

BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2017.2.106608>

РОЗРОБКА НОВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ В ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТАХ

*О. О. Солдаткін^{1,2}, В. О. Приліпко³, М. А. Куйбіда³, І. І. Хоменко^{1,4}, О. П. Солдаткін^{1,2},
С. В. Дзядевич^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Національний авіаційний університет,
пр. Космонавта Комарова, 1, 03058, м. Київ, Україна

⁴Центр інтелектуальної власності та передачі технологій НАН України,
вул. Володимирська, 54, 01601, м. Київ, Україна.

e-mail: alex_sold@yahoo.com, wikysik20@gmail.com, kuibidamaria20@gmail.com,
khomenko@nas.gov.ua, a_soldatkin@yahoo.com, dzyad@yahoo.com

РОЗРОБКА НОВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ В ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТАХ

О. О. Солдаткін, В. О. Приліпко, М. А. Куйбіда, І. І. Хоменко, О. П. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В роботі розроблено новий кондуктометричний біосенсор на основі двох ферментів (аргіназа та уреаза) для визначення аргініну. Для відпрацювання методики іммобілізації обох ферментів при розробці біосенсору для визначення аргініну проведено вибір найбільш прийнятної методики іммобілізації за допомогою уреази. Проведено оптимізацію основних параметрів іммобілізації (концентрації обох ферментів в складі біосенсора, концентрацію глутарового альдегіду, час інкубації). Далі вивчено вплив параметрів розчину на роботу біосенсора (іонна сила буферного розчину, буферна ємність та рН розчину) та підібрано оптимальні умови його функціонування. Крім того, в роботі було досліджено основні характеристики кожного

біосенсора, такі як відтворюваність та операційна стабільність сигналів розробленого біосенсора, тобто вивчалось, як змінюється величина відгука біосенсора при безперервній роботі протягом робочого дня та протягом тижня.

З використанням розробленого біосенсора на основі коімобілізованих уреази та аргінази провели визначення концентрації аргініну в деяких лікарських препаратах. Отримані результати добре корелювали із концентраціями аргініну, заявленими фармацевтичними підприємствами.

Ключові слова: аргінін, аргіназа, уреаза, біосенсор, кондуктометрія

DEVELOPMENT OF NEW BIOSENSOR FOR ARGININE DETERMINATION IN PHARMACEUTICALS

O. O. Soldatkin, V. O. Prilipko, M. A. Kuibida, I. I. Khomenko, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. In this work, a new conductometric bienzyme (arginase and urease) based biosensor was developed for arginine determination. First, the most suitable method of urease immobilization was chosen. To elaborate the technique of immobilization of both enzymes, its main parameters (the concentrations of both enzymes and GA, incubation time) were optimized. Further, an influence of the solution parameters (the buffer ionic strength, capacity and pH) on the biosensor operation was studied, the working conditions were optimized. Additionally, the signal reproducibility and operational stability at continuous work, which are the main characteristics of biosensors, were studied over one working day and during a week.

Using the developed biosensor based on co-immobilized urease and arginase, the examination of arginine concentration was performed in some medicines. The obtained results were in good correlation with the values stated by the producers of pharmaceuticals.

Keywords: arginine, arginase, urease, biosensor, conductometry

РАЗРАБОТКА НОВОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРГИНИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

A. A. Солдаткин, В. А. Прилипко, М. А. Куйбеда, И. И. Хоменко, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Аннотация. В работе разработан новый кондуктометрический биосенсор на основе двух ферментов (аргиназа и уреаза) для определения аргинина. Для отработки методики иммобилизации обоих ферментов при разработке биосенсора для определения аргинина проведено выбор наиболее приемлемого метода иммобилизации с помощью уреазы. Проведена оптимизация основных параметров выбранной методики иммобилизации (концентрации обоих ферментов в составе биосенсора, концентрация глутарового альдегида, время инкубации). Далее изучено влияние параметров раствора на работу биосенсора (ионная сила буферного раствора, буферная емкость и рН раствора) и подобраны оптимальные условия его функционирования. Кроме того, в работе были исследованы основные характеристики каждого биосенсора, такие как воспроизводимость и операционная стабильность сигналов разработанного биосенсора,

изучено как меняется величина сигнала биосенсора при непрерывной работе в течение рабочего дня и в течение недели.

С использованием разработанного биосенсора на основе коиммобилизованных уреазы и аргиназы провели определение концентрации аргинина в некоторых лекарственных препаратах. Полученные результаты хорошо коррелировали с концентрациями аргинина, заявленными фармацевтическими предприятиями.

Ключевые слова: аргинин, аргиназа, уреазы, биосенсор, кондуктометрия

1. Вступ

L-Аргінін (δ -гуанідин- α -аміновалеріанова кислота) – умовно незамінна амінокислота, яка служить попередником для біосинтезу багатьох біологічно активних сполук [1]. Для людини аргінін є напівнезамінною амінокислотою, тобто існують біохімічні шляхи для її біосинтезу, але в певні періоди життя: інтенсивного росту, розвитку, а також при деяких захворюваннях, вони не можуть забезпечити організм достатньою кількістю цієї амінокислоти, через це вона повинна потрапляти в організм із їжею [1]. Аргінін входить до складу білків, ця амінокислота також важлива в інших метаболічних шляхах клітини, наприклад, синтез нітроген (II) оксиду, поліамінів, проліну, глутамату, креатину, агматину та орнітину [2]. Близько 60% спожитої амінокислоти метаболізується в шлунково-кишковому тракті, і тільки 40% потрапляє у кров в незмінному стані. [3]. Необхідно насичати тканини організму цією амінокислотою, тому в щоденний раціон харчування слід включати продукти, що містять максимальну кількість аргініну. На першому місці за вмістом аргініну в продуктах стоїть їжа рослинного походження, а саме: гарбузове насіння (5353 мг), арахіс (3506 мг), насіння кунжуту (3326 мг), мигдальний горіх (2492 мг), кедрові горішки (2413 мг) [4]. Крім харчових продуктів концентрацію аргініну в крові можливо збільшувати за рахунок деяких фармацевтичних препаратів.

