

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.555+577.15+543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325652>

АДАПТАЦІЯ МОНОФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИСОКОЧУТЛИВОГО ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ В ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ

*Ксенія Беркета^{1,2}, Ольга Саяпіна¹, Любов Фаюра³, Андрій Сибірний^{3,4}, Сергій Дзядевич^{1,2},
Олександр Солдаткін^{1,5}*

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

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

³ Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова 14/16, м. Львів, 79005, Україна

⁴ Жешувський університет, вул. Зельверовича 4, м. Жешув, 35601, Польща

⁵ Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського, Берестейський проспект, 37,
м. Київ, 03056, Україна

E-mail: ksenya.berketa.10@gmail.com, osayapina4@gmail.com, fayural@gmail.com,
sibirny@yahoo.com, dzyad@yahoo.com, soldatkinsasha@gmail.com

Анотація. У роботі описано розробку та адаптацію моноферментного кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну в фармацевтичних зразках. Біосенсор виготовлений шляхом іммобілізації рекомбінантної аргініндеїмінази (АДІ) на кондуктометричних електродах з використанням ковалентного зшивання в парах глутарового альдегіду. Для досягнення максимальної чутливості розробленого біосенсора до аргініну досліджено вплив параметрів робочого буферного розчину, таких як рН, буферна ємність, іонна сила, температура і концентрація білка на роботу біосенсора.

Досліджено відтворюваність сигналу та стабільність при зберіганні біосенсора з використанням оптимізованого складу буферного розчину. Аналітичні характеристики розробленого біосенсора свідчили про перспективність його застосування при аналізі концентрації аргініну в реальних зразках. Для апробації біосенсора проведено визначення аргініну в різних харчових добавках. Обрано найбільш ефективну методику біосенсорного аналізу реальних зразків, а саме метод стандартних додавань. Вивчено, як змінюється відтворюваність безперервної роботи біосенсора під час аналізу концентрації аргініну в реальних зразках та вплив різних варіантів пробопідготовки на точність визначення аргініну. Доведено, що біосенсорні результати гарно корелюють з методами іонообмінної хроматографії та спектрофотометричного аналізу.

Розроблений та адаптований в роботі біосенсор є ефективним для точного визначення аргініну в дієтичних добавках, призначених для корекції його дефіциту в організмі людини.

Ключові слова: аргінін, моноферментний біосенсор, аргініндеїміназа, кондуктометричний перетворювач, аналіз реальних зразків

ВСТУП

Сьогодні лікування та профілактика дефіциту основних поживних і біологічно активних речовин в організмі людини має важливе значення для відновлення основних функцій організму, і тому має все ширше використовуватися в медицині з лікувальною та реабілітаційною метою. Однією із сполук, яка відіграє особливу роль у ряді процесів синтезу в організмі, є умовно незамінна амінокислота L-аргінін. Відомо, що в організмі здорової людини аргінін може синтезуватися з L-глутаміну, тоді як в організмі недоношених дітей, людей похилого віку, а також при деяких станах і захворюваннях він не виробляється або виробляється в недостатній кількості [1, 2].

В організмі людини аргінін входить до складу пептидів і білків, виступає попередником сечовини, проліну, глутамату, креатину, агматину, L-орнітину, L-цитруліну, γ -аміномасляної кислоти і є єдиним попередником оксиду азоту NO. Важливо відзначити, що дефіцит аргініну є ключовим етапом у низці механізмів, що призводять до розвитку ендотеліальної дисфункції та дефіциту NO при ряді патологій. Тому лікарські засоби та БАДи на основі L-аргініну сьогодні широко використовуються для профілактики та лікування всіх проявів ендотеліальної дисфункції атеросклеротичного походження (серцевої, церебральної, периферичної), гіпертензії (артеріальної, легеневої, ниркової), печінкових та шкірних захворюваннях, імунodefіцитних станах, остеоартрозах [3–8], а також у посттравматичний і післяопераційний періоди для швидкого загоєння ран, опіків і пошкоджень. Оскільки контроль якості харчових продуктів і біологічно активних добавок не завжди здійснюється на належному рівні або не здійснюється взагалі, можливість проведення точного, селективного і швидкого визначення концентрації аргініну є актуальною для забезпечення належного контролю їхньої якості. У свою чергу, такий контроль може стати основою для впровадження спрощеної процедури дослідження якості аргінін-вмістної продукції, призначеної для підтримки здоров'я та/або задоволення гострої потреби організму в аргініні.

