



Ảnh hưởng lớp vỏ carbon đến hoạt tính xúc tác tương tự peroxidase của vật liệu Fe_3O_4 /carbon cấu trúc lõi vỏ định hướng ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học glucose

Peroxidase-like activity of Fe_3O_4 /carbon core-shell nanostructured : effects of carbon shell thickness for application to glucose biosensor

Nguyễn Đức Nghĩa ^{1*}, Huỳnh Đăng Chính ¹, Trần Vĩnh Hoàng ¹, Đào Hồng Vũ ¹

¹ Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, Số 1 Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

* Email: nguyenducnghia1810@gmail.com

ARTICLE INFO

Received: 15/2/2021

Accepted: 16/5/2021

Keywords:

Fe_3O_4 /C cấu trúc lõi vỏ, cảm biến sinh học, glucose, glucose oxidase (GOx), 3,3,5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).

ABSTRACT

In this study, we present a protocol for synthesis of carbon coated Fe_3O_4 nanoparticles with core-shell structured nanocomposite (FeC) following a two steps approach. The peroxidase-like activity of the synthesized FeC nanocomposite has been evaluated towards replacing of the horseradish peroxidase enzyme (HRP) in hydrogen peroxide enzymatic biosensor. In which, FeC has catalyzed for a redox reaction 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and H_2O_2 to produce oxidized state of TMB with as a blue color. Results exhibited that FeC has a high catalytic activity accepting for fabrication of a high selectivity hydrogen peroxide (H_2O_2) colorimetric sensor with low detection of limit (LoD) of 0.02 mM H_2O_2 . Based on this finding, we have used FeC and combined with glucose oxidase (GOx) enzyme to construct a new colorimetric glucose biosensor with high selectivity.

Giới thiệu chung

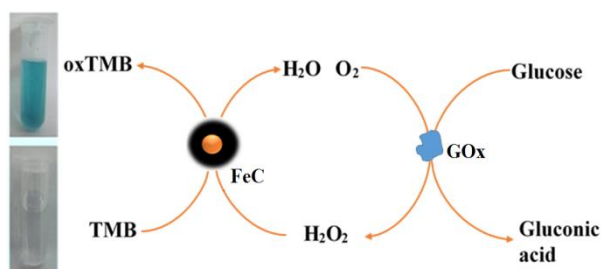
Sử dụng enzym đặc hiệu glucose oxidase (GOx) kết hợp với enzyme horseradish peroxidase (HRP) trong các thiết bị sinh hóa và bán sinh hóa là phương pháp xét nghiệm xác định glucose nhanh, chính xác cao và là tiêu chuẩn trong xét nghiệm glucose. Enzym HRP tuy có độ nhạy cao, nhưng rất khó bảo quản và đặc biệt HRP rất nhạy với ánh sáng và dễ mất hoạt tính ở nhiệt độ cao, pH acid hoặc base, các ion lạ trong dung dịch... Do đó, nghiên cứu sử dụng các vật liệu cấu trúc nano, có hoạt tính tương tự như enzym peroxidase nhằm thay thế HRP trong các phản ứng sinh hóa, trong các cảm biến sinh học được nhiều quan tâm.

Vật liệu nanocomposite Fe_3O_4 bọc carbon (ký hiệu là FeC) có cấu trúc lõi và có hoạt tính xúc tác tương tự

như enzym peroxidase đã được nhóm nghiên cứu chúng tôi báo cáo trước đây[1], tuy nhiên ảnh hưởng của cấu trúc vật liệu lên hoạt tính xúc tác cũng như ứng dụng chúng trong chế tạo cảm biến sinh học glucose chưa được báo cáo. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào các khía cạnh trên, từ đó đưa ra được tỉ lệ lõi/vỏ để vật liệu có hoạt tính cao nhất để ứng dụng thử nghiệm trong chế tạo cảm biến sinh học phân tích glucose. Cơ sở nghiên cứu hoạt tính xúc tác của vật liệu FeC thể hiện trên sơ đồ hình 1. Theo đó, vật liệu FeC có khả năng xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử giữa H_2O_2 và 3,3,5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) giống như enzyme HRP, kết quả thu được màu xanh đặc trưng của TMB ở dạng oxy hóa. Kết hợp với enzyme GOx, TMB và vật liệu FeC để tạo ra cảm biến sinh học so màu (hình 1). Kết quả nghiên cứu sẽ là đưa ra được tỉ lệ lõi/vỏ phù hợp để vật liệu có hoạt tính cao

<https://doi.org/10.51316/jca.2021.038>

nhất, ứng dụng được để chế tạo cảm biến sinh học phân tích glucose trong mẫu bệnh phẩm.



