsgálatára lesz alkalmazható, minthogy számos élelmiszerhez adnak L-aszkorbinsavat természetes antioxidánsként. A következő időszakban számos valós élelmiszermintán is optimalizáljuk a fejlesztett szenzort.

A méréseink alapján az aszkorbát oxidáz enzim cella legalkalmasabb paramétereinek a 400mV-polarizáló feszültséget, 0,55 ml/perc áramlási sebességet, 66mM foszfát ionerősség felett és pH=5,5 alatt történő mérést találtuk.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a Pázmány Péter Program keretében működő Egerfood Regionális Tudásközpont támogatását.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1.] 45.1.14 AOAC Official Method 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6-Dichloroindophenol Titrimetric Method (First Action 1967, Final Action 1968)
- [2.] European Standard: Foodstuffs-Determination of vitamin C by HPLC Ref. No.: EN14130:2003 E
- [3.] V.S. Ijeri, M. Algarra, A. Martins: Electrocatalytic determination of Vitamin C using Calixarene modified Carbon Paste electrode, *Electroanalysis* **2004**, 16, 24.
- [4.] S. Jawaheer, S. F. White, S. D. D. V. Rughooputh, D.C. Cullen: Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, 1429-1437.
- [5.] E. Akyilmaz, E. Dincaya: New enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid, *Talanta*, **1999**, 50, 87-93.
- [6.] J.C. B. Fernandes, L.T. Kubota, G. de Oliveira Neto: Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 385, 3-12.
- [7.] K. Kriz, M. Anderlund, D. Kriz: Real time detection of L-ascorbic acid and hydrogen peroxide in Crude food samples employing a reversed sequential differential measuring technique of the SIRE-technology based biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, **2001**, 16, 363-369.
- [8.] G.A. Messina, A.A.J. Torriero, I.E. De Vito, J. Raba: Continuous flow/stopped flow system for determination of ascorbic acid using an enzymatic rotating bioreactor, *Talanta*, **2004**, 64, 1009-1017.
- [9.] N. Adányi, M. Tóth Markus, E.E. Szabó, M. Váradi, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, L. Campanella: Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system, *Analytica Chimica Acta*, **501** **2004** 219-225
- [10.] E.E. Szabó, N. Adányi, M. Váradi: Application of biosensor for monitoring galactose content, *Biosensors & Bioelectronics*, **1996** Vol. 11, No. 10, pp. 1051-1058