

ARKADIUSZ SZTERK, PIOTR SZTERK, PIOTR P. LEWICKI

DETEKCJA NADTLENUK WODORU CHEMILUMINOMETREM WŁASNEJ KONSTRUKCJI

Streszczenie

Chemiluminescencja to emisja kwantów światła o określonej długości fali w wyniku specyficznych reakcji chemicznych. W wyniku tych reakcji powstaje produkt w stanie wzbudzonym i w procesie rekombinacji elektronowej następuje emisja promieniowania elektromagnetycznego.

Celem pracy było skonstruowanie chemiluminometru, przyrządu służącego do badania różnych procesów utleniania techniką chemiluminescencją. Kolejnym celem było określenie minimalnego poziomu detekcji nadtlenuku przez skonstruowany przyrząd. Za pomocą zbudowanego chemiluminometru badano stężenie nadtlenuku wodoru w układzie modelowym. Wykorzystano reakcję luminol-H₂O₂-peroksydaza chrzanowa w celu określenia poprawności działania urządzenia i uzyskiwania powtarzalności wyników. Celem pracy było również otrzymanie preparatu peroksydazy chrzanowej i określenie optymalnego pH jej działania. Peroksydazę otrzymywano z korzenia chrzanu tradycyjnymi metodami izolacji i wstępnego oczyszczania. Otrzymanie własnego preparatu enzymatycznego podyktowane było wysoką ceną komercyjnie dostępnych peroksydaz z korzenia chrzanu.

Stwierdzono, stosując zbudowany chemiluminometr, że poziom detekcji nadtlenuku wodoru w układzie luminol-H₂O₂-peroksydaza wynosi 1×10^{-10} mol/dm³ (3,74 ng/dm³). Nie stwierdzono liniowej zależności między stężeniem nadtlenuku wodoru a sygnałem chemiluminescencji. Określono optymalne pH wyizolowanego preparatu peroksydazy chrzanowej, które wynosiło pH = 7.

Słowa kluczowe: chemiluminescencja, nadtlenek wodoru, luminol, peroksydaza chrzanowa

Wprowadzenie

Istnieje wiele metod, które umożliwiają identyfikację i oznaczanie niskich stężeń nadtlenuku wodoru. Najbardziej czule metody detekcji bazującej na pomiarze chemiluminescencji (CL) wykorzystują m.in. lucygeninę, szczawiany, luminol jako podstawowe substraty w reakcjach chemiluminescencji. Poziom detekcji nadtlenuku wodoru w reakcji chemiluminescencji luminolu zależy od zastosowanego katalizatora lub ko-

Mgr inż. A. Szterk, prof. dr hab. P. P. Lewicki, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, inż. P. Szterk, Wydz. Elektryczny, Politechnika Warszawska, Pl. Politechniki 1, 00-661 Warszawa

utleniacza [9]. W reakcji luminolu katalizowanej żelazicyjankiem potasu - $K_3Fe(CN)_6$ odpowiedź CL jest liniowo proporcjonalna do stężenia nadtlenu w granicach od 10^{-8} do 10^{-4} mol/dm³, natomiast w przypadku miedzi(II) czy peroksydazy nie stwierdzono liniowej proporcjonalności [4, 9].

Według literatury przedmiotu limity detekcji w układzie luminol-H₂O₂-peroksydaza mieszczą się w granicach $1,8 \times 10^{-7}$ mol/dm³ - 1×10^{-9} mol/dm³ [4, 7, 12, 13].

Celem pracy było skonstruowanie chemiluminometru i określenie za jego pomocą minimalnego poziomu detekcji nadtlenu wodoru w układzie luminol-H₂O₂-peroksydaza chrzanowa. Celem pracy było również otrzymanie preparatu peroksydazy chrzanowej i określenie optymalnego pH jej działania.