Hình 1: Sơ đồ nguyên lý sử dụng xúc tác FeC thay thế enzyme HRP trong chế tạo cảm biến sinh học so màu phân tích glucose

Thực nghiệm và phương pháp phân tích

Hóa chất

Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron(II) ammonium sulfate hexahydrate ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Natri hydroxit 2M (NaOH), acetic acid (CH_3COOH), glucose, galactose, saccharose, fructose, hydrogen peroxide solution 30% (H_2O_2) là hóa chất tinh khiết (AR) của Trung Quốc, viên đệm phosphate (PBS), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), Glucose oxidase chiết xuất từ nấm *Aspergillus niger* (GOx, 149800 U/g solid) được mua từ Sigma Aldrich. Để sử dụng GOx được pha trong đệm PBS với nồng độ 2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. TMB được pha trong cồn (ethanol) với nồng độ 20 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ để sử dụng.

Tổng hợp vật liệu carbon bọc nano sắt từ cấu trúc lõi/vỏ (FeC)

8,63 g muối $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và 11,89 g muối $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được cân vào cốc, thêm nước cất để hòa tan thành dung dịch trong suốt. Hỗn hợp được gia nhiệt lên 80°C và khuấy nhẹ. Tiếp đó, cho từ từ dung dịch NaOH 2M vào hỗn hợp trên cho đến khi pH8 và giữ ổn định ở pH này trong 60 phút. Để nguội, ly tâm lấy kết tủa, rửa lại bằng nước cất và etanol thu được hạt nano Fe_3O_4 màu đen. Nano Fe_3O_4 thu được trộn với glucose (5 g; 10 g; 15g; 25 g; 30 g; 35 g; 50 g; tương ứng với FeC11; FeC12; FeC13; FeC15; FeC17; FeC110) thêm 100 ml nước cất để hòa tan glucose. Hỗn hợp được siêu âm để phân tán Fe_3O_4 , sau đó cho vào autoclave và đem thủy nhiệt ở 140°C trong 8 giờ. Để nguội autoclave, lọc hỗn hợp thu được kết tủa màu đen. Đem rửa kết tủa bằng nước cất và etanol, sấy khô và nghiền mịn thu được vật liệu nanocomposite Fe_3O_4

bọc carbon (FeC). Xúc tác được phân tán trong nước với nồng độ 2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ để sử dụng.

Xác định hằng số động học xúc tác của vật liệu FeC với TMB và H_2O_2

Hoạt tính xúc tác của các vật liệu FeC đã tổng hợp được đánh giá qua hằng số xúc tác theo phương pháp của Michaelis – Menten[3,6] trên cơ sở phản ứng oxy hóa – khử giữa TMB và H_2O_2 theo điều kiện phản ứng đã tối ưu (môi trường pH4, nhiệt độ phản ứng 40 °C, thời gian phản ứng 30 phút) [1] nhưng với nồng độ H_2O_2 từ 0,02 mM đến 1 mM. Kết quả thu được tính toán theo nồng độ của định luật Beer-Lambert sử dụng hệ số hấp thụ phân tử là 39.000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ cho các sản phẩm oxy hóa có nguồn gốc từ TMB. Hằng số Michaelis – Menten của xúc tác (K_m) được tính toán bằng phương trình Lineweaver – Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{K_m} \cdot \frac{1}{[C]} \quad (1)$$

Trong đó v là vận tốc ban đầu của phản ứng, v_{\max} là vận tốc phản ứng cực đại, $[C]$ là nồng độ của chất nền (TMB hoặc H_2O_2) và K_m là hằng số Michaelis – Menten. Phương trình trên có thể coi là một phương trình tuyến tính có dạng $y = ax + b$ với y là $1/v$ và x là $1/[C]$. Giá trị của hằng số K_m càng nhỏ, ái lực giữa enzyme và chất nền càng mạnh[2, 3, 6] tức giá trị K_m càng nhỏ thì hoạt tính xúc tác của vật liệu càng mạnh.