На сьогодні найбільш поширеними методами визначення аргініну в лабораторній практиці є такі методи як іонообмінна та високоефективна рідинна хроматографія [9, 10], флуориметричний [11], хемілюмінесцентний [12], спектрофотометричний аналіз [13, 14], каплярний електрофорез [15], мас-спектрометрія [16]. Окрему групу методів, які також широко застосовуються, становлять ферментативні методи [17–20]. Описані на сьогодні ферментативні методики аналізу найчастіше базуються на одній або кількох реакціях перетворення аргініну за участю аргінази, уреази та глутаматдегідрогенази [17], аргініндеімінази, аргініносукцинатсинтази, піруватфосфатдікінази, піруватоксидази та пероксидази хрому [19], аргінази та уреази [20] або аргініндеімінази [18].

Незважаючи на гарні аналітичні характеристики, застосування традиційних, інструментальних методів аналізу багатокомпонентних проб, таких як харчові продукти та БАДи, часто вимагає тривалої пробопідготовки, наявності висококваліфікованого персоналу, використання дорогих реактивів, дорогого та громіздкого обладнання. Враховуючи вищезазначене, перехід до швидких, портативних, але водночас надійних і відносно дешевих методів і приладів для визначення аргініну є досить актуальним напрямком сучасної лабораторної практики.

Як було показано раніше, методи аналізу, які використовують біоматеріали у поєднанні з електрохімічними, оптичними чи іншими системами вимірювання сигналу, мають великі перспективи [21]. До таких методів належать електрохімічні біосенсиори, які порівняно з іншими типами сенсорних систем характеризуються відносно простою технологією виготовлення та використання, швидкістю аналізу та обробки результатів, широким спектром речовин, які можна визначити.

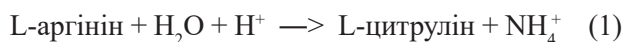
На сьогодні найбільш відомі біосенсорні системи для визначення аргініну виготовлені на основі реакцій розщеплення аргініну за участі таких ферментів як аргініндеіміназа, аргіназа, уреаза, L-аргініндекарбоксилаза та різних типів фізичних перетворювачів (ампе-

рометричних або кондуктометричних перетворювачів, рН-чутливих польових транзисторів та іоноселективних електродів) [22–25].

Більшість біосенсорів для визначення аргініну, що описані в літературі, розроблені на основі мультиферментних систем та демонструють обмежений потенціал для аналізу реальних зразків [26–32]. Враховуючи переваги одноферментних біосенсорів порівняно з мультиферментними (набагато вища або абсолютна селективність до цільового аналіту, нижча вартість і простіша процедура розробки та виготовлення біоселективних елементів), зрозуміло, що використання одноферментних біосенсорів для аналізу концентрації аргініну у реальних зразках є більш доречним і актуальним.

У цій роботі розроблено новий кондуктометричний біосенсор для визначення L-аргініну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази (АДІ), яка розщеплює аргінін в наступній реакції:

АДІ (ЕС3.5.3.6)



Основним вимірюваним параметром даного біосенсора є зміна провідності розчину (ΔG) у приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача внаслідок зміни концентрації та рухливості іонів у розчині під час ферментативного розщеплення молекули аргініну.

