

Амперометрични биосензори за анализ на ксантин

Тотка Додевска

Amperometric biosensors for xanthine determination: *The biosensing devices are a promising alternative to the traditional analytical techniques, that are time consuming and often require costly equipment. The biosensors provide the opportunity for a fast, sensitive, selective, cost-effective and susceptible to automation analysis. This work discusses amperometric enzyme biosensors for quantitative determination of xanthine with application in clinical and food analysis.*

Key words: *amperometric biosensors, xanthine, clinical analysis, food analysis*

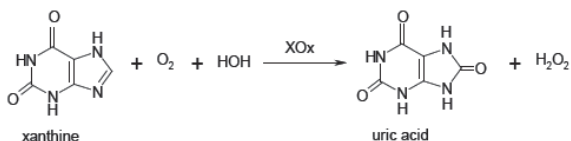
ИЗЛОЖЕНИЕ

В клиничната диагностика нивата на ксантин (3,7-дихидропурин-2,6-дион), прекурсор на пикочната киселина, в кръв и урина са маркери за оценка на бъбречната функция и индикират патологични състояния като ксантинурия, подагра, бъбречна недостатъчност, ксантинова нефролитиаза, пренатална асфиксия. В хранителната индустрия, при качествен контрол на месни продукти, съдържанието на ксантин в месото се ползва като индекс за неговата преснота.

За количественото определяне на ксантин в биохимичния анализ се прилагат рутинни аналитични техники като високоефективна течна хроматография (HPLC) [22], хемилуминисценция [15], капилярна електрофореза [5] или спектрофотометрия [1], чийто общ недостатък са утежнените, изискващи в повечето случаи скъпи реагенти, процедури по предобработка на пробата за анализ.

В тази връзка през последните години много от изследванията по търсене на методи за определяне на ксантин са свързани с разработване на електрохимични биосензори, базирани на ксантинооксидаза (XOx). Електрохимичният биосензор е устройство, което включва биологичен компонент (имобилизиран ензим), трансдюсер (преобразувател на сигнала), който може да бъде амперометричен или потенциометричен и устройство за измерване и обработка на сигнала. Амперометричните ензимни биосензори са с водеща позиция, тъй като предлагат редица предимства: висока чувствителност, нисък откриваем минимум, широк линеен диапазон на електродния сигнал (сила на тока) като функция от концентрацията, бърз отговор, относително ниска себестойност на анализа. В допълнение биосензорните системи, базирани на амперометрични техники, предоставят възможност за автоматизиране на анализите и провеждането им без предварителна обработка на пробата. С използването на съвременно електрохимично оборудване се конструират и портативни биосензорни системи, чрез които анализът може да бъде извършен и при полеви условия.

Ксантинооксидазата е димерен металосъдържащ флавопротеин (275 kDa), чието каталитично действие се изразява във възможността за окисление на хипоксантин до ксантин и последващо превръщане на ксантина до пикочна киселина и водороден пероксид с участието на молекулен кислород:



Реакцията на ензимокаталитичното окисление на ксантин показва възможността за биоелектрохимично определяне на това вещество чрез детекция на количеството продуциран H_2O_2 . При това електродният процес може да бъде окисление на H_2O_2 , протичащо при анодни стойности на потенциала, или

електрохимичната му редукция. Първият метод дава добри резултати, но в сложните по състав биологични течности като правило присъстват много вещества, които се окисляват върху индикаторния електрод при потенциали, близки до тези на превръщане на H_2O_2 . Това налага ограничения при прилагането на метода и не позволява пълноценното използване на високата ензимна селективност. При втория метод обикновено се използват каталитични електроди, модифицирани с пероксидаза като доказан ефикасен биокатализатор за електрохимична редукция на водороден пероксид. Създаването на подобни биензимни системи чрез съимобилизация на ензима с пероксидаза, води до значително повишаване в селективността на определянето, но и същевременно до усложняване конструкцията на биоелектрохимичната система. За блокирането на достъпа на електроактивни субстанции до електродната повърхност се нанасят защитни филмови покрития или се реализира многослойна сензорна архитектура, което съществено усложнява електрохимичните системи [30,31]. Ето защо редица изследвания за подобряване селективността на електрохимичното определяне на H_2O_2 са фокусирани върху разработването на ефективни електроди-катализатори за редукция на H_2O_2 при ниски потенциали (около 0 V vs. Ag/AgCl), където се намалява или напълно отстранява пречещото влияние на редица електроактивни субстанции, естествено присъстващи в реалните проби.