Chế tạo cảm biến xác định nồng độ hydrogen peroxide (H_2O_2)

Lấy 1 ml đệm axetat (pH = 4) vào ống eppendorf, sau đó thêm vào 20 μl dung dịch FeC (2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) và 20 μl dung dịch TMB (20 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Thêm vào các ống đã chuẩn bị 100 μl dung dịch H_2O_2 có nồng độ khác nhau (từ 0,02 mM đến 0,7 mM), lắc đều bằng máy lắc rồi ủ ở 40 °C trong 30 phút. Cuối cùng, hỗn hợp trong các ống eppendorf được chuyển vào cuvet để đo độ hấp thụ UV-Vis và mật độ quang ở bước sóng 650 nm.

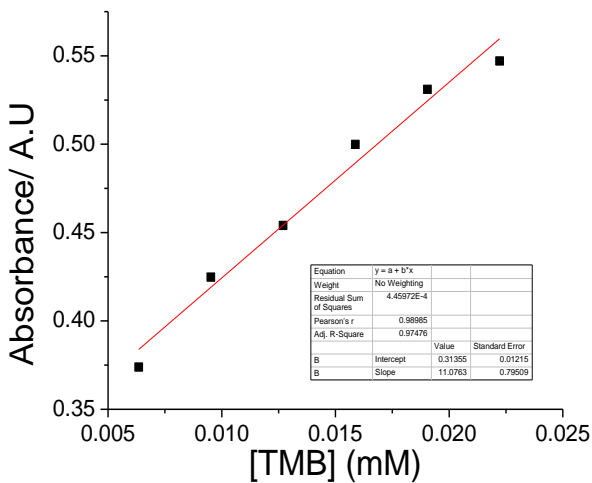
Chế tạo cảm biến sinh học phân tích nồng độ glucose

Cho 100 μl dung dịch đệm PBS (0,01 M); 100 μl dung dịch glucose (0,2 mM) và 50 μl GOx vào ống eppendorf. Hỗn hợp được lắc đều rồi ủ ở nhiệt độ 40 °C trong 30 phút. Sau đó, cho thêm 20 μl dung dịch FeC; 20 μl dung dịch TMB và 1 ml dung dịch đệm axetat (pH4) vào ống eppendorf tương ứng. Cuối cùng, hỗn hợp được ủ trong 40 °C trong 30 phút rồi chuyển đến cuvet để đo phổ UV-Vis.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của lớp vỏ carbon lên hoạt tính xúc tác tương tự peroxidase của vật liệu FeC

