

Biosenzor pro kontrolu čerstvosti rybího masa

PETRA BRÁZDILOVÁ - PETR KOTZIAN - KAREL VYTRÁS

SOUHRN. Biosenzor pro stanovení hypoxantinu jako ukazatele čerstvosti rybího masa byl zhotoven zachycením enzymu xanthin oxidázy na uhlíkové tištěné elektrodě modifikované oxidem rutheničitým (SPCE/RuO₂). Pro amperometrické stanovení hypoxantinu byla využita metoda průtokové injekční analýzy do roztoku 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,5 s průtokem 0,6 ml.min⁻¹, přičemž byla sledována proudová odezva článku při vloženém napětí 0,5 V vs. Ag/AgCl. Kalibrační závislost modelových vzorků byla lineární v rozmezí 1–15 mg.l⁻¹ hypoxantinu s mezí detekce (3σ) 0,4 mg.l⁻¹, relativní směrodatná odchylka 1,7 %. Během měření byl pozorován mírný pokles aktivity biosenzoru; po přibližně 40 nástřicích a osmihodinovém používání klesla jeho proudová odezva na cca 85 % původní hodnoty. Možnost využití tohoto biosenzoru pro kontrolu čerstvosti skladovaných ryb byla studována na vzorcích masa lososa.

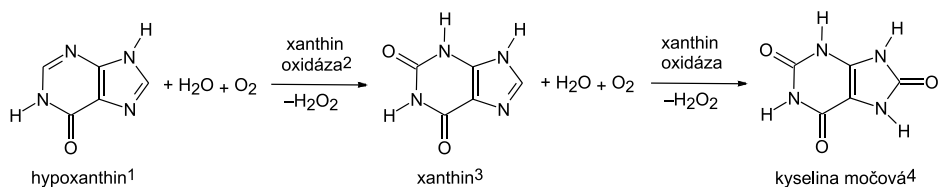
KLÍČOVÁ SLOVA: rybí maso; biosenzor; uhlíková tištěná elektroda; průtoková injekční analýza; xanthin oxidáza; hypoxanthin

V současné době je věnována velká pozornost vývoji a aplikacím senzorů pro stanovení nejrůznějších chemických nebo biologických látek, výjimečné nejsou ani aplikace v potravinářské praxi. V tomto příspěvku bychom rádi poukázali na možnost jejich využití k hodnocení čerstvosti skladovaného rybího masa. Je dobře známo, že po usmrcení ryb se v jejich tkáni začnou v důsledku autolýzy rozkládat molekuly adenosintrifosfátu na adenosindifosfát, adenosinmonofosfát a následně inosinmonofosfát, m.j. způsobující pro někoho příjemný, pro jiného nepříjemný pach rybího masa. V přítomnosti enzymů je inosinmonofosfát dále přeměňován na inosin, hypoxanthin, xanthin a kyselinu močovou [1], což vede ke změnám v kvalitě i chuti masa. Protože v rybí tkáni přitom dochází k akumulaci hypoxanthinu, stanovení jeho obsahu může být využito k odhadu stárnutí masa skladovaných ryb. Oxidaci hypoxanthinu a xanthinu na kyselinu močovou katalyzuje enzym

Mgr. Petra BRÁZDILOVÁ, Ing. Petr KOTZIAN, prof. Ing. Karel VYTRÁS, DrSc., Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, CZ - 532 10 Pardubice.

Korespondující autor: prof. Ing. Karel VYTRÁS, DrSc., e-mail: karel.vytras@upce.cz

xanthin oxidáza, flavoproteinový enzym obsahující molybden a železo a nacházející se ve značném množství v jaterních buňkách [2], přičemž se uvolňuje peroxid vodíku (viz schéma na obr. 1). Množství vzniklého peroxidu je tedy úměrné obsahu hypoxantinu v analyzovaných vzorcích.



OBR. 1. Schéma enzymatické oxidace hypoxantinu a xanthinu.

FIG. 1. Scheme of the enzymatic oxidation of hypoxanthine and xanthine.

1 - hypoxanthine, 2 - xanthine oxidase, 3 - xanthine, 4 - uric acid.