В биосензорните технологии изключително широко използвани като електроди са въглеродните материали. По данни на Web of Science за публикациите в периода 2004 – 2013 година 77% от електрохимичните изследвания на пуриновите производни, в т. ч. и ксантин, са проведени върху въглеродни електроди [27]. Причините, обуславящи тяхното преимуществено приложение, са високите електропроводимост, биосъвместимост, химична и електрохимична стабилност, възможността за получаване в компактна и в дисперсна форма с необходимата текстура и не на последно място относително ниската им цена и достъпност.

Ефективен подход за повишаване електрохимичната активност на биосензорните системи е включването на микро- и наночастици от платинови метали, преходни метали и техни оксиди. Разработването на биосензори чрез комбинирането на ензими с електрохимични трансдюсери, модифицирани с Au- и Pt-наночастици, играе изключително важна роля в сензорните технологии през последните години. При разработването на ксантиноксидазни биосензори се съобщава за включването на наноструктури от Pt [4,29], Pt+Pd [13] Ag [12], Au [30], Fe [9], Fe_3O_4 [23,25], Co_3O_4 [6] и др. Биосензор за ксантин на базата на стъклографит, модифициран с наноструктури от $CaCO_3$, е създаден от Shan и колектив [26]. За подобряване аналитичното поведение на биосензорните системи се включва и колоидно злато [10,20], ролята на което се коментира във връзка с понижаването на енергийния бариер на електрон-трансферния процес върху електрода.

С цел повишаване ефикасността на електронния обмен между активния център на ензима и електродната повърхност при конструирането на биосензорни системи се включват и медиатори – нискомолекулни редокс-активни вещества, които могат да бъдат в свободно състояние, асоциирани в моно- или мултислойни структури или включени в порьозни матрици. Електрохимичният медиатор осъществява електронна "совалка", т.е. по дифузионен път обезпечава двупосочен електронен транспорт между активния център на ензима и електродната повърхност. В разработването на ксантиноксидазни биосензори като медиатори са използвани Берлинско синьо [28], Со-фталоцианин [19], феназинметасулфат [18] и др.

През последните години много от изследванията по търсене на методи за определяне на ксантин са свързани с разработване на биосензори, базиращи се на включване на ксантиноксидазата в електрогенериранни органични проводими полимери [3,4,21,25]. Съществено преимущество на електрохимичното отлагане на полимерни филми е, че може да се регулира прецизно както дебелината, така и

химичния състав на получаваната полимерна ципа чрез контрол върху приложния потенциал и времетраенето на електродния процес. Често използван за тези цели е полипиролът [3,10,20,21], който може да бъде получен чрез електрохимично иницирирана полимеризация при ниски окислителни потенциали във водни разтвори при неутрално рН, условия съвместими с голям брой биомолекули. Други използвани полимери за разработване на ксантиноксидазни биосензори са полианилин [25], поливинилфероцен [4] и poly-TTCA [24].

В областта на електрохимичните сензорни технологии особено внимание се отделя на въглеродните нанотръбички (CNT) като перспективни електродни материали. CNT демонстрират уникална комбинация между отлични структурни, механични и електрохимични свойства. Голямото съотношение повърхност/обем, забележителната способност да ускоряват електронния трансфер между електроактивни вещества и електродната повърхност, както и възможността да бъдат включвани в множество различни конфигурации при разработването на биосензорни системи, определят големия изследователски интерес към тях. В конструкцията на ксантиноксидазни биосензори са съобщава за използването на SWCNT [30], DWCNT [2] и MWCNT [6,7,11].

Направеният литературен преглед показва, че анализ на съдържанието на ксантин в реални проби успешно е проведен с амперометрични биосензорни системи, разработени от няколко изследователски групи. Измерванията са проведени в хранителни проби – различни видове меса [6-9,11,12,25,29], чай [8], кафе [8]; в клинични проби (урина) [23] и лекарствени препарати [4]. При изследванията е доказана много добра корелация на резултатите с тези, получени при паралелно изследване на пробите чрез установени в практиката референтни методи (HPLC и спектрофотометрия).

Значителният интерес през последните години към разработването на системи за директна биоелектрокатализа с редокс-ензими, без участието на медиатори за обезпечаване на електронния пренос към електрода, произтича от качествено новите перспективи, които се разкриват пред хетерогенната биоелектрокатализа и сензорните технологии. Този тип биосензори (т. нар. “трето поколение биосензори”) предлагат по-добра селективност, тъй като оперират при потенциал, близък до редокс-потенциала на нативния ензим. Същевременно директното интегриране на биокомпонента с електродната повърхност повишава чувствителността на определянето, което се обяснява с повишената скорост на електронния процес като резултат от скъсеното разстояние между активния център на ензима и електрода.