Material i metody badań

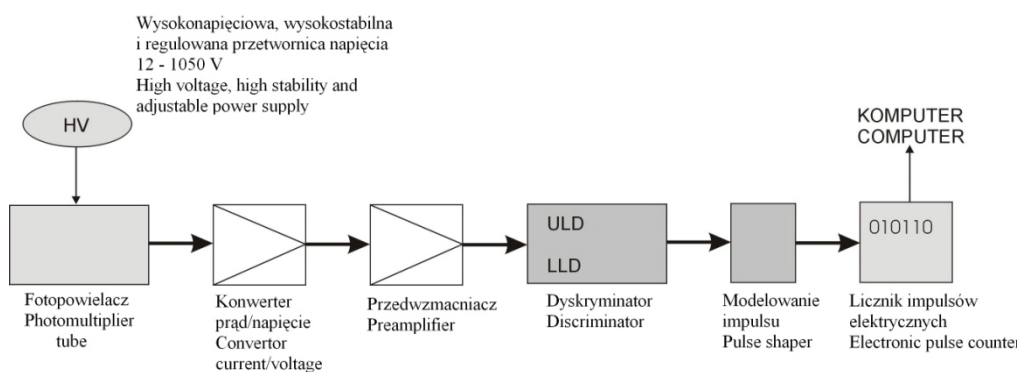
Peroksydazę chrzanową otrzymano zmodyfikowaną metodą opisaną przez Kelina i Hartree'a [6]. Modyfikacja polegała na zastąpieniu siarczanu amonu używanego do wysalania białek acetonem o stężeniu 70 % (v/v). Filtrację zawiesin zastąpiono wirowaniem, a końcowy preparat enzymatyczny suszono sublimacyjnie w temp. półki 0 °C. Aktywność otrzymanego preparatu enzymatycznego badano metodą spektrofotometryczną wobec pirogalolu [10]. Nie przeliczano absorbancji na ilość wytworzonej purpurogaliny. Wzrost absorbancji jest proporcjonalny do stężenia purpurogaliny, więc przyjęto wynik absorbancji jako wyraz aktywności preparatu enzymatycznego w różnych wartościach pH. Wszystkie próbki przygotowywane i rozcieńczane były tak samo. Aktywność badano w granicach pH 5 - 9 w świeżo sporządzonym buforze fosforanowym.

Reakcję chemiluminescencji badano w następującym roztworze: 200 µl 0,017 mol/dm³ luminolu (hydrazid kwasu 3-aminofalowego) rozpuszczonego w 500 µl 0,1 mol/dm³ NaOH, 200 µl roztworu peroksydazy chrzanowej (20 mg wysuszonego preparatu enzymatycznego rozpuszczano w 10 cm³ wody dejonizowanej), 2 cm³ buforu TRIS-HCL (2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol, 0,1 mol/dm³), 5 cm³ wody dejonizowanej. Reakcję rozpoczynano w chemiluminometrze wstrzykując przez kapilarę 1 cm³ roztworu nadtlenu wodoru (od $1,1 \times 10^{-10}$ do $1,1 \times 10^{-8}$ mol/dm³). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej 23°C +/- 2°C [2].

Chemiluminescencję badano w chemiluminometrze własnej konstrukcji, wyposażonym w fotopowielacz. Schemat przyrządu przedstawiono na rys. 1.

Najważniejszym elementem skonstruowanego przyrządu jest fotopowielacz o współczynniku wzmocnienia równym $6,7 \times 10^6$ oraz prądzie ciemnym 0,1 nA max 0,5 nA. Wyjściem fotopowielacza jest anoda, której prąd za pomocą konwertera prąd/napięcie zostaje zamieniany na napięcie. Napięcie to wzmacniane jest przez niskoszumny i szeroko pasmowy przedwzmacniacz. Impulsy z przedwzmacniacza zоста-

ją zamienione na sygnał TTL za pomocą dyskryminatora napięcia o napięciu referencyjnym bliskim 0 V. Sygnał podawany jest na szybką bramkę logiczną NAND, a z niej do 32-bitowego szybkiego licznika o zakresie 0 - 100 MHz. Licznik połączony został z komputerem i odpowiednim programem umożliwiającym rejestrowanie zmian chemiluminescencji w czasie. Cała elektronika przyrządu tak została zaprojektowana, aby częstotliwość pracy wszystkich części wynosiła do 100 MHz, a kwanty światła wywoływały przepływ prądu w fotopowielaczu więcej niż 0,5 nA. Ma to przełożenie na 50 Hz, które rejestrowane było przez licznik impulsów, jako poziom szumów. Wszystko powyżej 50 Hz uznawane było za sygnał chemiluminescencji.