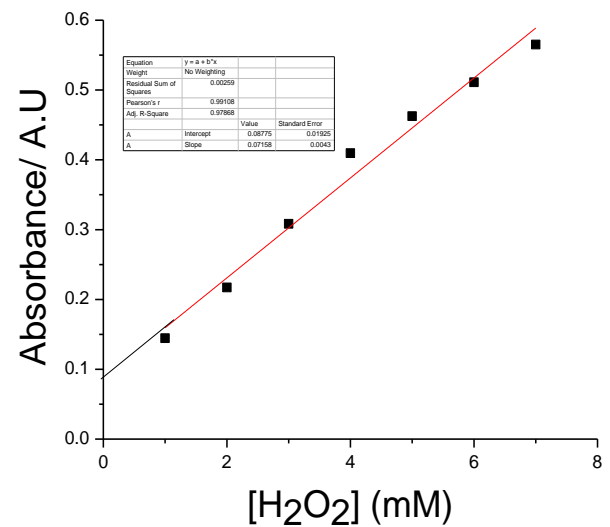
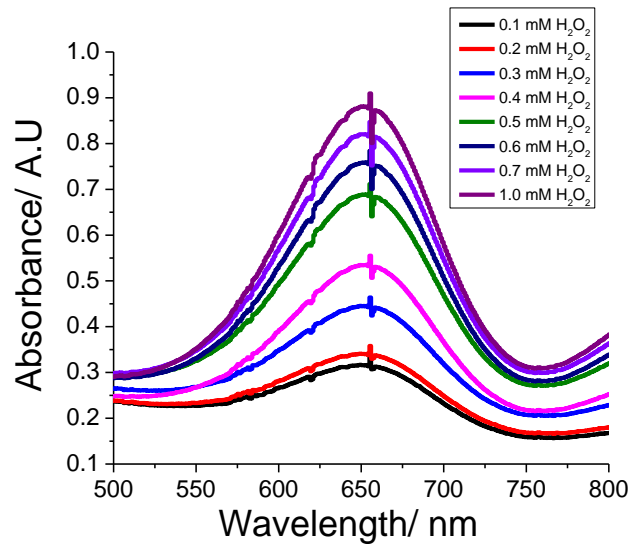
Kết quả thực nghiệm được trình bày đại diện bằng việc tính K_m đối với TMB và H_2O_2 của vật liệu FeC13, kết quả tính toán K_m của các FeC khác được xác định tương tự như mẫu FeC13. Trên hình 2 trình bày đồ thị quan hệ giữa độ hấp thụ A ở bước sóng 652 nm (A_{652}) (đặc trưng cho TMB ở dạng oxi hóa) phụ thuộc vào nồng độ TMB sử dụng để tính toán ra K_m đối với TMB của vật liệu FeC13. Tương tự như vậy nhưng với nồng độ H_2O_2 thay đổi để tính toán K_m đối với H_2O_2 của vật liệu FeC13 (phổ UV-VIs ở hình 3A và đường cong quan hệ A_{652} - $C_{H_2O_2}$ ở hình 3B). Ở hình 2 và 3B đều cho thấy khi tăng nồng độ chất phản ứng (TMB và H_2O_2) thì A_{652} tăng, chứng tỏ FeC13 xúc tác thúc đẩy phản ứng. Kết quả tính toán K_m theo phương trình (1) thể hiện trên bảng 1.



Hình 2: (A) Phổ UV-vis của cảm biến H_2O_2 với TMB nồng độ khác nhau sử dụng FeC13 làm xúc tác; (B) Đường chuẩn của TMB sử dụng để tính K_m với TMB

Theo bảng 1 khi tăng dần của hàm lượng lớp carbon bọc vỏ từ 1 đến 3 lần so với khối lượng vật liệu nano Fe_3O_4 làm lõi thì hằng số K_m đối với TMB và H_2O_2 đều giảm thể hiện hoạt tính xúc tác của vật liệu FeC tăng. Nguyên nhân là hoạt tính xúc tác của của vật liệu là do vai trò của ion Fe^{3+} (nhưng nếu nhiều ion Fe^{3+} quá như dung dịch $FeCl_3$, thì xúc tác quá mạnh và không có tính chọn lọc), khi ở dạng vật liệu FeC thì với lớp vỏ carbon chứa nhiều nhóm chức như $-OH$ hay $-COOH$ [1] nên đã tích được nhiều ion Fe^{3+} lên bề mặt hơn so với Fe_3O_4 dạng kết tủa rắn nên hoạt tính xúc tác tăng lên. Hơn nữa, khi có lớp carbon xốp thì việc hấp phụ TMB lên bề mặt cũng thuận tiện hơn và ngoài

ra lớp vỏ carbon xốp làm khả năng vận chuyển electron của vật liệu được tăng cường, dẫn tới khả năng xúc tác đối với TMB và H_2O_2 cũng được gia tăng. Tuy nhiên khi tăng lượng carbon lên rất nhiều lần (5 – 7 lần) so với khối lượng Fe_3O_4 tức lớp vỏ quá dày thì hoạt tính xúc tác lại giảm quan sát qua giá trị K_m tăng đối với cả đối với TMB và H_2O_2 ở bảng 1 đối với FeC15 và FeC17. Nguyên nhân có lẽ là do lớp vỏ quá dày nên ion Fe^{3+} không khuếch tán lên bề mặt được. Bảng 1 cũng chỉ ra giá trị tối ưu của lớp vỏ là khi tỷ lệ khối lượng nguyên liệu $m_{Fe_3O_4}/m_{glucose}$ từ 1/2 đến 1/3. Do đó trong các nghiên cứu ứng dụng sau này chúng tôi sử dụng vật liệu FeC13 làm xúc tác để thay thế enzyme HRP. Kết quả trong bảng 1 cũng thể hiện khả năng xúc tác rất tốt của FeC13 so với các vật liệu khác có hoạt tính xúc tác tương tự HRP đã được báo cáo.