На сьогодні фармацевтичні виробники пропонують низьку препаратів на основі амінокислоти аргінін. Вони застосовуються від перевтоми, цукрового діабету, безпліддя, депресії, також при астеничних станах, захворюванні нирок, артритів і артрозах, хворобах судин і серця та при наявності новоутворень в різних органах тощо. На жаль, при виробни-

цтві цих препаратів може здійснюватися неналежний контроль концентрації аргініну в них. Крім того, на фармацевтичному ринку часто з'являються фальсифіковані препарати. Відповідно доцільним є розробка пристрою, який зміг би експресно визначати концентрацію аргініну в фармпрепаратах. Таким пристроєм може бути кондуктометричний біосенсор на основі ферментів аргінази та уреазы.

На даний момент у світі є багато повідомлень про розробку біосенсорів для визначення аргініну [5]. За результатами патентно-інформаційного пошуку під час створення методики розробки нового біосенсору для визначення аргініну в фармацевтичних препаратах було встановлено, що на дату проведення патентних досліджень запропонований біосенсорний метод був новим, мав винахідницький рівень і був промислово придатним, тобто відповідав критеріям правової охорони винаходів в Україні. Серед розробок, що були знайдені під час патентного пошуку є низка варіантів біосенсорів на основі різних типів електрохімічних перетворювачів, переважна більшість з яких базується на амперометричному та потенціометричному методах аналізу. При розробці амперометричних біосенсорів часто використовують одноферментні системи на основі оксидази L- та D-амінокислот або ж декарбоксилази аргініну. Нажаль, дані типи біосенсорів не є достатньо селективними, особливо для визначення аргініну в складних багатокомпонентних зразках (кров, соки тощо). Є відомості про розробку амперометричного біосенсора для кількісного визначення аргініну на основі аргінази, уреазы та електроосадженого поліаніліну (ПА) [6]. Для конструювання чутливого до іонів амонію хемосенсора на ПА-платформі використано Nafion як компенсатор негативного заряду, що виникає в процесі анодної полімеризації ПА. У випад-

ку розробки потенціометричних біосенсорів на основі ІСПТ часто використовується двох-ферментна система на основі аргінази/уреази [7-9]. Вагомим недоліком такої біосенсорної системи є певна втрата чутливості у зв'язку з використанням кількох ферментів, крім того, неможливість аналізу складних зразків, що містять сечовину. Відомий біосенсор на основі іон-селективного електроду для визначення L-аргініну у фруктових соках, що базується на використанні лише одного ферменту, – аргініндеїмінази [10]. Нажаль, для функціонування він потребує технологічно складного електроду порівняння і має ряд недоліків таких як світлочутливість, складність технології його подальшої мініатюризації, неможливість використання недорогої тонкоплівчастої технології виготовлення.

Як не дивно, найменш розповсюджений тип біосенсорів для визначення аргініну базується на кондуктометричному методі визначення. Обидва біосенсори, як на основі двох ферментів (аргіназа/уреаза) [11], так і одного - аргініндеїмінази [12], характеризувались гарною чутливістю до аргініну. Кондуктометричні перетворювачі мають ряд істотних переваг у порівнянні з іншими електрохімічними датчиками. Зокрема, це відсутність технологічно складного електроду порівняння, відсутність світлочутливості, можливість мініатюризації і використання недорогої тонкоплівчастої технології виготовлення.

Нажаль, жоден з багатьох відомих біосенсорів не дійшов до стадії комерціалізації, тому розробка нових перспективних біосенсорів для визначення аргініну є вельми актуальною задачею.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

У роботі використовували ферменти: уреазу з бобів сої з активністю 66 од. акт/мг, фірми „Fluka” (Німеччина) та аргіназу з печінки бика з активністю 105 од. акт/мг, фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), гліцерин, аргінін та сечовина фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина).

В роботі використовували робочі буфера: 5 мМ Трис (HOCH_2)₃CNH₂, рН 8,1 та 5 мМ фосфатний буфер рН 7,4 вітчизняного виробництва. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.” та „ч.д.а.”.

2.2. Кондуктометричні перетворювачі

В роботі використовувались кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони представляють собою підкладку із ситалу (сплавленого Al_2O_3) розміром 5×30 мм, на яку нанесена пара золотих гребінчастих електродів. Для кращої адгезії металів до підкладки використовувався підшар титану завтовшки 0,1 мкм. Більш детальну інформацію про конструкцію та зовнішній вигляд використаних в роботі перетворювачах можна знайти в попередній роботі [13].

2.3. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань

Для вимірювання зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача в роботі була використана експериментальна установка для кондуктометричних вимірювань. При роботі цієї кондуктометричної установки, для підвищення чутливості сенсора та мінімізації шумів за рахунок неспецифічних впливів, використовувався диференційний режим вимірювань. Схему цієї кондуктометричної установки та опис її роботи можна знайти в попередній роботі [14].

2.4. Методики іммобілізації ферментів

Адсорбція уреази на силікаліті. Першою методикою, що порівнювались в роботі, була іммобілізація ферменту методом адсорбції на силікаліті [15]. Спочатку необхідно було сформувати шар силікаліту, а далі зверху нанести шар ферментного гелю на основі уреази. Для нанесення силікаліту на поверхню перетворювача використовували 10 % розчин силікаліту у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4. 0,15 мкл розчину силікаліту наносили на активну об-

ласть кожної пари електродів, після чого перетворювач нагрівали до 200°C впродовж 6 хв. Така температура не впливала на силікаліт та робочі характеристики перетворювача. В результаті проведених маніпуляцій на активних областях електродів формувалася шар силікаліту. Далі для формування ферментного шару на одну пару електродів наносили 0,15 мкл гелю на основі 5% уреазі, 5% БСА та 10% гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, на іншу (референтну) пару електродів – 10 % БСА у такому ж буфері, та залишали перетворювач на повітрі за кімнатної температури до повного висихання електродів (20 хв).