Rys. 1. Schemat ideowy działania zbudowanego chemiluminometru.

Fig. 1. Schematic operational diagram of the chemiluminometer constructed.

Źródło: / Source: the authors' own study

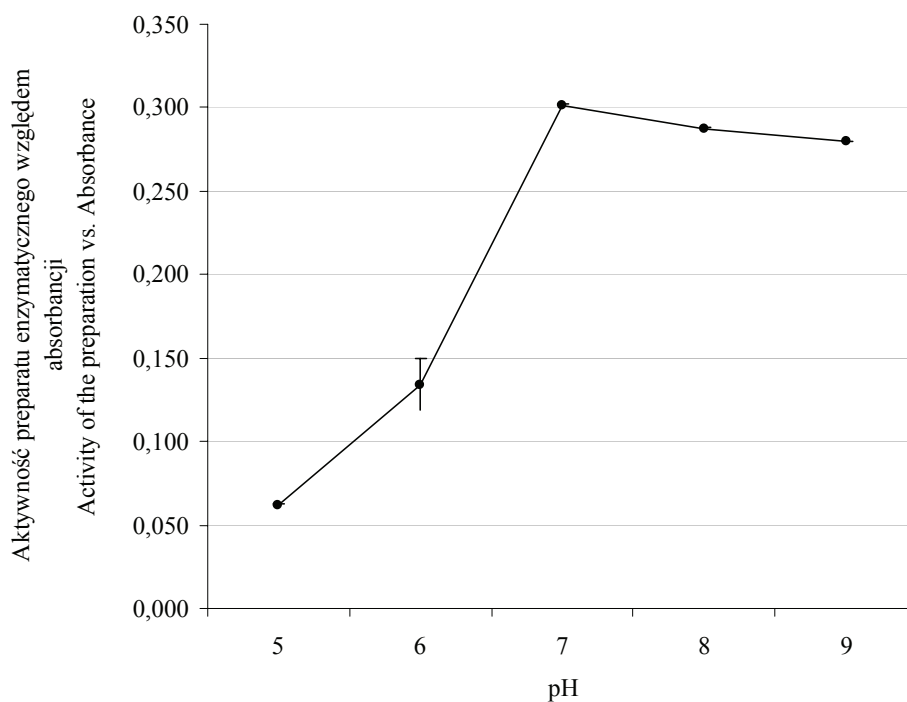
Badanie aktywności peroksydazy w środowiskach o różnym pH przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Taką samą liczbę powtórzeń zastosowano w przypadku badań procesu utleniania. Na wykresach zamieszczono wartości średnie oznaczeń oraz odchylenia standardowe w postaci znaków graficznych.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że otrzymany preparat enzymatyczny wykazywał największą aktywność przy $\text{pH} = 7$ w temp. pokojowej 23 ± 2 °C (rys. 2). Stwierdzono, że podwyższenie pH do 8 czy nawet 9 powodowało nieznaczny spadek aktywności enzymu. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi [11].

Wiadomo że korzeń chrzanu zawiera 15 różnych izoform peroksydazy, a więc otrzymany preparat jest mieszaną peroksydaz występujących w korzeniu. Nie prowadzono zabiegów oczyszczających i izolujących każdą izoformę peroksydazy chrzanowej. Literatura klasyfikuje peroksydazy występujące w korzeniu chrzanu na 3 grupy pod względem ich punktu izoelektrycznego: peroksydaza chrzanowa typu A1-A3, B1-

