

Budak B. and E. Dinckaya, L-Askorbik asit (C vitamini) Tayinine Yönelik Kalem Grafit Elektrot – Askorbat Oksidaz Temelli Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2022. 5(3). p. 611-626. DOI: 10.38001/ijlsb.1189195

L-Askorbik asit (C vitamini) Tayinine Yönelik Kalem Grafit Elektrot – Askorbat Oksidaz Temelli Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi

Burhan Budak^{*1} , Erhan Dinckaya² 

ÖZET

Bu çalışmada, biyosensör teknolojisi için özgün ve yeni bir bakış açısı katmak amacıyla PGE kullanılarak L-askorbik asit analizi için yeni bir sensör geliştirildi. Askorbat oksidaz enzimi glutaraldehid ve jelatin kullanılarak çapraz bağlandı, kalem grafit elektrot yüzeyinde tutturuldu ve geliştirilen biyosensör L-askorbik asit tayini için kullanıldı. Ölçümler amperometrik yöntem kullanılarak tüketilen oksijen miktarı ile orantısız akım değerlerindeki azalmanın belirlenmesi ile yapıldı. Tasarlanan biyosensör ile L-askorbik asit ölçümleri -0.7 V'ta amperometrik yöntem ile gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmalarından PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz modifiye biyosensör için askorbat oksidaz konsantrasyonu, glutaraldehitte bekletme süresi, jelatin miktarı ve glutaraldehit tabakalandırma sayısı sırasıyla $1,5$ U/mL, 3 dakika, 20 mg ve 3 kez olarak belirlendi. Kullanılan Potasyum fosfat tamponu (pH:7, 50 mM) ve 30°C optimum çalışma koşullarını olarak belirlendi. PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensörü için karakterizasyon çalışmalarında doğrusal tayin aralığı $25\mu\text{M}$ - $500\mu\text{M}$ bulundu. Sonuçlarına ilişkin olarak % varyasyon katsayısı (V.K) = 0,44 ve standart sapma (S.S) = $\pm 1,46$ μM olarak belirlendi. Depolama kararlılığına ilişkin yapılan denemeler sonucunda 4 haftalık sürecin sonunda %75'lik aktivitenin korunduğu tespit edildi.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

14 Ekim 2022

Kabul

30 Kasım 2022

ANAHTAR KELİMELER

Kalem grafit elektrot, askorbat oksidaz, amperometrik, biyosensör, askorbik asit

¹ Hatay Mustafa Kemal University, Hatay Vocational Health School, Department of Medical Laboratory, Hatay / Turkey

² Ege University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, İzmir / Turkey

*Corresponding Author: Burhan BUDAK, e-mail: burhanbudak_dr@hotmail.com

A New Biosensör Development Pencil on Based Graphite Electrode – Ascorbate Oxidase for Determination of L-ascorbic acid (C Vitamin)

ABSTRACT

In this study, in respect to provide an novel and inventive viewpoint, a new assay for analysis of L-ascorbic acid enhanced using PGE. Ascorbat oxidase was crosswise bounded using gluteraldehyde and gelatine, stable to the surface of pencil graphite electrode and devised biosensor used for the detection of ascorbic acid. L-ascorbic acid measuring done amperometrically at -0.7 V using the improved biosensor. For the PGE/gelatine- glutaraldehyde /ascorbate oxidase biosensor ascorbate oxidase concentration, holding time in glutaraldehyde, gelatine amount and glutaraldehyde stratifying repeat cycle determined to be 1.5 U/mL, 3minutes, 20 mg and 3 times stratification in turn after optimization works. Potassium phosphate buffer (pH:7, 50 mM) and 30°C warmth determined to procure optimum labouring conditions. After the characterization labours, 25 µM - 500 µM detection space provided to be linear for PGE/gelatine- glutaraldehyde/ascorbate oxidase biosensor. Regarding the results, the % coefficient of variation (V.K) = 0.44 and the standard deviation (S.S) = ±1.46 µM. As a result of the experiments on storage stability, it determined that 75% activity was preserved at the end of the 4-week period.

ARTICLE HISTORY

Recieved
14 October 2022
Accepted
30 November 2022

KEY WORDS

Pencil graphite electrode,
ascorbate oxidase,
amperometric,
biosensör,
ascorbic acid

Giriş

Askorbik asit, serbest radikalleri indirgeyici ve radikalleri süpürücü gibi antioksidan özelliklere sahip olduğundan dolayı hücrelerde hayati fonksiyon gösteren yaygın bir vitamindir [1-4]. Vitamin C olarak bilinen L-askorbik asit (AA), doğal yolla oluşan bir organik bileşiktir ve gıdalarda bulunan önemli bir besin koruyucusudur. Yaşlanmayı geciktirmede, gen regülasyonunu düzenlenmesinde, aterosklerozun azaltılmasında, kollajen biyosentezinin düzenlenmesinde ve kolesterol metabolizmasında önemli bir biyolojik rolü vardır. Ayrıca kalp damar hastalıkları ve kanser gibi ciddi hastalıkların önlenmesinde hayati bir role sahiptir [4-9]. Ancak insan vücudunda askorbik asit sentezlenmez ve vücutta depolanmaz. Bu nedenlerden dolayı günlük gerekli miktarlarda düzenli olarak C vitamini alınmalıdır [10].

Literatüre göre, askorbik asitin elektrokimyasal oksidasyonu altın, karbon, platin, paladyum ve polianilin gibi iletken polimerler gibi çeşitli elektrotlarla analiz edildi. İletim polimerleri, iyi elektrokimyasal, yüksek elektriksel iletkenlik ve çevresel kararlılık gibi önemli özellikleri nedeniyle araştırmacılar için özel bir ilgi kaynağıdır [11-14].