В роботі був використаний високостабільний фермент аргініндеїміназа з *Mycoplasma hominis*, отриманий на основі модифікованого протоколу синтезу [33]. Для отримання необхідного ферментного препарату було сконструйовано рекомбінантний штам *E. coli*, що надекспресує АДІ-кодуючий ген *M. hominis*. Цей ферментний препарат характеризувався високою питомою активністю протягом 5 років при зберіганні при +4 °C.

Робота була направлена на проведення серії оптимізацій, спрямованих на розробку високочутливого біосенсора на основі АДІ з *Mycoplasma hominis*, який можна використовувати для визначення L-аргініну в реальних

зразках. Як контрольні методи використовувалися спектрофотометрія та іонно-обмінна хроматографія.

Результати, отримані в рамках роботи, були ретельно вивчені та проаналізовані, а також оцінено перспективність використання такого біосенсора для визначення концентрації аргініну у фармацевтичних зразках.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали

Для роботи використовували препарат рекомбінантної аргініндеїмінази (ЕС 3.5.3.6) із *Mycoplasma hominis*, експресованої в клітинах *Escherichia coli*, з об'ємною активністю 147 од.акт./мл, бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), L-аргінін, інші амінокислоти, лимонна та аскорбінова кислоти виробництва «Sigma-Aldrich» (Китай, Бельгія, США, Великобританія), гліцерин виробництва «Макрохім» (Україна). NaCl отримано від «Sigma-Aldrich» (США). Як зразки фармацевтичних препаратів для контролю концентрації аргініну використовували капсули «L-аргінін» від Solgar Inc. (США), капсули «L-аргінін» від Now Foods Corp. (США) та капсули «L-аргінін» від ТОВ «Еліт-Фарм» (Україна).

В якості буферного розчину використовували однокомпонентний фосфатний буфер на основі KH_2PO_4 . Всі інші хімічні речовини, використані в роботі, були вітчизняного виробництва та ступеню чистоти х.ч. або ч.д.а. Для приготування розчинів використовували дистильовану або ультрачисту воду.

Кондуктометричні перетворювачі та вимірювальне обладнання для біосенсорного аналізу

Як фізичні перетворювачі використовувалися кондуктометричні датчики, виготовлені за нашими рекомендаціями в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Кожен з них складався з двох пар тонкошарових гребінчастих електродів, виготовлених методом вакуумного напилен-

ня золота на непровідну підкладку із ситалу (геометричні розміри підкладки – 5×30 мм). Для покращення адгезії золотого шару до ситалу між ними наносили допоміжний шар хрому товщиною 5 нм. Електроди перетворювача мали гребінчасту геометрію з товщиною шару золота близько 150 нм. Площа чутливої поверхні кожної пари електродів становила близько 3 мм^2 , а відстань між растровими пальцями і ширина самих пальців – близько 20 мкм. Вимірювання проводились в дифе-

ренційному режимі для реєстрації змін електропровідності, що виникають в розчині при електродного простору біосенсора внаслідок ферментативної реакції (рис. 1а).

Під час створення біоселективного елементу біосенсора чутлива поверхня однієї пари електродів використовувалась для нанесення робочої мембрани на основі аргініндеїмінази (чутлива пара електродів W), тоді як поверхня іншої пари використовувалась для нанесення референтної мембрани на основі лише БСА