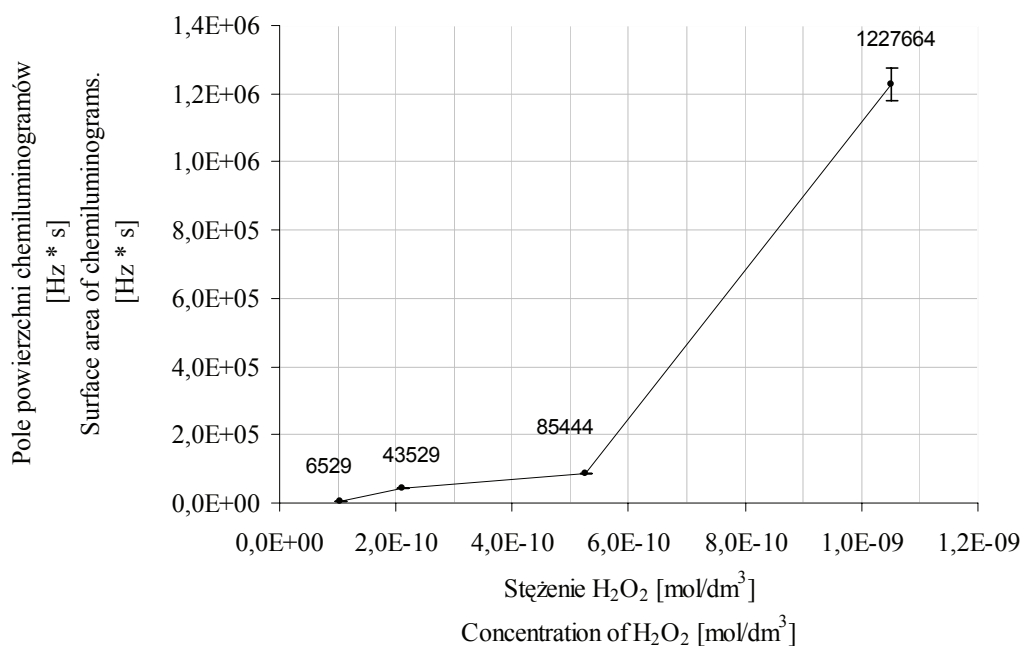
B3 i C1-C2, D i E1-E6. Ze względu na to, że każda peroksydaza ma inny punkt izoelektryczny, a tym samym i różne optimum pH, to mieszanina tych izoform ma wypadkowe optimum pH [11]. Z przeprowadzonych badań wynika, że optymalne pH wynosiło 7, a podwyższanie pH nie spowodowało znacznego obniżenia aktywności preparatu enzymatycznego, gdyż są również takie izoformy, które wykazują maksimum aktywności przy wyższych wartościach pH. Dzięki temu otrzymany preparat wykazywał wysoką aktywność również w środowisku zasadowym. Na podstawie tych wyników dobrano najodpowiedniejsze pH, w którym prowadzono reakcje chemiluminescencji układu luminol-H₂O₂-peroksydaza. Ze względu na to, że chemiluminescencja luminolu najefektywniej zachodzi w środowisku zasadowym zdecydowano, że reakcja prowadzona będzie w pH = 8 [4].



Rys. 2. Wpływ pH na aktywność peroksydazy chrzanowej.
Fig. 2. Effect of pH on the activity of horseradish peroxidase.