Ascorbat oksidaz (AA-Ox) bir tür çoklu bakır oksidaz ailesinde yer alır ve AA-Ox, askorbik asidin dehidroaskorbik aside (DHAA) oksidasyonunu katalize eder [15]. Bitkilerde, AA-Ox hem sitoplazmada serbest halde hem de hücre duvarında sınırlı bir zara bağlı bir halde bulunur. Ascorbat oksidaz bitki hücrelerinin oksidasyon durumunu

düzenler [15,16]. Şimdiye kadar Askorbat oksidazı tespit eden bazı yöntemler vardır. Bunlar kromatografi, elektrokimya, kemilüminesans kolorimetri ve floresan yöntemleridir [17-23].

L-Askorbik asidin oksidasyonunu katalize eden askorbat oksidaz enzimine dayalı bazı biyosensörler geliştirildi. Bu biyosensörler genellikle amperometriktir ve biyosensör üretiminde askorbat oksidaz enziminin çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanıldı. [24-31]. Amperometrik biyosensörler çok hızlı, ucuz ve spesifiktirler. Bu cihazlar, şarap endüstrisinde sıklıkla kullanılır. Şarap gibi organik asitleri spesifik olarak algılar ve ölçerler. Bu yöntemlere kıyasla, kalem grafit elektrot rahat ulaşılabilir, ucuz, kolay modifikasyon olabilme, yüksek elektrokimyasal aktivite ve minyatürize edilebilme gibi kolaylıklarından dolayı hem elektrokimyasal sensör tasarımında hem de DNA etkileşimlerine dayalı biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılır.[32]

Gulsah Congur vd. PGE (kalem grafit elektrot yüzeyi) için süksinamik asit kullanılarak yapısını değiştirdiler. Bu sayede işlevselleşmiş ikinci nesil poli (amidoamin) G2-PS dendrimer yapısına sahip tek kullanımlık elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirdiler [33]. Abdel-Nasser Kawde vd. İse enzimatik olmayan (non enzimatik) platin nanopartikül yapıyı modifiye PGE (kalem grafit elektrot) (PtNP-GPE) geliştirdiler ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ölçümlerini yapmayı ve belirlemeyi amaçladılar [34].

Bu çalışmada, enzimin kalem grafit elektroduna immobilizasyonu, biyosensör kararlılığını arttırmış ve daha düşük konsantrasyonlarda ölçüm hassasiyeti sağlamıştır. Ayrıca maliyeti düşük ve taşıma kolaylığı sağlamıştır. Bu çalışmadaki veriler, diğer çalışmalar için enzimlerin kalem grafit sensöründe kullanılmasına referans oluşturabilecektir.

Materyal ve Metot

Ekipmanlar

Çalışmalarda potansiyostat (IVIUM Compactstat), manyetik karıştırıcı(IKA-KIMO 2), Kalem(Rotring), Termostat(Lauda ecoline RE106), 0,5 grafit uç(Magnum) kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi.

Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda KH_2PO_4 , glutaraldehit, jelatin, NaOH, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit, L-askorbik asit, Tris, glutamik asit, aspartik asit ve diğer

kimyasallar Sigma'dan (ABD) satın alındı. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler saf su ile hazırlandı.

Çözeltiler

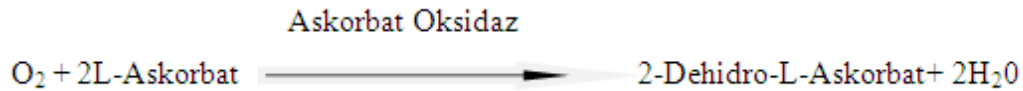
DeneySEL çalışmalarında potasyum fosfat tamponları (pH: 6.0-8.0; 25mM, 50mM ve 75mM), askorbat oksidaz (0,5U/mL, 1U/mL ve 1,5U/mL), glutaraldehit (% 1,25, % 2 ,5 ve %5), askorbik asit (40mM), sodyum fosfat tamponları (pH 7; 50mM), Redoxon tablet (1000 mg C vitamini) ve diğer kimyasallar saf su ile hazırlandı.

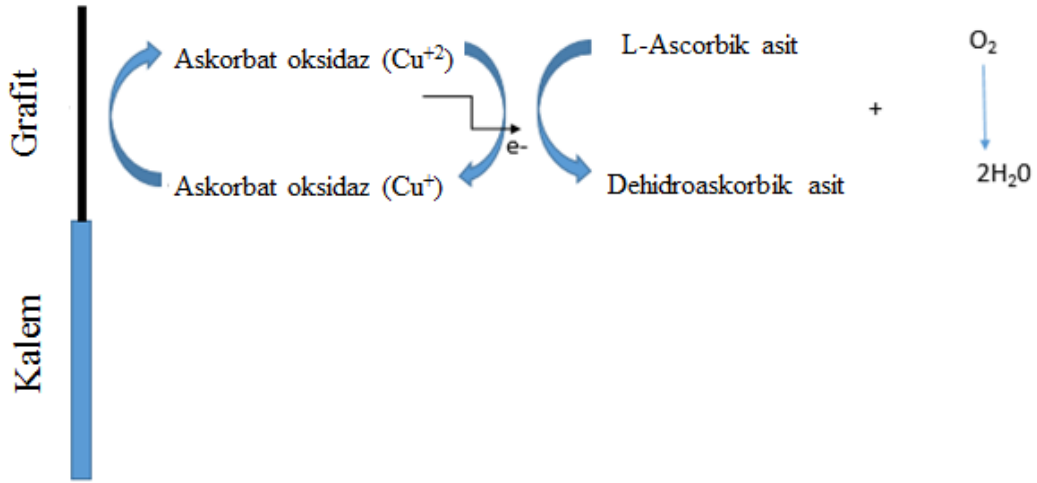
PGE/jelatin-glutaraldehit /askorbat oksidaz modifiye biyosensörün hazırlanması

PGE (Kalem grafit elektrot)'un grafit kısmı yaklaşık 1,5 cm dışarıda kalacak şekilde kalem elektrota yerleştirildi. PGE, 50 mM 200 µL pH fosfat tamponu içerisinde 1,5 U/mL olacak şekilde L-askorbat oksidaz enzimi ve 20 mg jelatin içeren 40 °C' de hazırlanmış enzim çözeltisi içerisine daldırılıp çıkartıldı. Daha sonra % 2,5 lük glutaraldehite 3dk bekletildi. Glutaraldehit ve enzim çözeltisine daldırma işlemi 3 kez tekrar edildi. Modifiye biyosensör kullanılmadığı zamanlarda + 4 °C sıcaklık da buzdolabında saklandı.

Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibi

Hazırlanan biyosensörün çalışma ilkesi, ölçüm hücresinde bulunan oksijenin azalmasına dayalı ve amperometrik olarak -0,7 V potansiyelde ölçüm alınması esasına dayanır. Kalem grafit ucuna immobilize edilen askorbat oksidaz enzimi, askorbik asitten 2 elektronun oksijene aktarılmasını sağlar. Bu sayede askorbik asit dehidroaskorbik aside yükseltgenirken, oksijende suya indirgenir ve ortamdaki oksijen azalması gerçekleşir. Kapalı kap içerisinde ölçümler alındığından dolayı ortamdaki oksijen miktarı sadece enzimin dönüştürdüğü askorbik asit oranında değişkenlik gösterir. Kalem grafit yüzeyindeki askorbat oksidaz enziminin askorbik asidi dönüştürme mekanizması Şekil 1'de gösterildi.





Şekil 1 Kalem grafit elektrodun yüzeyine sabitlenmiş askorbat oksidaz enziminin çözelti içerisindeki L-askorbik asidi dehidroaskorbik aside dönüştürmesi.

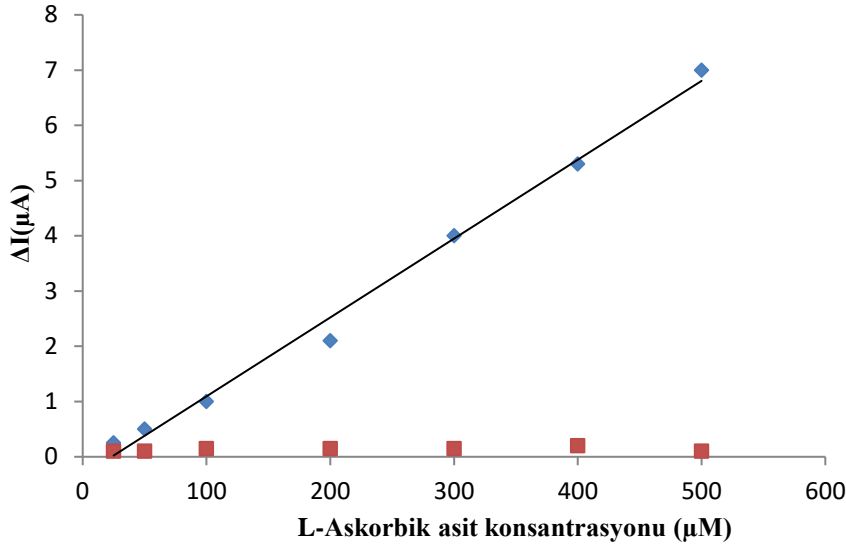
Fig 1 The conversion to dehydroascorbic of L-ascorbic acid in the solution by the enzyme ascorbate oxidase fixed on the surface of the pencil graphite electrode.

Sonuçlar ve Bulgular

Enzim İmmobilizasyon Etkisi

Öncelikle geliştirilen kalem grafit biyosensör ile elde edilen sinyallerin enzimatik reaksiyon kaynaklı olduğunun doğrulanması amacıyla PGE/glutaraldehit/jelatin ile PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz elektrotlar kıyaslandı ve alınan sinyallerin askorbat oksidaz enziminden kaynaklandığı doğrulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 2’de gösterildi.

Ölçüm sonuçlarında anlaşıldığı gibi enzim bulunmayan elektrot ile enzim bulunan biyosensör arasında büyük bir sinyal farklılığı vardır. Ayrıca enzim içeren elektrotta ortamda bulunan substrat ile orantılı bir sinyal farklanmasının olması enzimin sinyal üzerindeki etkisini ortaya koydu.



Şekil 2 Enzimli ve enzimsiz elektrotun biyosensör yanıtına etkisi. (Fosfat tamponu; pH 7.0, 50 mM; T:30 °C), (◆) PGE/jelatin-askorbat oksidaz/glutaraldehit ($R^2 = 0,9927$); (■) PGE/jelatin/glutaraldehit

Fig 2 The effect of between enzymes and without enzymes electrode on the biosensor response. (Phosphate buffer; pH 7.0, 50 mM; T:30 °C), (◆) PGE/gelatin/L-ascorbate oxidase/glutaraldehyde ($R^2 = 0,9927$); (■) PGE/gelatine/glutaraldehyde