За ксантиноксидазата е присъщо наличието на подчертан ефект на пространствено екраниране на активния център поради разполагането му на значителна дълбочина (над 2 nm) във вътрешността на молекулата, което обстоятелство затруднява възможността за пряк електронен обмен с електродната повърхност. Това е и главната причина, поради която в специализираната литература са направени ограничен брой съобщения за реализиране на директна електрохимия на ХОх [14,16,26,32]. При тези изследвания ензимът е имобилизиран върху: графит [16], златен електрод, модифициран със SWCNT [32], MWCNT-модифициран стъклографит [14], стъклографит с отложен върху него филм от лапонит, включващ ХОх [26]. В конструкцията на част от този тип биосензори са включени златни наночастици и CNT, отличаващи се с висока биосъвместимост, които способстват за запазване на високата активност на биокомпонента и ускоряване на електрон-трансферния процес между протеиновата молекула и електродната повърхност. Изследванията с тези биосензорни системи към момента обаче са провеждани само в моделни разтвори и все още няма данни за тестове в реални проби (клинични или хранителни).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многообразието от методични подходи за имобилизиране на ензима ксантинооксидаза във връзка със създаването на амперометрични биосензори за анализ на ксантин в клинични материали и в хранителни проби, е показателно за практическия интерес към тези разработки. Основните акценти в това направление се поставят върху постигането на висока селективност, бързина и ниска себестойност на анализа.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Amigo J., Coello J., Maspoch S., "Three-way partial least-squares regression for the simultaneous kinetic-enzymatic determination of xanthine and hypoxanthine in human urine", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382(6): 1380-1388.

[2] Anik Ü., Çevik S., "Double-walled carbon nanotube based carbon paste electrode as xanthine biosensor", *Microchim. Acta*, 2009, 166(3): 209-213.

[3] Arslan F., Yaşar A., Kiliç E., "An amperometric biosensor for xanthine determination prepared from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film", *Artif. Cells Blood Sub. Immobil. Biotechn.*, 2006, 34(1): 113-128.

[4] Baş SZ., Gulce H., Yildiz S., "Amperometric xanthine biosensors based on electrodeposition of platinum on polyvinylferrocenium coated Pt electrode", *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2011, 72(3-4): 282-288.

[5] Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., "Velocity-difference induced focusing of xanthine and purine metabolites by capillary electrophoresis using a dynamic pH junction", *Chromatographia*, 2003, 57(1): 87-93.

[6] Dalkiran B., Kacar C., Erden P., "Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-Co₃O₄-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode", *Sens. Actuat. B Chemical*, 2014; 200: 83-91.

[7] Dervisevic M., Custiuc E., Çevik E., Şenel M., "Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection", *Food Chem.*, 2015, 181: 277-283.

[8] Devi R., Narang J., Yadav S., Pundir S., "Amperometric determination of xanthine in tea, coffee, and fish meat with graphite rod bound xanthine oxidase", *J. Anal. Chem.*, 2012, 67(3): 273-277.

[9] Devi R., Yadav S., Naranga J., Pundir C., "Electrochemical biosensor based on gold coated iron nanoparticles/chitosan composite bound xanthine oxidase for detection of xanthine in fish meat", *J. Food Eng.*, 2013, 115(2): 207-214.

[10] Devi R., Yadav S., Pundir C., "Au-colloids-polypyrrole nanocomposite film based xanthine biosensor", *Coll. Surf. A: Physicochem. Engin. Asp.*, 2012, 394: 38-45.

[11] Devi R., Yadav S., Pundir S., "Electrochemical detection of xanthine in fish meat by xanthine oxidase immobilized on carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film", *Biochem. Eng. J.*, 2011, 58-59: 148-153.

[12] Devi R., Batra B., Lata S., Yadav S., Pundir S., "A method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver nanoparticles/cysteine modified Au electrode", *Proc. Biochem.*, 2013, 48(2): 242-249.

[13] Dodevska T., Horozova E., Dimcheva N., "Design of an amperometric xanthine biosensor based on a graphite transducer patterned with noble metal microparticles", *Centr. Europ. J. Chem.*, 2010, 8 (1): 19-27.

[14] Gao Y., Shen C., Di J., Tu Y., "Fabrication of amperometric xanthine biosensor based on direct chemistry of xanthine oxidase", *Mat. Sci. Eng. C*, 2009, 29: 2213-2216.