Імобілізація уреазі в насичених парах глутарового альдегіду. Іншою методикою, що використовувалася в експерименті, була іммобілізація уреазі в насичених парах глутарового альдегіду [16]. Для виготовлення робочих біоселективних мембран на основі уреазі використовували розчин з вмістом: 5% уреазі, 5% БСА та 10% гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА, кінцева концентрація якого складала еквівалентну кількість білку в мембрані – 10%. Отримані розчини наносили на робочі частини перетворювача за допомогою мікропіпетки до повного покриття робочої поверхні електродів. Далі перетворювачі з нанесеними мембранами інкубували в насичених парах глутарового альдегіду (ГА) протягом 25 хвилин. Потім мембрани висушували протягом 5 хвилин на повітрі за кімнатної температури. Після цього біосенсиори відмивали робочим буферним розчином від надлишку незв'язаного ГА та інших компонентів мембран.

Імобілізація уреазі в краплі глутарового альдегіду. Для виготовлення робочих мембран за допомогою іммобілізації в краплі ГА використовували розчин: 10% уреазі та 10% БСА, у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, з 20% гліцерином [17]. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА (20%). Перед нанесенням на поверхні перетворювачів розчини для референтної та робочої мембран змішували з 2% водним розчином ГА у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші

наносили на робочі поверхні кондуктометричних гребінчастих електродів (0,15 мкл на кожну) та висушували протягом 45 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після висихання мембран біосенсиори занурювали у робочий буфер для вимивання надлишку ГА та інших компонентів мембран.

Імобілізація уреазі на нітроцелюлозі. Також застосовувалася методика іммобілізації уреазі на нітроцелюлозі, розроблена та детально описана в [18]. Єдиною відмінністю методики від першоджерела було використання 1 % розчину нітроцелюлози замість 5 %, оскільки в останньому випадку значно знижувалася чутливість перетворювача. Після модифікації поверхні перетворювача нітроцелюлозою на одну з пар електродів наносили 0,15 мкл 5 % розчину уреазі з 5% БСА та 10% гліцерину у в 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, на іншу пару (референтну) – 0,15 мкл 10 % розчину БСА в 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Потім біосенсиори висушували та відмивали у робочому буфері від незв'язаного ферменту.

Фотополімеризація уреазі в PVA/SbQ. Останнім методом іммобілізації уреазі, застосованому для порівняння, була фотополімеризація уреазі в PVA/SbQ [19]. Для формування біоселективної мембрани на одну з пар електродів наносили 0,3 мкл 5 мМ фосфатного буфера, рН 6,5, що містив 2,5 % уреазі з 2,5% БСА, 25 % PVA/SbQ та 10 % гліцерину, на іншу пару електродів (референтну) наносили 0,3 мкл такого ж розчину з 5 % БСА замість уреазі, після чого перетворювач опромінювали ультрафіолетом протягом 30 хв. за допомогою ультрафіолетової лампи KF-4М для формування мембран. Потім перетворювачі відмивали у робочому буфері від незв'язаного ферменту.

Коіммобілізація уреазі та аргінази в краплі глутарового альдегіду. Для виготовлення біосенсора, чутливого до аргініну, необхідно було приготувати біосенсор на основі двох ферментів – аргінази та уреазі. Першою іммобілізували уреазу за методикою описаною вище «Імобілізація уреазі в краплі глутарового альдегіду». Далі поверх першої мембрани наносили мембрану на основі аргінази: 10% фермента та 10% БСА, у 20 мМ фосфатному

буфері, рН 7,4, з 20% гліцерином. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА (20 %). Перед нанесенням на поверхні перетворювачів розчини для референтної та робочої мембран змішували з 0,1-0,5 % водним розчином ГА у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші наносили на робочі поверхні кондуктометричних гребінчастих електродів (0,15 мкл на кожну) та висушували протягом 45 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після висихання мембран біосенсори занурювали у робочий буфер для вимивання надлишку ГА та інших компонентів мембран.

2.5. Методика вимірювання

Виміри проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, та 5 мМ трис буфері, рН 8,1 за кімнатної температури у відкритій комірці 2 мл при постійному перемішуванні. Концентрації субстратів в комірці задавали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованих розчинів субстратів. Усі дослідження проводились у трьох-чотирьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними завадами, подавлялися завдяки використанню у роботі диференційного режиму вимірювань.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вибір оптимального методу іммобілізації уреазу при розробці біосенсорів для визначенні аргініну

Для вибору оптимального методу іммобілізації, що буде використаний при розробці біосенсора для визначення аргініну, необхідно було перевірити перспективність різних традиційних методів іммобілізації, що використовуються в біосенсоріці. При розробці біосенсора для визначення аргініну використовується два фермента аргіназу та уреазу, але оскільки саме уреазу в більшій мірі відповідає за кінцеву зміну провідності, яку буде реєструвати кондуктометричний перетворювач, то необхідно досягти оптимальної роботи саме цього ферменту. Для порівняння застосову-

валися методики іммобілізації уреазу в парах та краплі глутарового альдегіду, адсорбції на нітроцелюлозі і силікаліті, та фотополімеризації в PVA/SbQ. Для кращого порівняння, у всіх методах іммобілізації було використано однакову кількість ферменту.

За результатами досліджень для кожного уреазного біосенсору на основі різних методик іммобілізації побудовано калібрувальні графіки (рис.1) для наглядного порівняння результатів. Вплив таких важливих аналітичних характеристик біосенсора, як чутливість, мінімальна границя визначення, лінійний діапазон роботи, шум та дрейф базової лінії, було зібрано в табл. 1 для усіх варіантів іммобілізації.