Kalem Grafit Biyosensöründe Enzim Miktarının Optimizasyonu

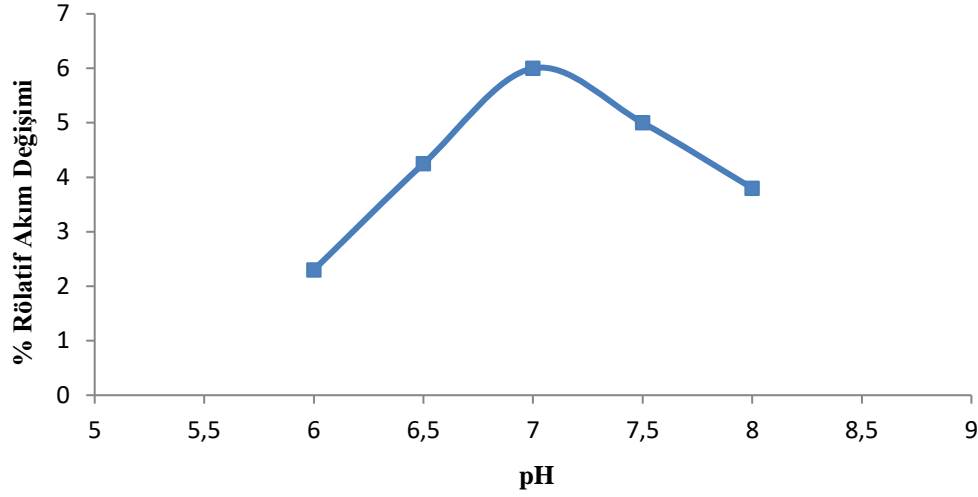
Yapılan ölçümler pH 7, 50mM fosfat tamponu içerisinde 30°C' de alındı. 20mg jelatin, % 2,5'luk glutaraldehitte 3 dk bekletme süresi sabit tutularak enzim miktarı (1, 1,5 ve 2 U/mL) olarak şekilde değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi ve kullanılan askorbat oksidaz enzim (U/mL) miktarının modifiye biyosensör cevabı üzerindeki etkisi tespit edildi.

Ölçümler sonrası elde edilen yanıtlara göre en yüksek elektrot cevabının 1,5 U/ml ve 1 U/mL askorbat oksidaz enzim kullanılarak hazırlanan biyosensörler olduğu tespit edildi. İki biyosensörde alınan cevapların bir birine yakın olmasına rağmen düşük enzim miktarında substrat doygunluğuna çabuk ulaşabileceği için düşük enzim miktarları tercih edilmedi. Ayrıca diğer bir faktör ise, protein içeriğinin düşük olması çapraz bağ sayısını ve membran kararlılığını olumsuz etkileyeceğinden enzim miktarı fazla olan biyosensör tercih edildi.

Kalem grafit biyosensöründe pH optimizasyonu

PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz modifiye biyosensör 20 mg jelatin, 1,5 U/mL enzimi çözeltisi kullanarak %2,5'luk glutaraldehitte 3 dk bekletilerek hazırlandı.

Ölçümler 50 mM fosfat tamponu içerisinde 30°C’ de alındı. Jelatin miktarı, enzim miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi sabit tutularak pH 8; 7,5; 7; 6,5; 6 aralığı değiştirilerek optimum pH 7 olarak belirlendi. Sonuçlar Şekilde 3’de gösterildi.



Şekil 3 Biyosensör cevabına pH’nın etkisi. (Fosfat tamponu; pH 7.0, 50 mM; T:30 °C)

Fig 3 The effect of pH on the biosensor response. (Phosphate buffer; pH 7.0, 50mM; T:30 °C)

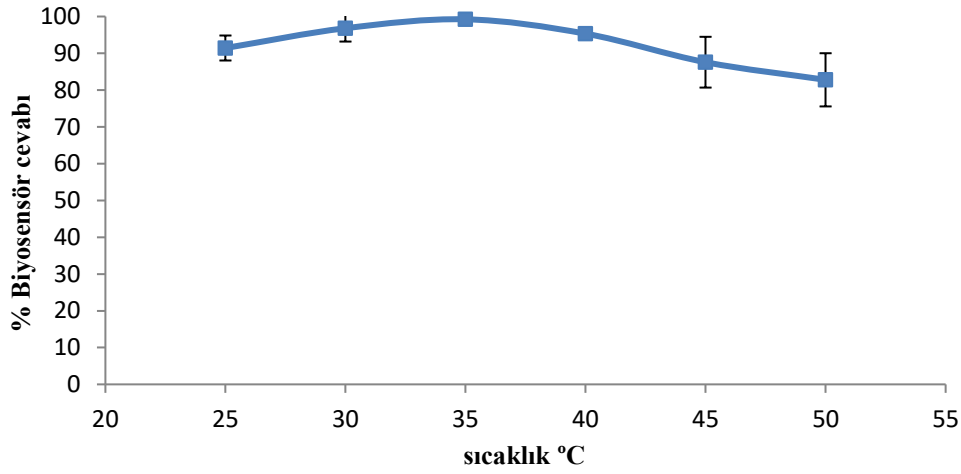
Enzimlerin katalitik etkisine ve üç boyutlu yapısına etki eden en önemli faktörlerden bir tanesi pH’dır. Enzimler protein yapılı makromoleküllerdir. Optimum pH’ın belirlenmesi, enzimlerin immobilizasyonun ve ölçümlerin verimliliği açısından önemlidir.

En iyi sinyal pH 7 de alındı. Yüksek asitlik ya da bazlık değerlerinde H⁺ ve OH⁻ konsantrasyonlarının yüksek olması enzimle etkileşime girip aktif merkezini etkileyebilir. Hatta enzimi denatüre edebilir.

Sıcaklığın Kalem Grafit Biyosensör Üzerindeki Etkisi

PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz modifiye biyosensör 20 mg jelatin, 1,5 U/mL enzimi çözeltisi kullanarak %2,5’luk glutaraldehitte 3 dk bekletilerek hazırlandı. Membran tabakalandırma işlemi 3 kez gerçekleştirildi. Ölçümler değişen sıcaklıklarda pH 7, 50mM potasyum fosfat tamponu içerisinde de alındı. Analiz Bulguları Şekil 4’de gösterildi.