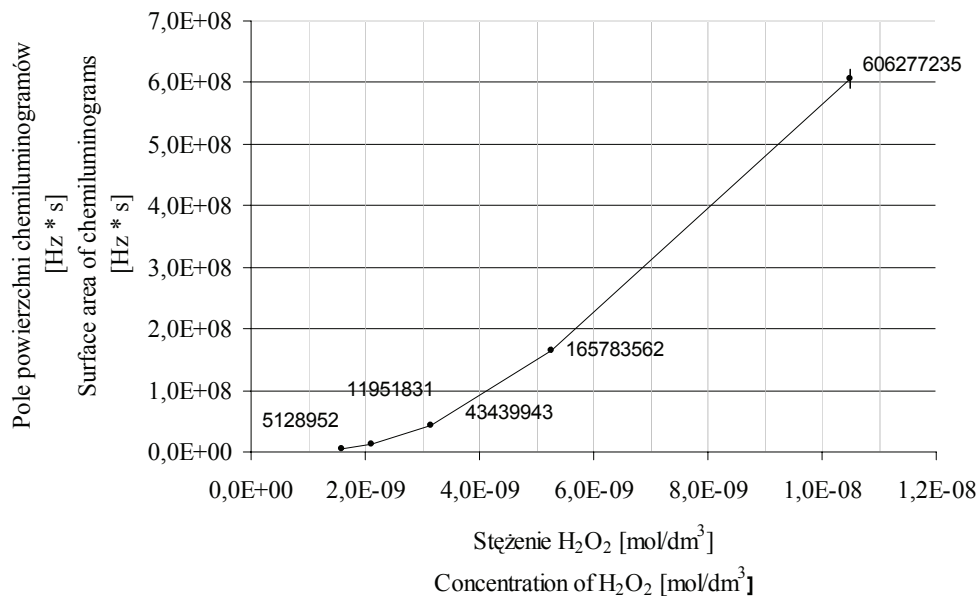
Z przeprowadzonych badań wynika, że minimalny poziom detekcji uzyskany w skonstruowanym chemiluminometry w układzie luminol-H₂O₂-peroksydaza chrzanowa wynosił $1,1 \times 10^{-10}$ mol/dm³ (rys. 3). Autorzy uzyskali poziom detekcji nadtlenu wodoru na niższym poziomie niż inni badacze w układzie luminol-H₂O₂-peroksydaza chrzanowa. Porównując uzyskany przez nas poziom detekcji z układem

$\text{HNO}_3/\text{KMnO}_4$, uważanym za jeden z prostszych i zarazem bardzo czułych systemów chemiluminescencyjnych, również uzyskano niższy poziom wykrycia nadtlenu wodoru. Na podstawie literatury stwierdzono, że w układzie $\text{HNO}_3/\text{KMnO}_4$ lub KMnO_4 w kombinacji z innym kwasem lub mieszaninami kwasów limit detekcji H_2O_2 to $6 \times 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ [1]. Stwierdzono również brak liniowej zależności między sygnałem chemiluminescencji a stężeniem nadtlenu wodoru (rys. 3 i 4). Również Dias i wsp. [4] nie uzyskali liniowej zależności między stężeniem H_2O_2 a sygnałem CL. Z danych literaturowych wynika, że w celu uzyskania liniowej zależności należy stosować chemiczne wzmacniacze chemiluminescencji np. p-jodofenol, kwas p-kumarynowy czy anilinę [2, 3, 4, 15]. Poprawę liniowości można również uzyskać poprzez ciągłą zmianę stężenia katalizatora oraz luminolu, co jest szczególnie przydatne w chemiluminescencji przepływowej.



Rys. 3. Wpływ stężenia nadtlenu wodoru na sygnał chemiluminescencji w zakresie $1,1 \times 10^{-10}$ - $1,1 \times 10^{-9} \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$.

Fig. 3. Chemiluminescence intensity vs. H_2O_2 concentration in $1,1 \times 10^{-10}$ - $1,1 \times 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$.



Rys. 4. Wpływ stężenia nadtlenu wodoru na sygnał chemiluminescencji w zakresie $1,6 \times 10^{-9}$ - $1,1 \times 10^{-8}$ mol/dm³ H₂O₂.

Fig. 4. Effect of the concentration of H₂O₂ on the chemiluminescence signal within the range from 1.6×10^{-9} to 1.1×10^{-8} mol/dm³.

Podsumowanie

Chemiluminescencja może służyć jako bardzo czuła metoda analityczna do oznaczania niskich stężeń nadtlenu wodoru. Za pomocą skonstruowanego chemiluminometru uzyskuje się powtarzalne wyniki, a zarazem istnieje możliwość wykrycia ekstremalnie niskiego stężenia nadtlenu wodoru, stosując reakcje enzymatyczne. Autorzy zaprojektowali i zbudowali bardzo czuły chemiluminometr przydatny w dalszych pracach do badania np. procesów utleniania lipidów [8].