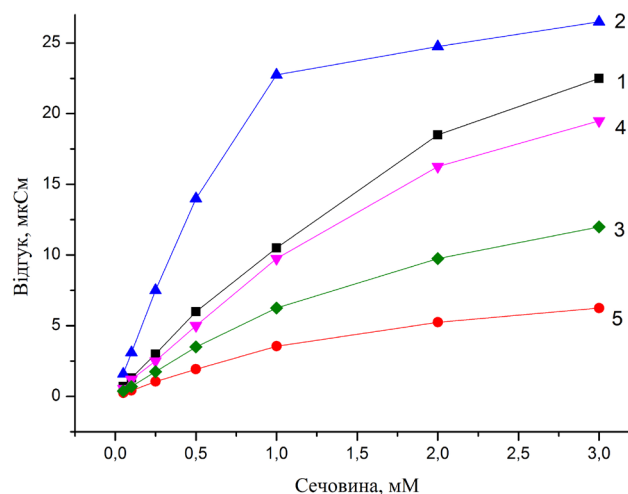


Рис. 1. Калібрувальні криві біосенсорів на основі різних методів іммобілізації уреазу (в парах (1) та краплі (2) глутарового альдегіду, адсорбції на нітроцелюлозі (3) і силікаліті (4), та фотополімеризації в PVA/SbQ (5)). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН=7.4.

Методики адсорбції уреазу на силікаліті та іммобілізації в парах ГА характеризувалися найкращим лінійним діапазоном роботи біосенсорів на їх основі, але, наприклад, практичне використання методу адсорбції на силікаліті для двохшарового нанесення уреазу та аргінази малоймовірне. З іншого боку, біосенсори на основі іммобілізації уреазу в краплі глутарового альдегіду були більш чутливими та мали нижчу мінімальну границю визначення сечовини, тому у подальшому вони будуть найбільш зручним при розробленні біоферментного біосенсору для визначення аргініну.

Таблиця 1

Порівняння характеристик біосенсорів на основі різних методів іммобілізації

Тип іммобілізації	Чутливість (мкСм/мМ)	Мінімальна границя визначення (мМ)	Верхня границя лінійного діапазону роботи, (мМ)	Дрейф (мкСм /хв)	Шум (мкСм)	Особливості процедури іммобілізації
В парах ГА	12,3±6,9	0,02	до 2	0,15	0,825	Токсичність випарів ГА
В краплі ГА	23,4±3,4	0,001	до 0.5	0,084	0,079	Зручність проведення
На нітроцелюлозі	2,7±1,5	0,062	до 1	0,25	0,564	Малоефективне зв'язування
На силікаліті	8±5,6	0,007	до 2	0,047	0,199	Багатоетапність іммобілізації
В PVA/SbQ	6,2±3,7	0,009	до 1	0,074	0,194	Світлочутливість фотополімеру

3.2. Оптимізація основних параметрів процесу іммобілізації аргінази та уреазу в краплі глутарового альдегіду

В першій частині роботи було обрано метод іммобілізації в краплі ГА, що буде використано при розробці біосенсора для визначення аргініну на основі вже двох ферментів (аргіназа та уреазу). Відповідно наступним етапом має бути оптимізація основних параметрів вибраного методу іммобілізації для створення біферментного біосенсора для визначення аргініну. Відомо, що для оптимізації методики іммобілізації слід підібрати концентрації обох ферментів в складі біосенсора, концентрацію ГА, час інкубації та методологію послідовності процедури іммобілізації, за яких спостерігаються найкращі характеристики отриманих біосенсорів.

Для визначення найефективнішої концентрації уреазу, при якій спостерігаються найбільші сигнали біосенсора було проведено дослідження таких концентрацій уреазу в складі біоселективного елементу біосенсора: 0,25%; 0,5%; 1%; 3%; 5%. Результати експерименту по вивченню залежності величини відгуку біосенсора на різні концентрації сечовини від

концентрації уреазу в біомембрані приведено на рис. 2. По отриманим результатам видно, що при зміні концентрації ферменту з 0,25 % до 0,5% відгуки біосенсора зростають в рази, при подальшому збільшенні до 5 % ферменту в мембрані відгуки збільшуються більш повільно. Найбільші сигнали біосенсорів отримано при концентрації уреазу 5%.

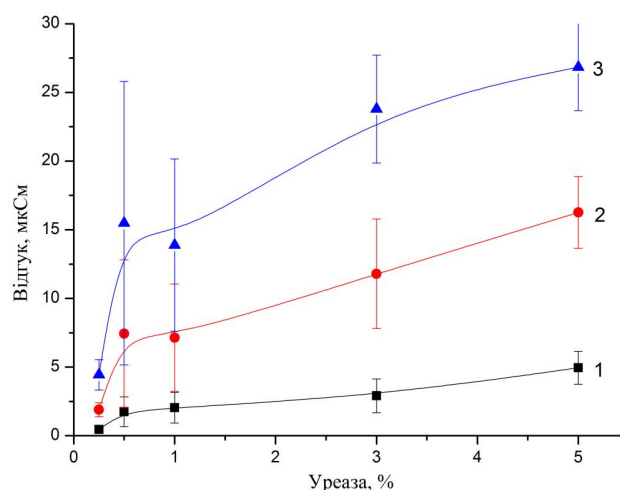


Рис. 2. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації уреазу в складі біомембрани за різних концентрацій сечовини: 0,2 мМ (1), 1 мМ (2), 4 мМ (3). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Для визначення оптимальної концентрації аргінази у біоселективному елементі біосенсора, було перевірено відгуки біосенсорів на різні концентрації аргініну, за різних концентрацій аргінази: 1,5%; 2,5%; 3%; 5%; 6,6%; 7,5%. Згідно отриманого графіку (рис. 3) можна побачити, що найбільші відгуки біосенсорів на основі двох ферментів спостерігаються при концентрації аргінази в складі біосенсора - 5%. Дана оптимальна концентрація і використовувалась в подальших експериментах.