Ke stanovení hypoxantinu jsme zhotovili amperometrický biosensor na bázi tištěných uhlíkových elektrod (SPCE, z angl. Screen Printed Carbon Electrodes) modifikovaných oxidem rutheničitým. Podobná modifikace je obecně nezbytná; je totiž známo, že k oxidaci H₂O₂ na uhlíkových elektrodách dochází při hodnotách napětí kolem 0,9 V [3], přičemž však dochází často k interferencím ze strany jiných oxidace schopných látek. Jednou z možností, jak zvýšit specifitu těchto elektrod k H₂O₂, je jejich modifikace pomocí mediátorů, což jsou látky umožňující snížení přepětí H₂O₂. Roli mediátorů mohou zastávat různé látky s výraznou oxidačně redukční aktivitou, např. samotné kovové prvky, anorganické soli a oxidy, ale i složitější anorganické i organické sloučeniny a komplexy. Přehled některých vybraných mediátorů lze nalézt například v citované souhrnné práci [4]. Na našem pracovišti byla ve spolupráci s kolegy Štýrského Hradce (Karl-Franzens-Universität Graz) donedávna studována a využívána modifikace přídavkem MnO₂ do uhlíkových past nebo uhlíkových inkoustů, které byly používány jako nosiče enzymů v biosenzorech pro stanovení glukózy a jiných látek (viz odkazy v přehledu o těchto čidlech, který byl nedávno uveřejněn [5]). Přes vysokou citlivost a reprodukovatelnou odezvu k peroxidu vodíku však tato čidla nemohla být plně využívána v kyselejších roztocích a při aplikacích negativnějších potenciálů, neboť za těchto podmínek docházelo k postupnému vymývání tohoto mediátoru. Proto jsme se zaměřili na možnost modifikace pomocí RuO₂, která byla využita jinými autory v čidlech pro stanovení kyseliny askorbové [6], popřípadě glukózy a jiných sacharidů [7-9].

Materiál a metody

Chemikálie a roztoky

Xanthin oxidáza (E.C. 1.1.3.22, mikrobiálního původu, specifické aktivity $9,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) a hypoxanthin byly zakoupeny od dodavatelské firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Fosfátový pufr byl připraven smícháním $0,1 \text{ M}$ vodných roztoků $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, Brno, ČR), hodnota pH byla kontrolována potenciometricky pomocí článku sestaveného ze skleněné a nasycené kalomelové elektrody, k jehož kalibraci byly použity standardní pufrы konvenční aktivitní stupnice. K přípravě všech roztoků byla používána deionizovaná a následně destilovaná voda.

Přístroje a zařízení

Ke všem měřením byl použit modulární analyzátor AUTOLAB (model PGSTAT 20) ovládaný softwarem GPES 4.4, který také sloužil pro zaznamenávání, ukládání a zpracování naměřených dat (Ecochemie, Utrecht, Holandsko).

Systém pro injekční průtokovou analýzu se skládal z peristaltické pumpy (model PCD 83 SE, Kouřil, Kyjov, ČR), šesticestného ventilu (Ventil C, ECOM, Praha, ČR) s dávkovací smyčkou o objemu $200 \mu\text{l}$ a manuálně konstruované elektrochemické cely. Tříelektrodový systém tvořila pracovní uhlíková tištěná elektroda a referentní Ag/AgCl elektroda (3 M KCl , model RE-6, BAS, West Lafayette, IN, USA), pomocnou elektrodou bylo nerezové tělo průtokové cely. Nástřik každého vzorku byl opakován třikrát. Odezva amperometrického měření měla tvar píku, jehož výška odpovídala příslušné koncentraci analytu.

Tištěné elektrody

Elektrody byly připraveny smícháním $1,9 \text{ g}$ uhlíkového inkoustu (C50905DI, Gwent, Pontypoll, Velká Británie) s $0,1 \text{ g}$ RuO_2 (Aldrich, St. Louis, MO, USA), který byl po důkladné homogenizaci natištěn na inertní keramické podložky ($113 \times 166 \times 0,635$, No. CLS 641000396R, Coors Ceramic, Chattanooga, TN, USA) v tenkých vrstvách na tiskovém stroji (SP-200, MPM, Franklin, MA, USA). Tištěné elektrody byly sušeny při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin.

Následně byl rozpuštěn 1 mg enzymu ve $20 \mu\text{l}$ fosfátového pufru, poté bylo přidáno $20 \mu\text{l}$ 5% Nafionu® (Aldrich) neutralizovaného koncentrovaným amoniakem na $\text{pH} \sim 7$. Po promíchání bylo $5 \mu\text{l}$ této směsi nanášeno na přesně vymezený povrch tištěné elektrody a vysušeno při laboratorní teplotě po dobu 30 min .