Jelatin miktarı, enzim miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi, tampon konsantrasyonu ve pH sabit tutularak sıcaklık (50 °C, 45 °C, 40 °C, 35°C, 30°C ve 25°C) olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4 Biyosensör yanıtına sıcaklığın etkisi. (Fosfat tamponu; pH 7.0, 50mM;)

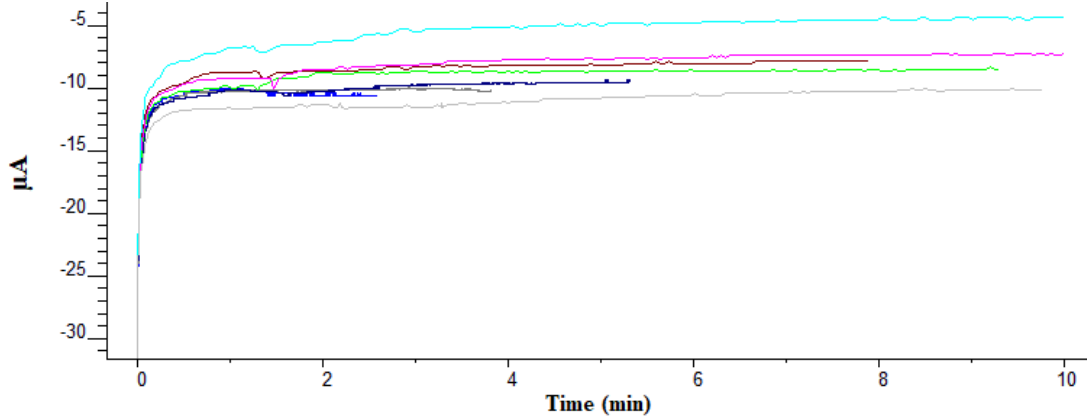
Fig 4 Effect of temperature on biosensor response. (Phosphate buffer; pH 7.0, 50mM;)

Şekil 4’ de görüldüğü gibi en yüksek sinyal 35°C sıcaklığında alındı. Fakat yüksek sıcaklık değerlerine doğru çıkıldıkça enzimin doğası gereği kararlılığı düşmektedir. Bundan dolayı hem 35°C hem de 30°C değerlerinde standart grafiği çizildi. Elde edilen değerlerin kıyaslanması sonucu 30°C değerinin seçilmesinde karar kılındı.

L-askorbik asidin Lineer Aralığı

Geliştirilen PGE/jelatin-askorbat oksidaz /glutaraldehit biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla L-askorbik asit için ölçüm aralığı belirlendi. Şekil 5’de 25 µM - 500 µM arası kronoamperometrik ölçümler ve PGE/jelatin-askorbat oksidaz /glutaraldehit modifiye biyosensörüne ilişkin doğrusal tayin aralık grafiği verildi.

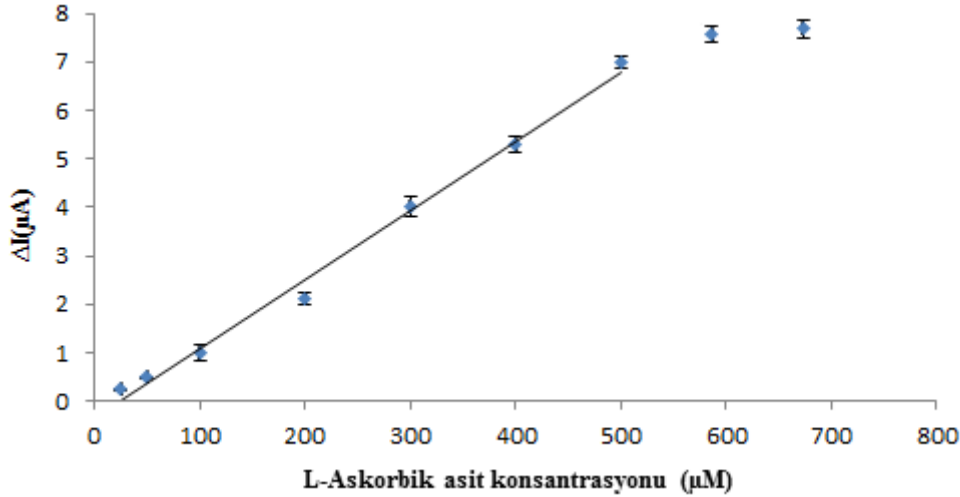
PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz modifiye biyosensör 20 mg jelatin, 1,5 U/mL enzimi çözeltisi kullanarak %2,5’luk glutaraldehitte 3 dk bekletilerek hazırlandı. Membran abakalandırma işlemi 3 kez yapıldı. Ölçümler 50 mM, pH 7, 50 mM fosfat tamponu içerisinde de 30°C sıcaklığında alındı.



Şekil 5 Karıştırılan potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içinde kalem grafit biyosensörünün amperometrik tepkileri. Uygulanan potansiyel: - 0,7 Voltaj. (A) 25µM-500 µM L-Askorbik asidin amperometrik yanıtı ve (B) akım ile L-Askorbik asit konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon eğrisi ($R^2 = 0,9927$)

Fig 5 Typical amperometric responses of the pencil graphite biosensor in a blended potassium phosphate buffer (pH 7, 50 mM). Applied potential: - 0.7 Voltage. (A) Amperometric response of 25µM-500 µM L-Ascorbic acid and (B) calibration curve between the current and the concentration of L-Ascorbic acid ($R^2 = 0.9927$)

Şekil 5’de anlaşıldığı gibi artan yüksek L-askorbik asit derişimine bağılı olarak enzimin gösterdiği reaksiyon sonucunda zaman bağılı azalan O_2 miktarı artar. O_2 miktarındaki bu azalış kalem elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyon uyarınca amperometrik ölçümlerde pozitif yönde doğrusal artış olarak gözlemlendi.



Şekil 6 Biyosensör yanıtında 30°C’de elde edilen doğrusal tayin aralığı. (Fosfat tamponu; pH 7.0, 50 mM; T:30 °C)

Fig 6 Linear detection range obtained of 30°C on the biosensor response. (Phosphate buffer; pH 7.0, 50 mM; T:30 °C)

Şekil 6'dan anlaşıldığı gibi PGE/jelatin-askorbat oksidaz/glutaraldehit biyosensörüne ilişkin doğrusal tayin aralığı 25 µM - 700 µM arasında yapılan ölçümler (n=3) sonucunda 25 µM – 500 µM olarak bulundu.