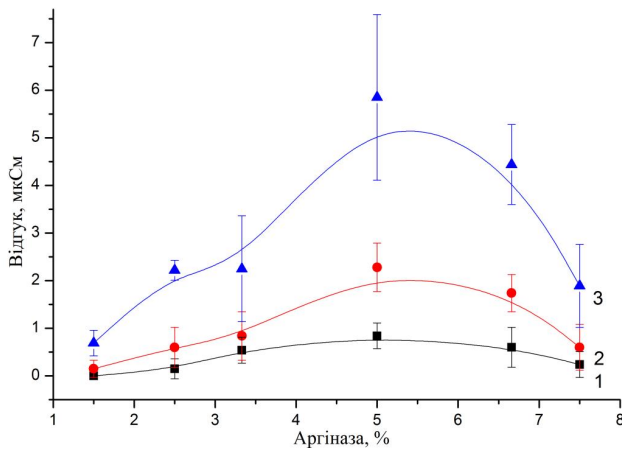


Рис. 3. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації аргінази в біомембранах за різних концентрацій аргініну: 0,025 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація уреазі в мембрані – 5 %. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН=7,4.

Наступним завданням було перевірити як впливає концентрація глутарового альдегіду та тривалість процесу іммобілізації на роботу біосенсорів. Відповідно, було здійснено перевірку залежності величини відгуків біосенсора на різні концентрації аргініну від концентрації глутарового альдегіду під час іммобілізації (рис. 4). Згідно графіку можна дійти висновку, що концентрації ГА від 0,1% до 0,5%, є найефективнішими для процесу іммобілізації ферментів, тому при створенні біосенсорів на основі двох ферментів (суміш уреазі та аргінази) надалі використовували саме такі концентрації ГА.

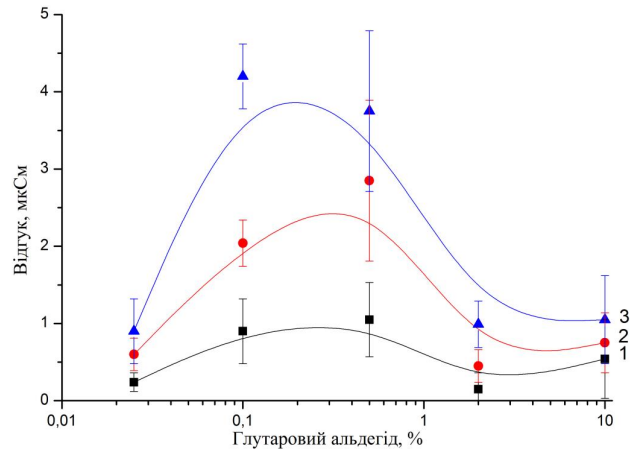


Рис. 4. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від використаної під час іммобілізації концентрації глутарового альдегіду. Концентрації аргініну: 0,1 мМ (1), 0,4 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація кожного з ферментів в мембрані – 5 %. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Крім того, в роботі було перевірено, як впливає тривалість іммобілізації на чутливість створеного біосенсора до аргініну. Виявилось, що оптимальним часом формування ферментних мембран на поверхні кондуктометричного перетворювача за допомогою глутарового альдегіду було 30 хвилин.

3.3. Вивчення впливу параметрів розчину на роботу біосенсора

Параметри роботи біосенсора можуть залежати як від його власних характеристик, так і від характеристик розчину, в якому проводять вимірювання. Наступним етапом даної роботи було дослідження впливу параметрів робочого буферного розчину на функціонування запропонованого біосенсора для визначення аргініну, що включає визначення залежності величини відгуків біосенсорів від іонної сили, буферної ємності та рН буферу.

Визначення впливу іонної сили на відгуки біосенсора. Особливістю усіх кондуктометричних біосенсорів є те, що величина їх відгуків сильно залежить від іонної сили розчину, в якому проводяться вимірювання. Тому було проведено дослідження впливу іонної сили (концентрації КСІ) на величину відгуків роз-

робленого біосенсора. Вимірювали відгуки на аргінін концентрацією 1 мМ при поступовому збільшенні концентрації КСІ від 1 мМ до 120 мМ (рис. 5).

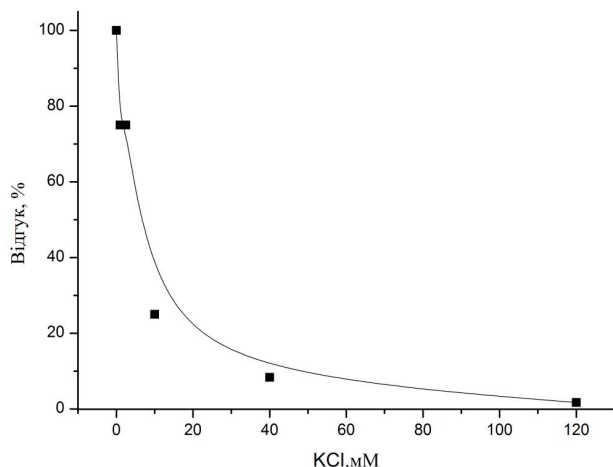


Рис. 5. Залежність величини відгуків біосенсора від іонної сили робочого буферного розчину. Концентрація аргініну – 1 мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Як видно з графіку, відгуки біосенсора значно зменшуються при збільшенні іонної сили розчину, а відповідно в подальших експериментах з реальними пробами необхідно контролювати іонну силу для зменшення похибок вимірювань.

Визначення впливу буферної ємності на відгуки біосенсора. Величина відгуків кондуктометричних біосенсорів залежить також від буферної ємності розчину, в якому проводяться вимірювання, тому було здійснено дослідження впливу буферної ємності на величину відгуків біосенсора. Вимірювали величину відгуків на 1 мМ аргінін при різних концентраціях буферного розчину: 1 мМ; 2,5 мМ; 5 мМ; 10 мМ; 25 мМ; 50 мМ (рис. 6).

З графіка видно, що відгуки біосенсора значно більші при низьких концентраціях буферного розчину, але відомо, що за низьких концентрацій буфер втрачає свої властивості, тому для подальших досліджень використовували 5 мМ буферний розчин.

Визначення впливу рН на відгуки біосенсору. Як відомо, внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН-оптимум його роботи. Крім того, запропонований біосенсор основа-

ний на двох ферментах, кожен з яких має свій рН оптимум. Тому, щоб підібрати оптимальні умови функціонування біосенсора, було досліджено залежність величини відгуків біосенсора від рН робочого розчину. При проведенні цього експерименту використовувався універсальний буфер, що має однакову буферну ємність в широкому діапазоні значень рН. Відгуки отримували на аргінін концентрацією 1 мМ (рис. 7).