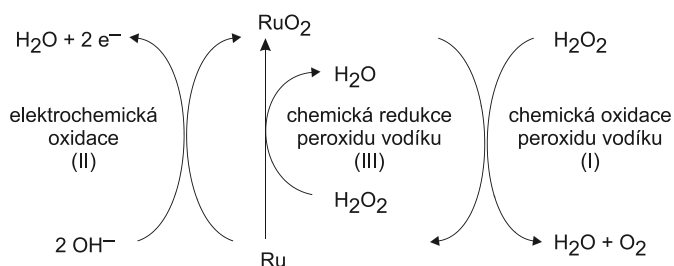
Potravinářský vzorek

Jako praktický vzorek jsme v obchodní síti zakoupili maso lososa, které bylo uchováváno v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení při laboratorní teplotě bylo 15 g masa vloženo do 150 ml fosfátového pufru (pH 7,5) a homogenizováno. Homogenát byl rozdělen do zkumavek a centrifugován 5 min při 6000 otáčkách/min. Roztok nad sedimentem byl po filtraci přes filtr Whatman ($1\text{ }\mu\text{m}$, GMF-150, Middlesex, Velká Británie) dávkován injekční stříkačkou do proudu nosného pufru. Pro studium procesu kažení masa a nárůstu množství hypoxanthinu byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě.

Výsledky a diskuse

Po vytvoření biosenzoru obsahujícího enzym xanthin oxidázu byla provedena optimalizace podmínek pro měření hypoxanthinu, resp. pro stanovení peroxidu vodíku, který vzniká katalytickou reakcí xanthin oxidázy. Peroxid vodíku reaguje s RuO_2 chemicky za tvorby vody, molekulárního kyslíku a kovového ruthenia (viz obr. 2, reakce I). Ruthenium je zpětně elektrochemicky oxidováno na RuO_2 , systémem pak prochází katalytický proud (II). Může však být rovněž oxidováno chemicky (III). Tato reakce je ale kineticky pomalejší, protože katalytická aktivita modifikátoru je elektrochemicky kontrolována.

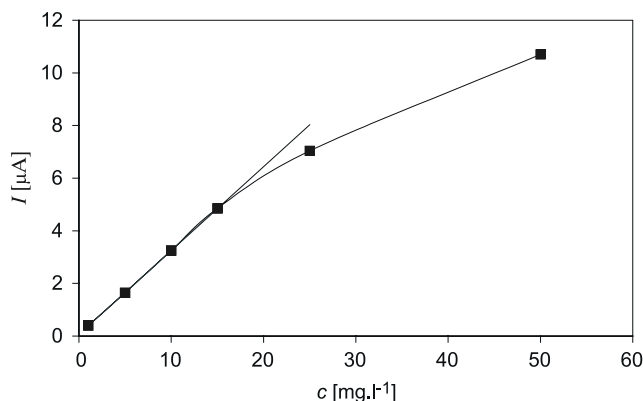
Závislost odezvy hypoxanthinu na vloženém napětí byla studována v rozmezí $-0,3\text{ V}$ až $+0,7\text{ V}$. Signál hypoxanthinu lineárně rostl se zvyšujícím se



OBR. 2. Mechanismus reakce H_2O_2 s modifikátorem RuO_2 na tištěných elektrodách.

FIG. 2. Mechanism of the reaction of H_2O_2 with the RuO_2 modifier on screen-printed electrodes.

I - chemical oxidation of hydrogen peroxide, II - electrochemical oxidation, III - chemical reduction of hydrogen peroxide.



OBR. 3. Kalibrační závislost pro stanovení hypoxanthinu.

Podmínky: napětí 0,5 V vs. Ag/AgCl; nosný elektrolyt 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,5; průtok 0,6 ml.min⁻¹; nástřik roztoku 200 μl. I - proudová odezva, c - koncentrace.

FIG. 3. Calibration dependence for the determination of hypoxanthine.

Conditions: operation potential 0.5 V vs. Ag/AgCl; carrier electrolyte 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5; flow rate 0.6 ml.min⁻¹; solution injection 200 μl. I - amperage response, c - concentration.

vloženým napětím. Jako nejvhodnější pracovní napětí bylo vybráno +0,5 V, nad touto hodnotou totiž docházelo k výraznému vzrůstu proudu pozadí a k nežádoucím interferencím jiných oxidace schopných látek.