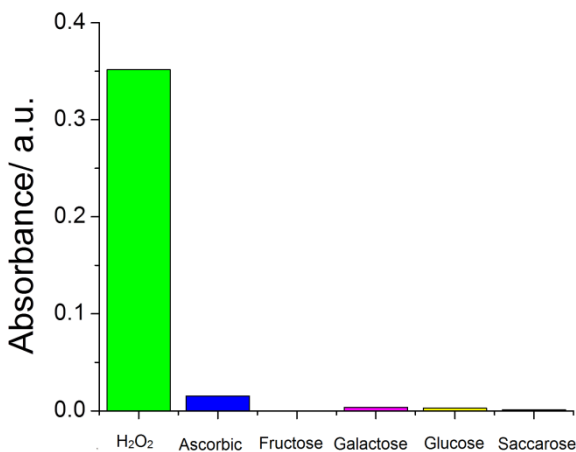
Hình 3: (A) Phổ UV-vis của cảm biến sử dụng FeC₁₃ với nồng độ H_2O_2 khác nhau (B) Đường chuẩn xác định nồng độ H_2O_2 của cảm biến

Bảng 1: Các thông số K_m đối với TMB và H_2O_2 của các mẫu xúc tác FeC và một số xúc tác đã công bố

Xúc tác	Hằng số động học K_m		Trích dẫn
	TMB	H_2O_2	
M1 ^(*)	0,093	0,051	[3]
M2 ^(*)	0,36	0,110	[4]
M3 ^(*)	0,307	323,6	[5]
M4 ^(*)	0,1	173,510	[6]
M5 ^(*)	0,22	187	[7]
M6 ^(*)	0,097	199,4	[8]
FeC11	0,087	0,086	Báo cáo này
FeC12	0,010	0,059	
FeC13	0,004	0,052	
FeC15	0,005	0,097	
FeC17	0,007	1,460	

(*) Chú thích: M1- FeOOH/N-doped carbon nanosheets; M2- 3D flower-like ferrous(II) phosphate nanostructures; M3 - Prussian blue-Fe₂O₃; M4- Co₃O₄ nanoparticles; M5- Ferritin-platinum nanoparticles và M6- Apoferritin paired gold clusters.

Chế tạo cảm biến xác định nồng độ hydrogen peroxide (H₂O₂)



Hình 4: Độ chọn lọc H₂O₂ của cảm biến với các mẫu thử glucose, ascorbic acid, galactose, saccharose, fructose

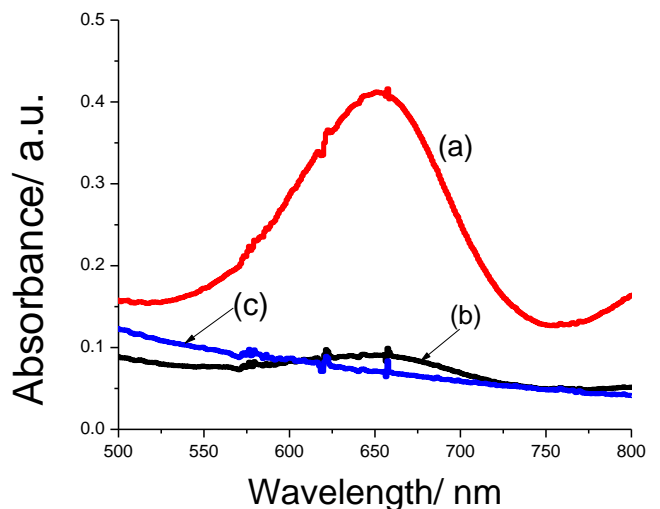
Kết quả ở trên cho thấy FeC13 đã xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử giữa TMB và H₂O₂, nồng độ H₂O₂ càng cao, TMB sẽ chuyển hóa từ dạng khử (không

màu) sang dạng oxy hóa (màu xanh) càng nhiều, dẫn đến A₆₅₂ càng tăng (hình 3A) và giá trị A₆₅₂ được dùng làm tín hiệu của cảm biến, qua đó cho đường chuẩn để phân tích H₂O₂ như trên hình 3B (nồng độ H₂O₂ thay đổi từ 0,1 mM đến 1 mM).