Tekrarlanabilirlik

Bu çalışmada tasarlanan L-askorbik asit biyosensörünün tekrarlanabilirlik özelliği incelendi. Ölçüm haznesi içerisinde 300 µM askorbik asit olacak şekilde eklemeler yapılarak ölçümler -0,7 voltajda amperometri yöntemi kullanılarak potasyum fosfat tamponu (pH 7, 50 mM; 30° C)'de gerçekleştirildi. Art arda sekiz kez alınan ölçümler ve elde edilen sonuçlara göre çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri tespit edildi. Standart sapma (S.S), ortalama değer (\bar{x}) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) Tablo 1'de verildi. Elde edilen sonuçlar kabul edilebilir değerlerdedir.

Tablo 1 L-Askorbik asit numunesi için kalem grafit biyosensörünün tekrarlanabilirlik tayini

Table 1 Repeatability determination of the pencil graphite biosensor for Ascorbic acid sample

Aritmetik ortalama (\bar{x})	Standart sapma (S.D)	Varyasyon katsayısı (%)
327 µM	±1,46 µM	0,44

Yeniden üretilebilirlik

Bu çalışmada benzer yöntemle PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz ayrı üç biyosensör hazırlandı ve -0,7V'ta amperometri yöntemiyle yapılan ölçümlerde 300 µM askorbat konsantrasyonuna verdiği cevaplar kıyaslandı.

Aynı yöntemle ayrı ayrı hazırlanmış üç PGE/jelatin-glutaraldehit /askorbat oksidaz biyosensörün L-askorbik asit konsantrasyonuna verdiği cevaplar arasında benzerlik vardır. Sonuçlar biyosensör için seri üretim yapılabileceğini gösterdi.

Biyosensörün Substrat Seçiciliği

Bu çalışmada benzer yöntemle PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensör hazırlandı ve -0,7V'ta amperometri yöntemiyle yapılan ölçümlerde 300 µM askorbat konsantrasyonunda ve farklı dokuz substrata ayrı bir şekilde verdiği yanıtlar kıyaslandı. Elde edilen bulgular Tablo 2'de gösterildi.

PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensör 20 mg jelatin, 1,5 U/mL enzimi çözeltisi kullanarak %2,5'luk glutaraldehitte 3 dk bekletilerek hazırlandı. Membran

tabakalandırma işlemi 3 kez yapıldı. Ölçümler pH 7, 50 mM fosfat tamponu içerisinde 30°C sıcaklığında alındı.

Tablo 2 L-Askorbik asit numunesi ve diğer numuneler için kalem grafit biyosensörünün substrat aktivitesi

Table 2 Relative activity of the pencil graphite biosensor for L-Ascorbic acid sample and other samples

Substratlar	Rölatif aktivite %
L-Askorbik asit	100
Sitrik asit	0,1
Hidrokinon	10,1
D-Glukoz	0,1
D- Fruktoz	9,8
Okzalik asit	0,3
Glikolik asit	0
Aspartik asit	0,2
Glutamik asit	9,85
Kateşol	16,2

Üç ölçümün ortalaması.

Tablo 2’de anlaşıldığı gibi PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensörün dokuz tane farklı substrattan sadece dört tanesine düşük sinyal verdiği gözlemlendi.

Örnek Analizi

Tasarlanan PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensör ile dışarıdan satın alınan Redoxon C vitamini ilacında, taze sıkılmış limon suyunda, portakal suyunda ve greylfurt suyunda L-askorbik asit analiz yapıldı.

Satın alınan C vitamini (1000mg) tabletinin çözündüğü çözeltiden ölçüm hücresinde 300 µM konsantrasyon olacak şekilde eklemeler yapıldı ve dört ölçüme ilişkin alınan cevaplar standart grafiği ile kıyaslanarak değerlendirilmesi yapıldı. Bulgular Tablo 3’de verildi.

Tablo 3 Kalem grafit - askorbat oksidaz enzim biyosensörü ve DCIP yöntemleri kullanılarak Vitamin-C tabletlerinde L-Askorbik asit tayini.

Table 3 L-Ascorbic acid determination in Vitamin-C tablets by using the pencil graphite – ascorbate oxidase enzyme biosensor and DCIP methods.

Örnek	Askorbik asit konsantrasyonu (µM)	DCIP yöntemi (n=4)		Askorbat oksidaz biyosensörü (n=4)	
		SD	CV (%)	SD	CV(%)
Redoxon Tablet	300	±7,8	2,55	±0,262	0,087
		X _{ort} =305µM		X _{ort} =301,62µM	

İnsan metabolizmasının gereksinimi olan C vitamini farklı sebeplere bağlı olarak 30–105 mg arasında değişiklik göstermektedir. Bu değer yetişkinler için 65 mg, bebekler için 35-40 mg, emzirme döneminde anneler için 100-110 mg olacak şekilde ön görülmüştür. Yapılan epidemiojik, klinik ve biyokimyasal çalışmalar göz önünde bulundurularak askorbik asidin günlük alımı (RDA) günde 120-140 mg olarak önerilmektedir. Günlük ihtiyacını giderecek kadar vitamin C alındığında hücre doyumluğa ulaşır, kanser, kalp hastalıkları ve felç riskleri azalma gösterir. Bu değerler dikkate alınarak yapılacak ölçümler için 1000 mg C vitamini tableti kullanıldı. Ölçümler -0,7 V'ta amperometri yöntemi kullanılarak pH 7, 50mM fosfat tamponu; 30 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Bulgular Tablo 3'de ve 4'de verildi.