Signál hypoxanthinu byl významně ovlivňován též hodnotou pH používaného fosfátového pufru. Při hodnotách pH mezi 5 a 6 nebyla zaznamenána téměř žádná odezva, nejvyšší byla při pH 9. Při této hodnotě se však výška zaznamenávaných píků opakováním nástřiků snižovala. Proto bylo pro další studium voleno prostředí o pH 7,5, při němž byla výška píků dostatečná a pokles pozorován nebyl.

Proudovou odezvu hypoxanthinu ovlivňovala i rychlost průtoku fosfátového pufru elektrochemickou celou. Nejvyšší signál byl zaznamenán při průtoku 0,2 ml.min⁻¹ jako důsledek pomalé enzymové reakce. Při této hodnotě však byly výšky píků při opakovaných nástřicích poněkud hůře reprodukovatelné, což bylo zřejmě zapříčiněno nevyrovnanou rychlostí přenosu elektronů mezi enzymem, mediátorem a uhlíkem tištěné elektrody. Vzhledem k těmto faktorům byla zvolena rychlost průtoku pufru 0,6 ml.min⁻¹ jako kompromis mezi výškou signálu a reprodukovatelností při opakovaných nástřicích.

Za těchto zvolených podmínek byla proměřena kalibrační závislost amperometrického signálu (výšky píků) na koncentraci hypoxanthinu (obr. 3).

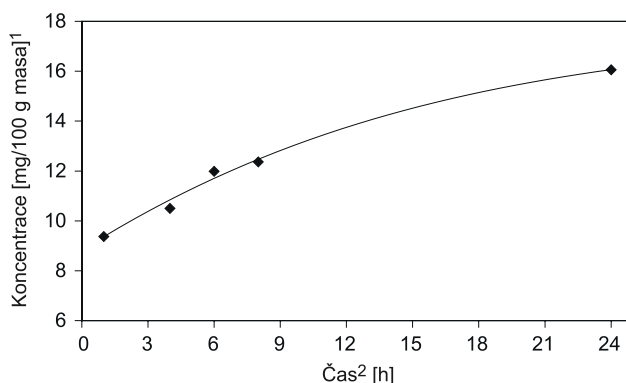
V rozmezí 1–15 mg.l⁻¹ hypoxanthinu bylo možno tuto závislost proložit přímkou

$$I = 0,0672 + 0,3184 c \quad (R^2 = 0,9999),$$

kde I je proudová odezva v mikroampérech a c koncentrace hypoxanthinu v mg.l⁻¹, R je korelační koeficient.

Odchyly od lineárního průběhu, naměřené při koncentracích vyšších než 15 mg.l⁻¹, byly zřejmě způsobeny nasycením aktivních center enzymu. Této kalibrační závislosti odpovídal detekční limit (3σ) 0,4 mg.l⁻¹, relativní směrodatná odchylka 1,7 %.

Nakonec byl homogenát lososího masa ponechán při laboratorní teplotě, která se pohybovala kolem 25 °C, a výše popsaným postupem byl sledován



OBR. 4. Nárůst koncentrace hypoxanthinu v lososím masa během 24 hodin.
Podmínky: jako u OBR. 3.

FIG. 4. Increase in the hypoxanthine concentration in salmon meat during 24 hours.
Conditions: see a footnote under FIG. 3. 1 - concentration [mg/100 g of meat], 2 - time.

TAB. 1. Výtěžnost standardních přídávků hypoxanthinu k vzorku lososího masa.
TAB. 1. Recovery rates of standard additions of hypoxanthine to salmon meat samples.

Přidáno [mg/100 g masa] ¹	Očekávaná hodnota [mg/100 g masa] ²	Nalezeno [mg/100 g masa] ³	Výtěžnost ⁴ [%]
0,0	?	8,1	–
2,5	10,6	10,6	100
5,0	13,1	13,5	103

1 - added [mg/100 g of meat], 2 - expected [mg/100 g of meat], 3 - found [mg/100 g of meat], 4 - recovery rate.

nárůst obsahu hypoxanthinu. S ohledem na možnou degradaci enzymu byla kalibrace jednou za 2 hodiny ověřována. Ukázalo se, že v důsledku pokračujícího rozkladu masové tkáně se jeho koncentrace výrazně zvýšila již během 24 hodin (obr. 4). Abychom ověřili vliv matrice, stanovovali jsme hypoxanthin také v čerstvě připravených homogenátech vzorků lososího masa uměle kontaminovaných známými přísadami preparátu a sledovali výtěžnost. Dosažené výsledky (viz tab. 1) jsou naprosto uspokojivé; je třeba poznamenat, že zjištění obsahu vyššího než 100 % bylo zřejmě způsobeno časovou prodlevou mezi jednotlivými nástriky vzorků, během níž stále probíhala rozkladná reakce.