Để chứng minh vật liệu FeC13 chỉ xúc tác cho phản ứng giữa TMB + H₂O₂ (tức độ chọn lọc), chúng tôi sử dụng cảm biến để phân tích các mẫu thử ascorbic acid, fructose, galactose, glucose, saccharose thay vì H₂O₂ với cùng nồng độ để đánh giá phản hồi của cảm biến với các mẫu thử này và kết quả được thể hiện trên hình 4. Với các mẫu thử không phải H₂O₂, TMB không chuyển sang màu xanh, hoặc lượng này là rất thấp, ngược lại với mẫu thử H₂O₂, cường độ màu thu được cao rõ rệt. Điều này khẳng định cảm biến H₂O₂ sử dụng FeC13 có độ chọn lọc cao, có thể ứng dụng để phân tích H₂O₂ trong các mẫu dược phẩm, thực phẩm và mẫu sinh học vì H₂O₂ là sản phẩm phụ, sản phẩm trung gian quan trọng của các quá trình tổng hợp hóa học, sinh học và H₂O₂ cũng là chất bảo quản thực phẩm trong sữa tươi và H₂O₂ cũng là tác nhân sát trùng phổ biến.

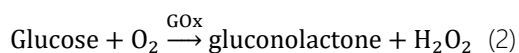
Chế tạo cảm biến sinh học glucose

Với khả năng phản hồi tuyến tính, khoảng tuyến tính phù hợp để thực hiện phân tích các mẫu thực tế, giới hạn phát hiện nhỏ, cho phép pha loãng các mẫu thực khi phân tích, giúp kết quả bớt bị ảnh hưởng bởi các tạp chất trong mẫu thực, cùng khả năng chọn lọc tốt, chứng minh cảm biến H₂O₂ phù hợp để định lượng H₂O₂ trong các mẫu thử có thể ứng dụng chế tạo cảm biến glucose.



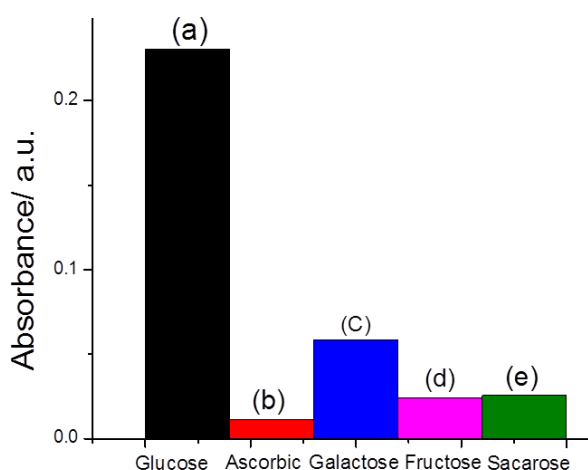
Hình 5: Phổ UV-Vis của mẫu (a) glucose + FeC13+GOx; (b) GOx+FeC13 và (c) glucose + GOx

Cụ thể như trên hình 5 (đường a) cho thấy chỉ khi có mặt cả glucose và enzyme GOx mới có phản ứng chuyển hóa glucose thành gluconic và H₂O₂ và khi trong mẫu có thêm TMB và FeC13 thì sẽ xuất hiện màu xanh và phổ UV-Vis sẽ có pic đặc trưng của TMB ở dạng oxi hóa ở bước sóng 652nm (đường a). Ngược lại nếu chỉ có glucose, enzyme GOx và TMB thì phổ UV-Vis sẽ có pic đặc trưng của TMB ở dạng oxi hóa ở bước sóng 652nm nhưng rất yếu (hình 5, đường b). Chứng tỏ H₂O₂ sinh ra do phản ứng sinh hóa (2) đã oxi hóa TMB nhưng với tốc độ và mức độ rất yếu.