Praca była prezentowana podczas VI Konferencji Naukowej nt. „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności”, Warszawa, 6 - 7 grudnia 2007 r.

Literatura

- [1] Adcock J. L., Francis P. S., Barnett N. W.: Acidic potassium permanganate as a chemiluminescence reagent – A review. *Anal. Chim. Acta* 2007, **601**, 36-67.

- [2] Arakawa H., Meada M., Tsuji A.: Chemiluminescence enzyme-immunoassay of cortisol using peroxidase as label. *Anal. Biochem.* 1979, **97**, 248-254.
- [3] Birman S.: Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochem. J.* 1985, **225**, 825-828.
- [4] Diaz A.N., Sanchez F.G., Garcia J.A.G.: Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: comparative studies. *Analytical Chimica Acta* 1996, **327**, 161-165.
- [5] Gracia-Sanchez F., Navas Diaz A., Gonzalez Garcia J. A.: Study of the enhanced chemiluminescence from the luminol-horseradish peroxidase-hydrogen peroxide-*p*-coumaric acid system at very short times: stopped flow selective determination of *p*-coumaric acid in beers. *Anal. Chim. Acta* 1995, **310**, 399-406.
- [6] Keilin D., Hartree E. F.: Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. *Biochem. J.* 1951, **49**, 88-104.
- [7] Kricka L. J.: Chemiluminescent and Bioluminescent Techniques. *Clin. Chem.* 1991, **37/9**, 1472-1481.
- [8] Navas M., Jimenez A. M.: Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chemistry* 1996, **55**, 7-15.
- [9] Seitz W.R.: Chemiluminescence and Bioluminescence Analysis: Fundamentals and Biomedical Applications *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1981, **13**, 1-58.
- [10] Toczko M., Grzeleńska A.: *Mat. do ćwiczeń z biochemii.* Wyd. V. Wyd. SGGW Warszawa 2001, 99-102.
- [11] Veitch N. C.: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochem.* 2004, **65**, 249-259.
- [12] Whitehead T. P., Kricka L. J., Carter T. J. N., Thorpe G. H. G.: Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 1979, **25/9**, 1531-1546.
- [13] Wu Xing-Zheng Suzuki M., Sawada T., Kitamori T.: Chemiluminescence on a microchip. *Analytical Sciences* 2000, **16**, 321-323.

DETECTING HYDROGEN PEROXIDE USING A 'CHEMILUMINOMETER' DEVICE CONSTRUCTED BY THE AUTHORS

S u m m a r y

Chemiluminescence is the emission of light quanta having definite wavelengths as a result of specific chemical reactions. Such reactions give a product in the excited state, and during an electron recombination process, the emission of electromagnetic radiation takes place.

The first objective of the project was to construct chemiluminometer, a device that could be applied to investigate various oxidation processes using chemiluminescence. The next objective of the project was to determine the minimum level at which hydrogen peroxide could be detected. With the use of the chemiluminometer constructed, the concentration level of hydrogen peroxide was analyzed in a model system. A reaction between luminol-H₂O₂ and horseradish peroxidase was used to prove whether or not the device correctly operated and if the repeatability of results could be achieved. The third objective of the project was to produce a horseradish peroxidase preparation and to determine an optimal level of pH of its reaction. The horseradish peroxidase was produced from horseradish roots using traditional isolation and initial cleaning methods. The authors had to produce their own enzymatic preparation because all the commercially available peroxidases from horseradish roots were very expensive.

It was also determined that while using the chemiluminometer constructed, the level of detecting hydrogen peroxide in the luminol-H₂O₂-peroxidase model was 1×10^{-10} mol/dm³ (3.74 ng/dm³). No linear dependence between the concentration of hydrogen peroxide and the chemiluminescence signal was found. The optimal level of pH equalling 7 (pH = 7) was determined of the isolated horseradish peroxidase.

Key words: chemiluminescence, hydrogen peroxide, luminol, horseradish peroxidase ☒