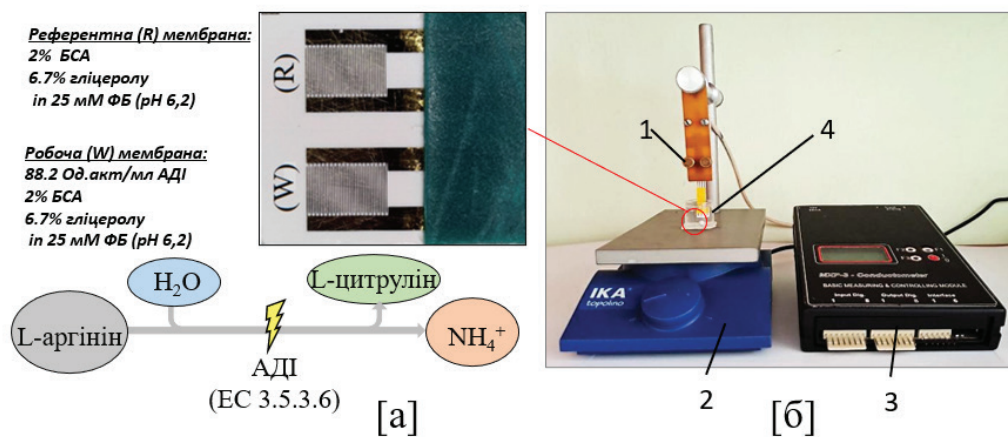


Рис. 1. Схема портативного кондуктометричного аналізатора [а] та зовнішній вигляд кондуктометричної установки [б]. 1 – Тримач біосенсора, 2 – магнітний перемішувач, 3 – кондуктометричний аналізатор, 4 – вимірювальна комірка з робочим розчином.

(референтна пара R). Обидві мембрани біосенсора (робоча та референтна) для найкращої роботи диференційного режиму містили однакову кількість білку.

Біосенсорні вимірювання проводили з використанням двох кондуктометричних вимірювальних систем – портативної та стаціонарної.

Портативний прилад для кондуктометричних вимірювань складався з диференційного кондуктометра, розробленого спільно з Інститутом електродинаміки НАН України (м. Київ), електродотримача, з'єднувальних елементів для сполучення всіх компонентів системи, комп'ютера та відповідного програмного забезпечення. У такій системі кондуктометричні перетворювачі підключалися до компенсаційної мостової схеми змінного струму з амплітудою напруги – 14 мВ і частотою 66 кГц.

Структурне зображення компенсаційної мостової схеми диференційного кондуктометра та детальний опис пристрою наведені в [34, 35]. Зовнішній вигляд кондуктометричної установки представлений на рис. 1б.

Дослідження впливу параметрів робочого розчину на функціонування біосенсора проводили на стаціонарній вимірювальній установці для кондуктометричних вимірювань [36]. У попередніх роботах ця установка широко використовувалася при розробці різноманітних кондуктометричних ферментних біосенсорів [37]. При використанні стаціонарної установки змінна напруга амплітудою 10 мВ і частотою 100 кГц від генератора сигналів ГЗ–118 подається на дві пари електродів кондуктометричного перетворювача. Більш детально зі схемою цієї установки можна ознайомитися в попередніх роботах [36, 37].

Виготовлення біоселективного елементу

Робоча та референтна мембрани біосенсора виготовлялись методом ковалентного зшивання біфункціональним агентом – глутаровим альдегідом. Для приготування робочої мембрани біосенсора розчин аргініндеїмінази з концентрацією 88,2 од.акт./мл і розчин БСА (масова частка в розчині 2%) гомогенізували в 25 мМ фосфатному буферному розчині (рН 6,2), що містить 6,7% гліцерину. Розчин для приготування референтної мембрани містив таку ж сумарну кількість білка, як і розчин для робочої мембрани, але частка АДІ була замінена на БСА. Кожен із цих розчинів наносили на чутливу поверхню однієї з пар електродів кондуктометричного перетворювача і розподіляли по ній до утворення однорідного тонкого шару. Імобілізацію проводили в ексикаторі в насичених парах глутарового альдегіду. Час імобілізації становив 30 хвилин. Після імобілізації біосенсор висувували на повітрі протягом 10 хв, а потім промивали свіжими порціями фосфатного буферного розчину протягом 10–15 хв для видалення незв'язаних компонентів біомембран. Між вимірюваннями біосенсор зберігали в сухому стані за температури +4 °С.