Tablo 4 Kalem grafit-askorbat oksidaz enzim biyosensörü kullanılarak meyve sularında L-askorbik asit tayini

Table L-Ascorbic acid determination in fruit juices by using the pencil graphite – ascorbate oxidase enzyme biosensor

Meyve suları	Askorbat oksidaz biyosensörü		
	Ortalama (mg/100ml) (n=4)	SD	CV(%)
Portakal	38,3	0,041	0,107
Greyfurt	28,2	0,029	0,102
Limon	28,3	0,028	0,098

Meyvelerde bulunan askorbik asit miktarı meyvenin çeşitliliğine göre önemli farklılık göstermektedir. Yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerin yaklaşık 12mg-110mg/100g düzeylerinde askorbik asit içermelerine rağmen, limon, greyfurt ve portakal yaklaşık 35mg - 55mg/100g düzeylerinde vitamin C içermektedirler. Fakat bu değerler meyvelerin türüne göre de değişiklik gösterebilmektedir.

Tartışma

Bu çalışma, insan vücudunda sentezlenmeyen ve dışarıdan sürekli düzenli olarak alması gereken C vitaminin (askorbik asit) [35] sıvılarda kolay, hızlı ve hassas tespiti için tasarlandı ve kalem grafit elektroda enzim/jelatin/glutaraldehit yapısı kullanıldı.

Kalem grafit elektrot genel olarak affinite esaslı DNA etkileşimlerine dayalı ve elektrokimyasal sensörler olarak kullanılmıştır [36]. İlk kez bu çalışmada, kalem grafit

elektrot enzim (askorbat oksidaz) temelli biyosensör tasarlanmış, kullanım yönü araştırılmış ve denenmiştir.

Song ve ark. (2020) [37] geliştirdikleri grafen oksit/poli (anilin ko-tionin) nanokompozit elektrokimyasal biyosensöründe, L-askorbik asitin lineer aralığını $500\mu\text{M} - 5000\mu\text{M}$, hassasiyetini $242\mu\text{M}$ olarak tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışmada kullanılan PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz biyosensörünün L-askorbik asitin lineer aralığı $25\mu\text{M} - 500\mu\text{M}$, hassasiyeti $25\mu\text{M}$ olarak tespit edildi. Buda geliştirdiğimiz kalem grafit askorbat oksidaz biyosensörünün düşük konsantrasyonlar da daha hassas ölçümler yaptığını göstermiştir. Geliştirilen biyosensör sistemleriyle ölçümler $-0,7$ voltajda amperometrik metotla yapılmıştır. Enzim tarafından kullanılan L-askorbik asit konsantrasyonu ile orantısal olarak kullanılan oksijen miktarının negatif yönde artan akım değerlerinden çıkılarak tayin edilmiştir.

Kaçar ve Erden (2020) [38] geliştirdikleri poli(L-aspartik asit), nanoelmas parçacıklı, karbon fiber, askorbat oksidaz temelli amperometrik biyosensörünün, askorbik asitin tekrarlanabilirlik denemelerinde standart sapmasını 3.4% tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan PGE/jelatin-glutaraldehit/askorbat oksidaz temelli biyosensörünün L-askorbik asitin tekrarlanabilirlik denemelerinde standart sapması 0.44% tespit edildi. Buda geliştirdiğimiz biyosensörün diğer sensörlere kıyasla artarda daha hassas ve doğru ölçümler yapabileceğini göstermiştir.

Mu ve ark. (2018) [39] geliştirdikleri askorbik asit tayinine yönelik kolorimetrik ‘‘kapalı’’ biyosensöründe, portakal suyunun askorbik asit analizinde standart sapmasını 1.9% tespit etmişlerdir. Çalışmalarında yer alan HPLC analiz verilerinde ise ortalama bağıl hata oranı 3.3% göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan kalem grafit askorbat oksidaz temelli modifiye biyosensörün portakal suyunun askorbik asit analizinde standart sapma 0.107% tespit edildi. Bu değerler geliştirdiğimiz biyosensörün diğer sensörlere ve klasik yöntemlere kıyasla meyve sularında askorbik asitin daha hassas ve doğru tespit edileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, kalem grafit elektrotların L-askorbik asit tayini için askorbat oksidazın kullanıldığı biyosensörlerin hazırlanmasında ve kullanılmasında genelde ise enzim temelli biyosensörlerin hazırlanmasında başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Kaynaklar

1. Abd-Allah, H., et al., Nicotinamide and ascorbic acid nanoparticles against the hepatic insult induced in rats by high fat high fructose diet: A comparative study, *Life Sciences*, 2020. 263. p. 118540.
2. El-Gendy, Z.A., et al., Potential hepatoprotective effect of combining vitamin C and l-carnitine against acetaminophen induced hepatic injury and oxidative stress in rats, *International Journal of PharmaTech Research*, 2016. 9. p. 33–47.
3. Abdulrazzaq, A.M., et al., Hepatoprotective Actions of Ascorbic Acid, Alpha Lipoic Acid and Silymarin or Their Combination Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats, *Medicina (B. Aires)*, 2019. 55. p. 181.
4. Zou, M.Y., et al., Ascorbic acid induced degradation of polysaccharide from natural products: a review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. 151. p. 483–491.
5. Valko, M., et al., Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease, *Archives of Toxicology*, 2016. 90. p. 1–37.
6. Schoenfeld, J.D., et al., Redox active metals and H₂O₂ mediate the increased efficacy of pharmacological ascorbate in combination with gemcitabine or radiation in pre-clinical sarcoma models, *Redox Biology*, 2018. 14. p. 417–422.
7. Du, J., Cullen, J.J., and Buettner, G.R., Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2012. 1826. p. 443–457.
8. Minor, E.A., et al., Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine, *Journal Biological Chemistry*, 2013. 288. p. 13669–13674.
9. Moser, M. and Chun, O., Vitamin C and Heart Health: A Review Based on Findings from Epidemiologic Studies, *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17. p. 1328.
10. Karakurt, I., et al., Stereolithography (SLA) 3D printing of ascorbic acid loaded hydrogels: A controlled release study, *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. 584. p. 1–9.
11. Lin, W., et al., Hemin-intercalated layer-by-layer electropolymerized co-deposition of bisphenol A on carbon nanotubes for dual electrocatalysis towards ascorbate oxidation and oxygen reduction, *Electrochimica Acta*, 2020. 340. p. 135946.
12. Rueda, M., Aldaz, A. and Sanchez-Burgos, F., Oxidation of L-ascorbic acid on a gold electrode, *Electrochimica Acta*, 1978. 23. p. 419–424.
13. Mondal, S. K., et al., Electrooxidation of ascorbic acid on polyaniline and its implications to fuel cells, *Journal Power Sources*, 2005. 145. p. 16–20.
14. Osial, M., et al., Hybrid polyindole-gold nanobrush for electrochemical oxidation of ascorbic acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020. 877.
15. Zhang, J., et al., Determination of ascorbic acid and ascorbate oxidase based on quaternary CuInZnS QDs/thiochrome ratiometric fluorescence sensing system, *Talanta*, 2020. 214. p. 120814.
16. Wang, Y. H., et al., Chlorine disinfection significantly aggravated the biofouling of reverse osmosis membrane used for municipal wastewater reclamation, *Water Research*, 2019. 154. p. 246–257.
17. Qian, X., et al., Separation/Determination of Flavonoids and Ascorbic Acid in Rat Serum and Excrement by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection, *Analytical Sciences*, 2010. 26. p. 557–560.
18. Liu, K., et al., Online electrochemical monitoring of dynamic change of hippocampal ascorbate: Toward a platform for in vivo evaluation of antioxidant neuroprotective efficiency against cerebral ischemia injury, *Analytical Chemistry*, 2013. 85. p. 9947–9954.
19. Sun, C. L., et al., Microwave-assisted synthesis of a core-shell MWCNT/GONR heterostructure for the electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid, *ACS Nano*, 2011, 5.