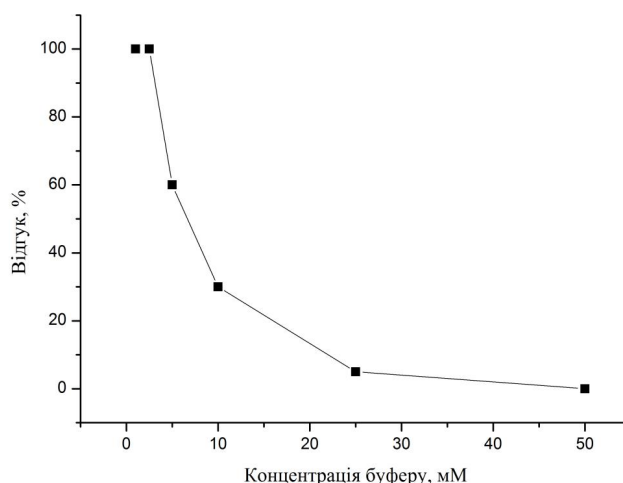


Рис. 6. Залежність величини відгуків біосенсора від буферної ємності робочого розчину. Концентрація аргініну – 1 мМ. Вимірювання проводились у фосфатному буфері, рН 7,4.

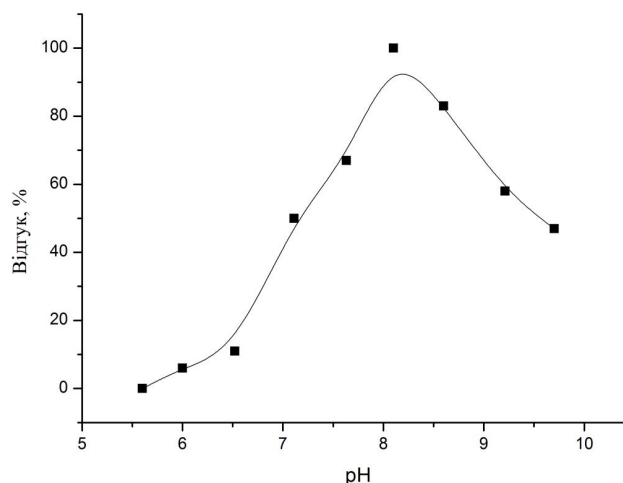


Рис. 7. Залежність величини відгуків біосенсора від рН робочого буферного розчину. Вимірювання проводились в універсальному буфері за кімнатної температури. Концентрація аргініну – 1 мМ.

За даними графіку можна судити, що найбільші відгуки біосенсора були при роботі в буферному розчині з рН 8,1. В подальшій роботі використовувався буфер саме з цим значенням рН (5 мМ тріс буфер, рН 8,1).

3.4. Визначення відтворюваності та операційної стабільності біосенсора

Для роботи будь-якого біосенсора дуже важливими характеристиками є відтворюваність та операційна стабільність сигналу. Для перевірки відтворюваності відгуків запропонованого біосенсора на аргінін, ми впродовж деякого часу отримували відгуки біосенсора на 1мМ аргінін з інтервалом в 10-15 хвилин, при цьому біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у буфері за постійного перемішування (рис. 8). Як можна побачити з графіку, біосенсор характеризувався гарною відтворюваністю сигналів. Похибка вимірювання не перевищувала 5%.

Щоб визначити операційну стабільність біосенсора, впродовж 4-х днів отримували по 4 послідовні відгуки на аргінін концентрацією 1 мМ з інтервалом в 10-15 хв., між серіями відгуків біосенсор зберігався в сухому стані при температурі від +2 до +6 °С (рис. 9). Впродовж всього експерименту спостерігається незначне зменшення середнього відгуку на аргініну. Проте в цілому, розроблений біосенсор для визначення аргініну характеризувався високою операційною стабільністю протягом 4-х днів роботи.

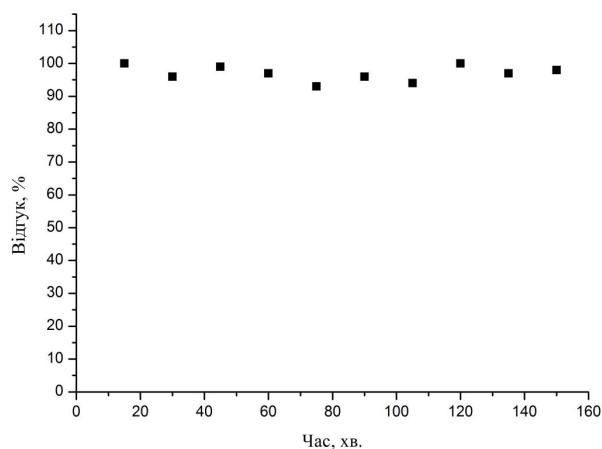


Рис. 8. Відтворюваність сигналів біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ тріс буфері, рН 8,1, концентрація аргініну – 1 мМ.

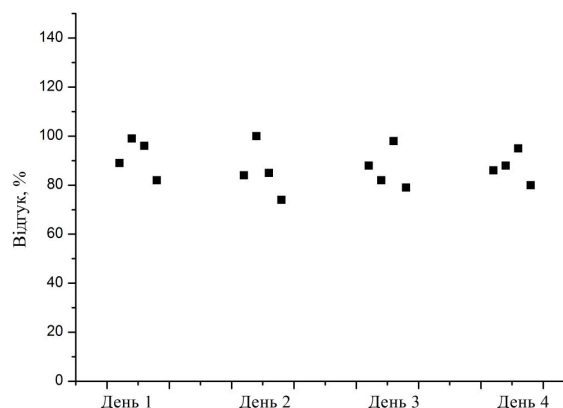


Рис. 9. Операційна стабільність сигналів біосенсора протягом 4-х днів. Вимірювання проводились у 5 мМ тріс буфері, рН 8,1, концентрація аргініну – 1мМ.