Методики проведення біосенсорних вимірювань

Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці (2 мл), заповненій робочим буферним розчином (5 мМ фосфатний буферний розчин, рН 6,2) при постійному перемішуванні. Необхідну концентрацію модельного розчину аргініну для вимірювань в комірці отримували шляхом додавання аліквот стокового розчину аргініну до буферного розчину. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з локальними змінами температури, рН і випадковими електричними струмами, усувалися за допомогою використання диференційного режиму вимірювання.

Для вимірювання концентрації L-аргініну в реальних зразках використовували та порівнювали три методи визначення невідомих концентрацій L-аргініну: класичний біосенсорний

метод з використанням калібрувальної кривої, метод стандартних додавань і спрощений метод аналізу за пропорцією.

При використанні методу калібрувальної кривої спочатку отримували калібрувальну криву біосенсора та визначали її лінійний діапазон. Виходячи з лінійного діапазону роботи біосенсора вибирали коефіцієнт розведення зразка. Відгуки біосенсора отримували для кожної аліквоти зразка в кількох повторях ($n=3-5$), розраховували середнє значення та рівняння кривої ($y=a+bx$), що відповідає лінійному робочому діапазону калібрувальної кривої, після чого розраховували концентрацію аргініну в вимірювальних комірках.

При використанні методу стандартних додавань відгук біосенсора спочатку отримували на аліквоту зразка, а потім на кілька аліквот модельного розчину L-аргініну відомої концентрації (три послідовні додавання). Таким чином отримувалось чотири послідовні відгуки, з яких будували графік таким чином, що відгук на досліджуваний зразок відкладали на осі у. Лінійна екстраполяція цього графіка в результаті перетинала вісь x у точці, що відповідає концентрації L-аргініна в вимірювальній комірці.

Використовуючи спрощений метод аналізу за пропорцією, ми отримували відгук біосенсора на додавання аліквоти зразка, а потім додавали одну аліквоту стокового розчину L-аргініну. Далі порівнювали отримані відгуки за пропорцією та розраховували концентрацію L-аргініна в зразку з урахуванням його розведення. Цей метод найпростіший з попередніх, але його точність часто буває недостатньою.

Відповідно, з використанням кожної з цих трьох методик, отримували концентрацію аргініну у вимірювальній комірці після додавання в неї реального зразку. Далі перераховували вміст аргініну в зразку, враховуючи коефіцієнт розведення.

Методики попередньої підготовки зразків до вимірювання

Було використано та перевірено 3 методики попередньої підготовки зразків до вимірю-

вання. Кожна з них починалась з розведення вмісту капсули фармацевтичного препарату в 20 мл буферного розчину. Після цього, в першому випадку подальшої передпідготовки не проводилось, в другому – проводили фільтрування отриманого розчину через фільтри 1 мкм і 0,22 мкм (№ за кат. 729228, Chromafil Xtra, Macherey-Nagel, Німеччина та кат. № CE0459, Millex GP, Merck Millipore, Ірландія, відповідно), в третьому – розчин центрифугували при 12000 об/хв протягом 10 хв на центрифугі MicroMed-8.10 (Україна). Одразу після цього отримані розчини використовували для аналізу впливу процесу попередньої підготовки зразків на результати аналізу реальних зразків.

Референтні методи визначення аргініну в фармацевтичних препаратах

Паралельно з біосенсорним аналізом для визначення концентрації аргініну в дієтичних добавках використовували два контрольні методи, а саме спектрофотометричний аналіз та іонно-обмінну хроматографію. Для визначення концентрації аргініну в реальних зразках ферментативним спектрофотометричним методом використовували L-arginine Assay Kit (Sigma Aldrich, Німеччина), до складу якого входили буфер для аналізу, суміш ферментів, суміш А, суміш Б, суміш для очищення зразків і стандартний розчин аргініну. Аналіз проводили згідно з протоколом, наданим виробником.