Závěr

Vzhledem k možnému využití výše popsaného biosenzoru v kontrolní praxi je ale také třeba poznamenat, že jeho životnost není neomezená. V delším časovém úseku měření byla pozorována jeho mírná nestabilita; po 8 hodinách a přibližně 40 nástricích klesla jeho odezva na 80 %, po ca. 24 hodinách na 25 % původní hodnoty. Lze to přičíst na vrub jednak nestabilitě a degradaci enzymu, případně i jeho vyplavování z vrstvy Nafionu. Při měření reálných vzorků pak také mohlo docházet k adsorpci proteinů ze vzorku na aktivní centra enzymu a/nebo na povrch elektrody. Vzhledem ke skutečnosti, že tištěné elektrody (SPCE) jsou koncipovány jako čidla pro omezený počet měření, není nutné klást přísná kritéria na jejich stabilitu. S přihlédnutím k ostatním parametrům (citlivost, limit detekce) lze předpokládat, že by tento biosenzor mohl být využit pro stanovení hypoxanthinu v rybím mase. Výhodou těchto čidel je bezesporu jejich selektivita a citlivost, relativně rychlá odezva a nakonec i příznivá cena.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky pod hlavičkou projektu č. MSM0021627502.

Literatura

1. CHENG, Q. - PENG, T. Z. - YANG, L. J.: Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1998, s. 245-251.

2. PEI, J. H. - LI, X. Y.: Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl_6 chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, **414**, 2000, s. 205-213.
3. WANG, J. - NASER, N. - ANGNES, L. - WU, H. - CHEN, L.: Metal-dispersed carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, **64**, 1992, s. 1285-1288.
4. CHAUBEY, A. - MALHOTRA, B. D.: Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 2002, s. 441-456.
5. BEYENE, N. W. - KOTZIAN, P. - SCHACHL, K. - ALEMU, H. - TURKUŠIĆ, E. - ČOPRA, A. - MODEREGGER, H. - ŠVANCARA, I. - VYTRÁS, K. - KALCHER, K.: (Bio)sensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections, further improvements and applications. *Talanta*, **64**, 2004, s. 1151-1159.
6. WU, J. - SULTS, J. - SANSEN, W.: Amperometric determination of ascorbic acid on screen-printing ruthenium dioxide electrode. *Electrochemistry Communications*, **2**, 2000, s. 90-93.
7. WANG, J. - TAHA, Z.: Catalytic oxidation and flow detection of carbohydrates at ruthenium dioxide modified electrodes. *Analytical Chemistry*, **62**, 1990, s. 1413-1416.
8. LYONS, M. E. G. - FITZGERALD, C. A. - SMYTH, M. R.: Glucose oxidation at ruthenium dioxide-based electrodes. *Analyst*, **119**, 1994, s. 855-861.
9. DOUSIKOU, M. - EFSTATHIOU, C. E. - KOUPPARIS, M. A.: A glucose biosensor based on a RuO_2 -modified carbon paste electrode. In: STRATIS, J.: IMA'03, 3rd International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Application, Conference Proceedings. Thessaloniki : Aristotle University of Thessaloniki, 2003, s. 742-745.

Do redakcie došlo 22. 12. 2004.

Biosensor for control of the fish meat freshness

BRÁZDILOVÁ, P. - KOTZIAN, P. - VYTRÁS, K.: *Bull. potrav. Výsk.*, **44**, 2005, p. 75-82.

SUMMARY. A biosensor for the determination of hypoxanthine as an indicator of the fish meat freshness has been fabricated by immobilization of the xanthine oxidase enzyme on the carbon screen-printed electrode modified with ruthenium dioxide (SPCE/ RuO_2). For amperometric determination of hypoxanthine, a method of flow injection analysis was applied using 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) at a flow rate of $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, and a current response was followed at the operation potential of 0.5 V vs. Ag/AgCl. Calibration dependence of the model samples was linear in the range of 1–15 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ hypoxanthine with the detection limit (3σ) of $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, relative standard deviation 1.7 %. During the measurement, a moderate decrease in the biosensor activity was observed; its current response decreased to approx. 80 % of the original value after approx. 40 injections and 8 hours of use. Applicability of the biosensor to the control of freshness of stored fish was studied using salmon meat samples.

KEYWORDS: fish meat; biosensor; carbon screen-printed electrode; flow injection analysis; xanthine oxidase; hypoxanthine