3.5. Вимірювання концентрації аргініну в зразках лікарських препаратів з використання розробленого біосенсора

Для біосенсорної перевірки концентрації аргініну було відібрано 3 препарати: Veuron (Франція), Тівомакс (Україна), Глутаргін (Україна). Для визначення концентрацій аргініну було застосовано метод стандартних додавань. В нашому варіанті метод стандартних додавань полягає у тому, що спочатку додавали досліджуванний розчин з невідомою концентрацією аргініну (аліквота фармацевтичного препарату). Далі додавали три порції стандартного розчину з відомою концентрацією аргініну. По отриманим відгукам будувалась пряма. Для побудови графіку та аналізу результатів було використано програму OriginPro, з використанням якої проведено розрахунок концентрації аргініну в досліджуваному розчині (пробі фармпрепарату).

Далі до рівняння прямої отриманої за даними відгуків біосенсору $y=ax+b$, підставляли значення a, b та розраховували за рівнянням значення x при $y=0$. Знайшовши значення x розраховували концентрацію аргініну в аліквоті, тобто в досліджуваному препараті з урахуванням розведення. Вимірювання кожного препарату робили в 7-и повторностях.

За результатами біосенсорного аналізу по 3-м фармацевтичним препаратам побудовано таблицю 2, в якій отримані концентрації аргініну в препаратах порівняно з концентраціями, зазначеними фармацевтичними підприємствами.

Порівняння результатів біосенсорного аналізу аргініну в фармпрепаратах з даними, вказаними виробниками

Назва препарату	Концентрація аргініну, вказана виробником, мМ	Виміряна концентрація аргініну, мМ
«Veygon»	1050	1026 ± 153
«Тівомакс»	200	238 ± 31
«Глутаргін»	70	66 ± 19

4. Висновки

Для розробки біосенсора для визначення концентрації аргініну були проведено низку досліджень. Спочатку було порівняно декілька традиційних методів іммобілізації ферментів та обрано іммобілізацію в краплі ГА для розробки біосенсора на основі уреази та аргінази. Далі в роботі проведено підбір оптимальних умов іммобілізації, а саме підібрано концентрації ГА та ферментів в складі біомембрани та тривалість процесу іммобілізації. В роботі вивчено вплив параметрів робочого розчину (іонна сила, буферна ємність та рН) на функціонування біосенсора для визначення аргініну. Крім того, було досліджено відтворюваність та операційну стабільність розробленого біосенсора протягом 4-х днів роботи.

Розроблені біосенсори були використані для аналізу концентрації аргініну в фармацевтичних препаратах. Отримані результати добре корелюють з концентраціями, зазначеними виробниками цих препаратів.

Подяка

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» та проекту УНТЦ-НАНУ 6177.

Список використаної літератури

[1]. D. L. Nelson, M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry* W. H. Freeman, 2008, 1294 p.

[2]. S. M. Morris Jr. Arginine: beyond protein // *Am J Clin Nutr* 83(2), pp. 508S-512S (2006).

[3]. G. Wu, S. M. Morris Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // *Biochem J* 15, pp. 197–200 (1998).

[4]. D. Voet, J. G. Voet. *Biochemistry*. 4th Edition. Wiley, 2011. 1520 p.

[5]. Г. З. Гайда, Н. Є. Стасюк, М. В. Гончар. Методи аналізу L-аргініну // *Biotechnologia acta*, V. 7(1), pp. 31-39 (2014).

[6]. N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, B. Vus, M. Gonchar, Ye. Koval'chuk. Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode // *Biosens Bioelectron* 37(1), pp. 46–52 (2012).

[7]. S. Karacaoglu, S. Timur, A. Telefoncu. Arginine selective biosensor based on arginase immobilized in gelatin // *Artif Cells Blood Subst Immob Biotechnol* 31, pp. 357–363 (2003).

[8]. S. Komaba, Y. Fujino, T. Matsuda, K. Osaka, I. Satoh. Biological determination of Ag (I) ion and arginine by using the composite film of electroinactive polypyrrole and polyion complex // *Sens Actuator B* 52, pp. 78–83 (1998).

[9]. Lvova L., Legin A., Vlasov Y., Cha G. S., Nam H. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue micro system // *Sens Actuator B* 95, pp. 391–395 (2003).

[10]. N. Verma, A. K. Singh, P. J. Kaur, Biosensor based on ion selective electrode for detection of L-arginine in fruit juices // *Anal Chem* 70 pp. 1111-1115 (2015).

[11]. O. Y. Saiapina, S. V. Dzyadevych, N. JaffrezicRenault, O. P. Soldatkin. Development and optimization of a novel conductometric bi-

enzyme biosensor for L-arginine determination // *Talanta* 92, pp. 58–64 (2012).

[12]. O. O. Soldatkin, D. M. Oliinyk, I. S. Kucherenko, S. V. Marchenko, M. A. Kuibida, V. O. Prylipko, O. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych. Konduktometrychnyi biosensor na osnovi arhinindeiminazy dlia kilkisnoho analizu arhininu v ridynakh biolohichnoho pokhodzhennia // patent Ukrainy Biul. No 7 vid 10. 04. 2017 (*in Ukrainian*).

[13]. S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin. Naukovi ta tekhnolohichni zasady stvorennia miniatiurnykh elektrokhimichnykh biosensoriv. Kyiv. Naukova dumka. 2006 s. 71-72 (*in Ukrainian*).

[14]. O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, V.M.Pyeshkova, A.L.Kukla, N.Jaffrezic-Renault, A. V. El'skaya, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions // *Bioelectrochemistry* 83, pp. 25-30 (2012).

[15]. I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, B. O. Kasap, S. Ozturk, B. Akata, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych. Elaboration of Urease

Adsorption on Silicalite for Biosensor Creation // *Electroanalysis* 24(6) pp. 1380 – 1385 (2012).

[16]. A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, Y. I. Korpan, V. N. Arkhipova, G. A. Zhylyak, S. A. Piletsky, T. A. Sergeeva, T. L. Panasyuk, A. V. El'skaya // *Biopolym Cell* 14 pp. 268–277 (1998).