Кількісне визначення вмісту аргініну в досліджуваних зразках методом хроматографії проводила незалежна лабораторія ТОВ «Експертний центр діагностики та лабораторного забезпечення «Biolights» (м. Київ, Україна). Використовували метод іонообмінної хроматографії з катіонообмінною колонкою та постколонковою дериватизацією нінгідрином. Визначення проводили при довжині хвилі 570 нм. Температура дериватизації становила 130°C.

Для обробки експериментальних даних, отриманих в ході роботи, використовували стандартні методи варіаційної статистики. Дослідження проводили щонайменше в 3–5 повторях. При статистичній обробці результатів визначали середнє арифметичне та його стан-

дартне відхилення, дані вважали достовірними при $p < 0,05$. Обробку даних та розрахунки проводили за допомогою графічного редактора OriginLab (OriginPro версія 8.5).

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз основних аналітичних характеристик кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеїмінази

Першим етапом адаптації біосенсора на основі аргініндеїмінази для визначення аргініну в зразках фармацевтичних препаратів стало дослідження та узагальнення його основних аналітичних характеристик. Для цього аналізувались типові відгуки біосенсора на основі АДІ (рис. 2). Шляхом аналізу базової лінії біосенсора було визначено шум і дрейф сигналу, розрахована мінімальна межа детекції біосенсора (рис. 3). Цей параметр був розрахований на основі типового відгуку біосенсора на аргінін, а потім підтверджений експериментально як мінімальна концентрація аргініну, при якій відгук біосенсора перевищує базовий рівень шуму втричі. Таким чином, мінімальна межа детекції становила 2 мкМ. Також було визначено що середній час відгуку становив 1–1,5 хв, а тривалість усієї процедури аналізу – лише 8 хв.

Для подальшого вивчення параметрів біосенсора для аналізу L-аргініну в модельних розчинах була побудована детальна калібрувальна крива (рис. 3).

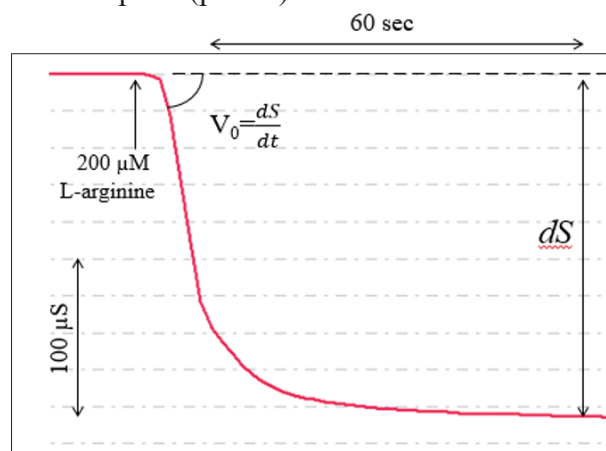


Рис. 2. Типовий відгук біосенсора на додавання 1 мМ аргініну в 5 мМ фосфатний буферний розчин, рН 6,2.