- p. 7788–7795.
20. Koblová, P., et al., Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine using a monolithic column, *Analytical Methods*, 2012. 4. p. 1588–1591.
 21. Wang, Z., Teng, X. and Lu, C., Carbonate interlayered hydrotalcites-enhanced peroxy-nitrous acid chemiluminescence for high selectivity sensing of ascorbic acid, *Analyst*, 2012. 137. p. 1876–1881.
 22. Peng, J., et al., Ding, A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2015. 221. p. 708–716.
 23. Chen, J., et al., Reduced graphene oxide nanosheets functionalized with poly(styrene sulfonate) as a peroxidase mimetic in a colorimetric assay for ascorbic acid, *Microchimica Acta*, 2016. 183. p. 1847–1853.
 24. Wang, X., Watanabe, H. and Uchiyama, S., Amperometric L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane, *Talanta*, 2008. 74. p. 1681–1685.
 25. Chauhan, N., Dahiya, T. and Priyanka-Pundir, C. S., Fabrication of an amperometric ascorbate biosensor using egg shell membrane bound *Lagenaria siceraria* fruit ascorbate oxidase, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2010. 67. p. 66–71.
 26. Liu, M., et al., A stable sandwich-type amperometric biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-single walled carbon nanotubes/ascorbate oxidase/naion films for detection of L-ascorbic acid, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2011. 159. p. 277–285.
 27. Dodevska, T., Horozova, E. and Dimcheva, N., Electrochemical behavior of ascorbate oxidase immobilized on graphite electrode modified with Au-nanoparticles, *Materials Sciences and Engineering B:Solid-State Materials for Advanced Technology*, 2013. 178. p. 1497–1502.
 28. Liu M., et al., An Amperometric Biosensor Based on Ascorbate Oxidase Immobilized in Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite Films for the Determination of L-Ascorbic Acid, *Analytical Sciences*, 2011. 27. p. 477.
 29. Csiffáry, G., et al., Ascorbate oxidase-based amperometric biosensor for L-ascorbic acid determination in beverages, *Food Technology Biotechnology*, 2016. 54. p. 31–35.
 30. Kannoujia, D. K., Kumar, S. and Nahar, P., Covalent immobilization of ascorbate oxidase onto polycarbonate strip for L-ascorbic acid detection, *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2012. 114. p. 402–404.
 31. Akyilmaz, E., Guvenc, C. and Koylu, H., A novel microbial biosensor system based on *C. tropicalis* yeast cells for selective determination of L-Ascorbic acid, *Bioelectrochemistry*, 2020. 132.
 32. Gao, W., Song, J. and Wu, N., Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode, *Journal Electroanalytical Chemistry*, 2005. 576. p. 1–7.
 33. Erdem, A., Congur, G. and Mese, F., Electrochemical Detection of Activated Protein C Using an Aptasensor Based on PAMAM Dendrimer Modified Pencil Graphite Electrodes, *Electroanalysis*, 2014. 26. p. 2580–2590.
 34. Kawde, A. N., et al., A facile fabrication of platinum nanoparticle-modified graphite pencil electrode for highly sensitive detection of hydrogen peroxide, *Journal Electroanalytical Chemistry*, 2015. 740. p. 68–74.
 35. Abbas, S., et al., Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends-a review. *Food Reviews International*, 2012. 23. p. 343-374.
 36. Yaman, Y. T., Nano-elektrokimyasal Biyosensörler Kullanılarak DNA ile Doksorubisin Etkileşiminin Araştırılması, Süleyman Demirel University, 2022. 26. p. 229-235.
 37. Song, N., et al., A novel electrochemical biosensör for the determination of dopamine and ascorbic acid based on graphene oxide / poly(aniline-co-thionine) nanocomposite, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020. 873. p. 114352.

38. Kaçar, C. and E, P. E., An amperometric biosensor based on poly(L-aspartic acid), nanodiamond particles, carbon nanofiber, and ascorbate oxidase-modified glassy carbon electrode for the determination of L-ascorbic acid, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020. 412. p. 5315-5327.
39. Mu, C., et al., Visual colorimetric 'turn-off' biosensor for ascorbic acid detection based on hypochlorite-3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine system, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018. 201. p. 61-66.