[17]. O. O. Soldatkin, O. A. Nazarenko, O. S. Pavliuchenko, O. L. Kukla, V. M. Arkhipova, S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin, H. V. Yelska. Optyimizatsiia roboty fermentnykh bioselektivnykh elementiv v skladi potentsiometrychnoho multybiosensora // *Biopolimery i klityna* 24(1), s. 42-50 (2008) (*in Ukrainian*).

[18]. L. -T. Yin, Y. -T. Lin, Y. -C. Leu, C. -Y. Hu. Enzyme immobilization on nitrocellulose film for pH-EGFET type biosensors // *Sensor Actuat B* 148, pp. 207–213 (2010).

[19]. A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs // *Biosens Bioelectron* 19, pp. 131–135 (2003).

Стаття надійшла до редакції 12.06.2017 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2017.2.106608>

DEVELOPMENT OF NEW BIOSENSOR FOR ARGININE DETERMINATION IN PHARMACEUTICALS

*O. O. Soldatkin^{1,2}, V. O. Prilipko³, M. A. Kuibida³, I. I. Khomenko^{1,4}, A. P. Soldatkin^{1,2}
S. V. Dzyadevych^{1,2}*

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo Str., 03680, Kyiv, Ukraine*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska Str., 01003, Kyiv, Ukraine*

³*National Aviation University, Kosmonavta Komarova Str., 1, 03058, Kyiv, Ukraine*

⁴*Center of intellectual property and technology transfer of NAS of Ukraine, 54 Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine*

Summary

Arginine is a semi-essential amino acid, which means that there are biochemical ways for its biosynthesis, but in certain periods of life (e.g. at intense growth and development) and at some diseases the amount of amino acid biosynthesized in the organism is insufficient, therefore it should be provided by food. At present, pharmaceutical manufacturers offer a number of preparations based on the amino acid arginine. Unfortunately, there is no proper control of arginine concentration in the produced preparations, which results in the risk of the presence of counterfeit drugs in the pharmaceutical market. Therefore, the development of a portable device for determination of arginine concentration in pharmaceuticals is greatly needed.

The **aim** of this work was the development of a new biosensor for arginine determination in pharmaceutical preparations.

Methods: The conductometric method of analysis was used. The gold interdigitated electrodes deposited on sital substrate served as conductometric transducers. Two-layer co-immobilisation of urease and arginase on the transducer surface was performed by covalent cross-linking of enzymes with BSA by glutaraldehyde.

Results: The most suitable method of urease immobilization was chosen to develop the technique of immobilization of both enzymes. The main parameters of the developed technique of immobilization (concentrations of both enzymes and GA, incubation time) were optimized. An influence of the buffer parameters (solution ionic strength, capacity and pH) on the biosensor operation was studied. The signals reproducibility and operational stability of the developed biosensor were investigated. Using the developed biosensor the arginine concentration was measured in some medications.

Conclusions: A new conductometric biosensor based on two enzymes (arginase and urease) was developed for arginine determination. The developed biosensor can be successfully used to analyze the arginine concentration in pharmaceuticals. The obtained results correlated well with the values stated by the producers.

Keywords: arginine, arginase, urease, biosensor, conductometry

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.555

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2017.2.106608>

РОЗРОБКА НОВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ В ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТАХ

О. О. Солдаткін^{1,2}, В. О. Приліпко³, М. А. Куйбіда³, І. І. Хоменко^{1,4}, О. П. Солдаткін^{1,2},
С. В. Дзядевич^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Національний авіаційний університет,
пр. Космонавта Комарова, 1, 03058, м. Київ, Україна

⁴Центр інтелектуальної власності та передачі технологій НАН України,
вул. Володимирська, 54, 01601, м. Київ, Україна.

Реферат

Аргінін є напівнезамінною амінокислотою, тобто існують біохімічні шляхи для її біосинтезу, але в певні періоди життя, такі як інтенсивний ріст, розвиток, а також при деяких захворюваннях, вони не можуть забезпечити організм достатньою кількістю цієї амінокислоти, через це вона повинна потрапляти в організм із їжею. На сьогодні фармацевтичні виробники пропонують низку препаратів на основі амінокислоти аргінін. На жаль, при виробництві може здійснюватись неналежний контроль концентрації аргініну, і на фармацевтичному ринку часто з'являються фальсифіковані препарати. Відповідно доцільним є розробка пристрою, який зміг би експресно визначати концентрацію аргініну в фармпрепаратах.

Метою даної роботи була розробка нового біосенсору для визначення аргініну в фармацевтичних препаратах.

Методи дослідження: В роботі використовували кондуктометричний метод аналізу. Як кондуктометричні перетворювачі в роботі використовували золоті гребінчасті електроди, нанесені на ситалову підкладку. Коїмобілізацію уреази та аргіназу на поверхню перетворювача проводили шляхом ковалентного зшивання ферментів з БСА за допомогою глутарового альдегіду.

Результати дослідження: При розробці біосенсора для визначення аргініну, при розробці методики іммобілізації двох ферментів, було проведено вибір найбільш прийняттого методу іммобілізації уреази. Проведено оптимізацію основних параметрів вибраної методики іммобілізації (концентрації обох ферментів в складі біосенсора, концентрацію ГА, час інкубації). Вивчено вплив параметрів розчину на роботу біосенсора (іонна сила буферу, буферна ємність та рН розчину). Досліджено відтворюваність та операційну стабільність сигналів розробленого біосенсора. З використанням розробленого біосенсора провели дослідження концентрації аргініну в деяких лікарських препаратах.

Висновки: В роботі розроблено новий кондуктометричний біосенсор на основі двох ферментів (аргіназа та уреаза) для визначення аргініну. Розроблений біосенсор можна з успіхом використовувати для аналізу концентрації аргініну у фармпрепаратах. Отримані результати гарно корелювали із концентраціями аргініну, заявленими фармацевтичними підприємствами.

Ключові слова: аргінін, аргіназа, уреаза, біосенсор, кондуктометрія