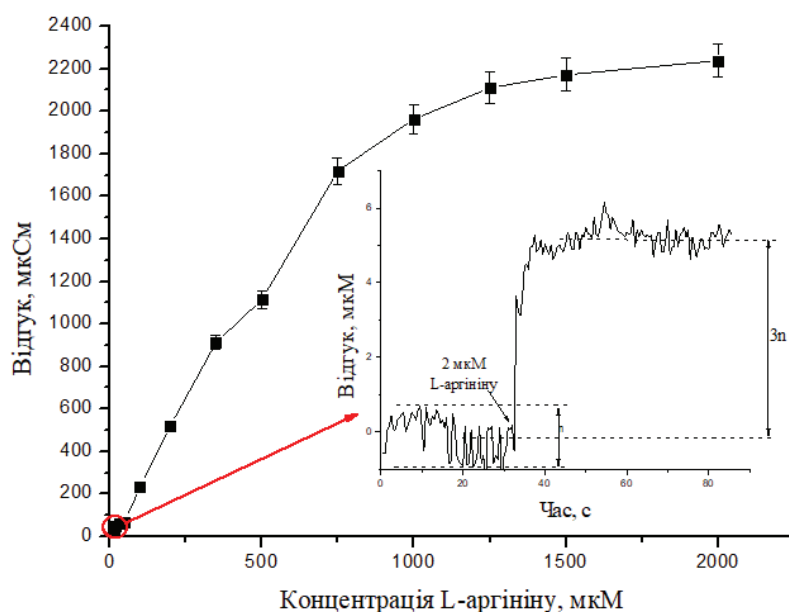


Рис. 3. Калібрувальна крива із розрахунком мінімальної границі визначення концентрації аргініну. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2.

Теоретично, лінійна ділянка цієї калібрувальної кривої може бути використана надалі для аналізу концентрації аргініну в реальних зразках.

Побудовану калібрувальну криву аналізували стосовно її динамічного діапазону аналізу аргініну (до 2000 мкМ). У свою чергу, лінійний робочий діапазон біосенсора на основі АДІ знаходився в діапазоні від 20 до 750 мкМ аргініну і описувався наступним рівнянням:

$$G = 4,396 + 2,273 \times C, \quad (2)$$

де G – відгук біосенсора на додавання аліквоти аргініну до вимірювальної комірки (мкСм), а C – концентрація доданого L-аргініну (мкМ), $R^2 = 0,995$.

Для успішного застосування новоствореного біосенсора на практиці, необхідно вивчити його стабільність під час роботи та зберігання. У нашій попередній роботі [38], яка була присвячена початковому етапу розробки біосенсора на основі АДІ, ми не заглиблювалися в детальну оптимізацію біосенсора для визначення аргініну в реальних зразках, але деякі основні параметри було перевірено. На-

приклад, відтворюваність сигналу біосенсора на основі АДІ під час безперервної роботи виконували шляхом моніторингу його відгуків на єдину концентрацію аргініну (1,5 мМ) протягом кількох годин. Показано, що відносне стандартне відхилення сигналів біосенсора під час експерименту становило лише 6,1%. Також попередньо було перевірено, як змінюється чутливість біосенсора до аргініну при тривалому зберіганні в різних умовах. Стабільність біосенсора при зберіганні досліджували протягом місяця. Встановлено, що біосенсор на основі АДІ найкраще зберігається при температурі -18°C (зберігалось 80% початкової активності сенсора) після місяця зберігання [38].

В цій роботі досліджено операційну стабільність біосенсора, що є також важливим показником успішного функціонування. Для цього протягом двох тижнів проводились вимірювання перші 4 дні кожного дня, надалі через кожні 3 дні. Щоразу отримували 6–7 відгуків на однакову концентрацію субстрату (рис. 4). Між вимірюваннями біосенсор зберігали в сухому стані при $+4^\circ\text{C}$. Як видно з рис. 4, біосенсор характеризувався прийнятною стабільністю роботи протягом перших трьох днів вико-