[15] Hlavay J., Haemmerli S.D., Guilbault G.G., "Fibre-optic biosensor for hypoxanthine and xanthine based on a chemiluminescence reaction", *Biosens. Bioelectron.*, 1994, 9(3): 189-195.

[16] Horozova E., Dimcheva N., Jordanova Z., "Enzymatic and electrochemical reactions of xanthine oxidase immobilized on carbon materials", *Z. Naturforsch.*, 1997, 52c: 159-164.

[17] Hoshi T., Noguchi T., Anzai J., "The preparation of amperometric xanthine sensors based on multilayer thin films containing xanthine oxidase", *Mater. Sci. Engin. C*, 2006, 26 (1): 100-103.

[18] Kalimuthu P., Leimkühler S., Bernhardt P., "Low-potential amperometric enzyme biosensor for xanthine and hypoxanthine", *Anal. Chem.*, 2012, 84 (23): 10359-10365.

[19] Kilinc E., Erdem A., Gokgunec L., Dalbasti T., Karaoglan M., Ozsoz M., "Buttermilk based cobalt phthalocyanine dispersed ferricyanide mediated amperometric biosensor for the determination of xanthine", *Electroanalysis*, 1998, 10 (4): 273-275.

[20] Liu Y., Nie L., Tao W., Yao S., "Amperometric study of Au-colloid function on xanthine biosensor based on xanthine oxidase immobilized in polypyrrole layer", *Electroanalysis*, 2004, 16 (15): 1271-1278.

[21] Miao Y., Wu X., Chen J., "Synthesis of polypyrrole nanotubes and fabrication of xanthine oxidase electrode", *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2005, 50: 507-515.

[22] Monser L., "Liquid chromatographic determination of four purine bases using porous graphitic carbon column", *Chromatographia*, 2004, 59 (7): 455-459.

[23] Ozturk F., Erden P., Kacar C., Kilic E., "Amperometric biosensor for xanthine determination based on Fe₃O₄ nanoparticles", *Acta Chim. Slov.*, 2014, 61(1): 19-26.

[24] Rahman M.A., Won M.S., Shim Y.B., "Xanthine sensors based on anodic and cathodic detection of enzymatically generated hydrogen peroxide", *Electroanalysis*, 2007, 19 (6): 631-637.

[25] Sadeghi S., Fooladi E., Malekaneh M., "A nanocomposite/crude extract enzyme-based xanthine biosensor", *Anal. Biochem.*, 2014, 464: 51-59.

[26] Shan D., Wang Y., Xue H., Cosnier S., "Sensitive and selective xanthine amperometric sensors based on calcium carbonate nanoparticles", *Sens. Actuat. B: Chem.*, 2009, 136: 510-515.

[27] Sharma V., Jelen F., Trnkova L., "Functionalized solid electrodes for electrochemical biosensing of purine nucleobases and their analogues: A review", *Sensors* 2015, 15: 1564-1600.

[28] Teng Y., Chen C., Zhou C., Zhao H., Lan M., "Disposable amperometric biosensors based on xanthine oxidase immobilized in the Prussian blue modified screen-printed three-electrode system", *Sci. Ch. Chem.*, 2010, 53 (12): 2581-2586.

[29] Vanegas D., Gomes C., McLamore E., "Xanthine oxidase biosensor for monitoring meat spoilage", *Proc. SPIE 9107, Smart Biomedical and Physiological Sensor Technology XI*, 91070V (22 May 2014); doi: 10.1117/12.2050489, 8 pages.

[30] Villalonga R., Diez P., Eguilaz M., Martinez P., Pingarron J., "Supramolecular immobilization of xanthine oxidase on electropolymerized matrix of functionalized hybrid gold nanoparticles/single-walled carbon nanotubes for the preparation of electrochemical biosensors", *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2012, 4(8): 4312-4319.

[31] Villalonga R., Matos M., Cao R., "Construction of an amperometric biosensor for xanthine via supramolecular associations", *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 454-458.

[32] Wang L., Yuan Z., "Direct electrochemistry of xanthine oxidase at a gold electrode modified with single-wall carbon nanotubes", *Anal. Sci.*, 2004, 20 (4): 635-638.

За контакти:

Доц. д-р Тотка Михайлова Додевска, Катедра "Неорганична химия и физикохимия", Университет по хранителни технологии – Пловдив, тел.: 032/603679, e-mail: dodevska@mail.bg

Докладът е рецензиран