Bên cạnh đó nếu mẫu chỉ có GOx + TMB + FeC13 nhưng không có glucose thì sẽ không có phản ứng (2) nên không sinh ra H₂O₂ cho phản ứng oxi hóa theo chu trình mô tả trên hình 1.

Từ các kết quả thu được chứng tỏ cơ chế mô tả trên hình 1 là phù hợp và hệ gồm GOx + TMB và FeC13 có thể sử dụng làm cảm biến sinh học để phân tích glucose. Để kiểm tra độ đặc hiệu (độ chọn lọc) của cảm biến thì chúng tôi sử dụng các loại đường khác thay thế glucose gồm ascorbic acid, galactose, saccharose, fructose cho kết quả như trên hình 6. Với mẫu phân tích có glucose thì có tín hiệu cường độ A₆₅₂ vượt trội, còn lại các loại đường như galactose, saccharose, fructose thì cho tín hiệu với cường độ bé hơn 3 lần so với tín hiệu glucose, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu (tín hiệu/nhiều >3) của cảm biến sinh học; riêng với acid ascorbic thì hoàn toàn không lên màu (A₆₅₂ ≈ 0). Kết quả này chứng tỏ cảm biến sinh học glucose có độ chọn lọc rất tốt hoàn toàn có thể sử dụng để phân tích định tính hoặc định lượng glucose.



Hình 6: Cường độ A₆₅₂ của các cảm biến khi mẫu chứa: (a) glucose; (b) acid ascorbic; (c) galactose; (d) sacarose và (e) saccarose. Nồng độ các mẫu là 0,2 mM

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát hoạt tính của các vật liệu nano sắt từ bọc carbon (FeC) trong phản ứng oxy hóa khử giữa 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) và H₂O₂ thông qua hằng số động học xúc tác của enzym (K_m) từ phương trình Michaelis – Menten. Kết quả chỉ ra vật liệu FeC được chế tạo với tỷ lệ Fe₃O₄/C là 1/3 (FeC13) có hoạt tính xúc tác cao nhất. Chúng tôi cũng đã nghiên cứu sử dụng vật liệu FeC13 để chế tạo cảm biến H₂O₂ có khoảng tuyến tính từ 0,1 mM đến 1 mM, giới hạn phát hiện 20 μM. Kết hợp với enzym glucose oxidase (GOx) chúng tôi cũng đề xuất cảm biến sinh học so màu phân tích glucose. Bước đầu chúng tôi đã khảo sát nguyên lý hoạt động, đề xuất cơ chế và cảm biến cho thấy có độ chọn lọc tốt đối với glucose và có tiềm năng ứng dụng để phân tích định tính hoặc định lượng glucose.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đức Nghĩa, H.Đ.C., Trần Vĩnh Hoàng, Tạp chí Hoá học, 57(6E1,2) (2019) 500-504.
2. Berg JM, T.J., Stryer L., Biochemistry. 5th edition (2002). WH Freeman: New York. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>
3. Tran, H.V., Nguyen, T.V., Nguyen, N. D., Piro, B., Huynh, D. C., Microchimica Acta, 185(5) (2018) 270. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2804-8>
4. Li, Z., Anderson, J. L., Talanta, 182 (2018) 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.071>
5. Zhang, X.-Q., Gong, S. W., Zhang, Y., Yang, T., Journal of Materials Chemistry, 20(24) (2010) 5110-5116. <https://doi.org/10.1039/C0JM00174K>
6. Mu, J., Wang, Y., Zhao, M., and Zhang, L., Chemical Communications, 48(19) (2012) 2540-2542. <https://doi.org/10.1039/C2CC17013B>
7. Fan, J., Yin, J. J., Ning, B., Wu, X., Hu, Y., Ferrari, M., Anderson, G. J., Zhao, Y., and Nie, G., Biomaterials, 32(6) (2011) 1611-1618. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.004>
8. Jiang, X., Sun, C., Guo, Y., Nie, G., and Xu, L., Biosensors and Bioelectronics, 64, (2015) 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.078>