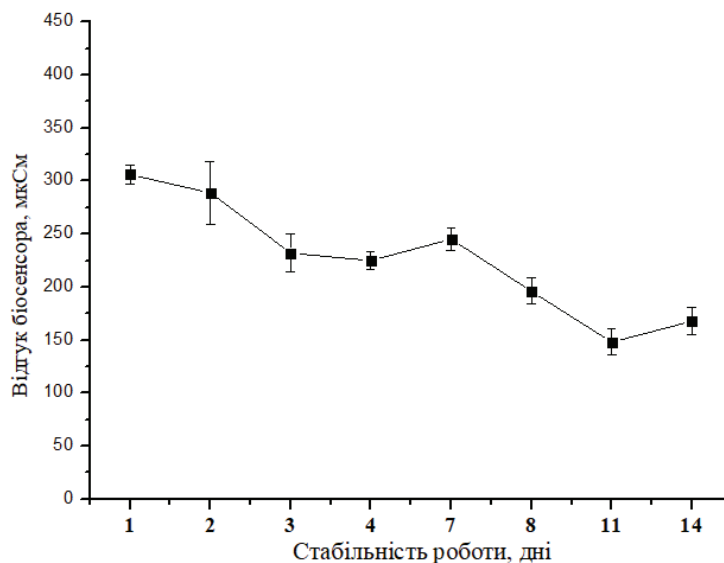


Рис. 4. Операційна стабільність роботи біосенсора на основі АДІ протягом 14 днів. Відгуки біосенсора на 0,25 мМ L-аргініну в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2.

ристання; після першого тижня роботи середнє значення відгуку біосенсора знизилося на 20%, а після закінчення експерименту (через два тижні) – на 45%. В цілому можна вважати, що розроблений біосенсор характеризується гарною операційною стабільністю роботи за тривалого використання.

Одним із найважливіших критеріїв перспективності подальшого використання розробленого біосенсора для аналізу реальних

зразків є його селективність щодо можливих інтерферентів. Для визначення даного параметру ми досліджували чутливість розробленого біосенсора до ряду протеїногенних амінокислот, що можуть бути в зразках фармацевтичних препаратів у порівнянні з його чутливістю до аргініну (рис. 5). Відгуки біосенсора розраховували у відсотках, де за 100% приймали відгук біосенсора на L-аргінін такої ж концентрації.

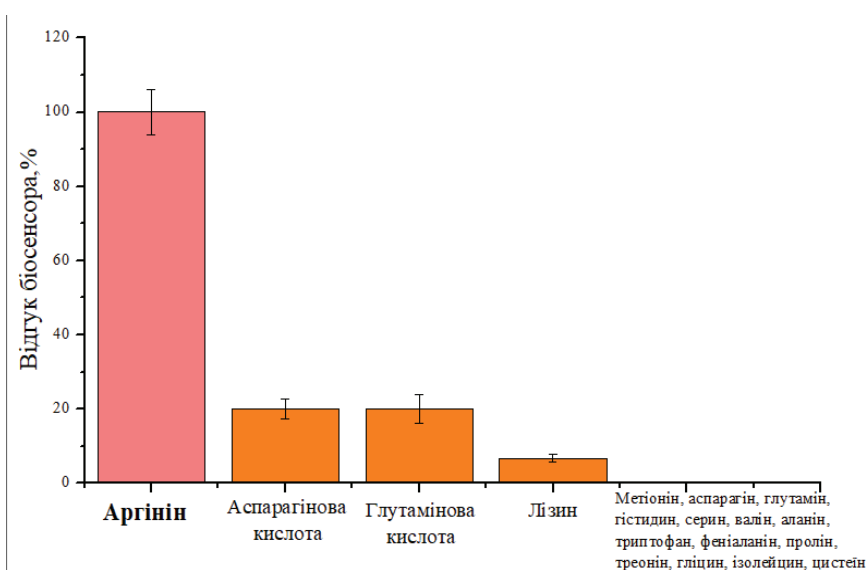


Рис. 5. Селективність біосенсора на основі аргініндеїмінази. Відгуки біосенсора на 100 мкМ речовин в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2.

Це дослідження показало, що у біосенсора не виникало реакції на більшість протеїногенних амінокислот, за винятком L-лізину, аспарагінової та глутамінової кислот. Відгуки біосенсора на вищезазначені сполуки становили <20% відгуку на L-аргінін. На нашу думку, дані результати можуть бути пов'язані з не-селективною зміною провідності досліджуваного розчину, спричиненою обмеженнями диференційного режиму, оскільки додавання великої концентрації високозаряджених молекул може викликати значне збільшення фонові провідності розчину, яке важко компенсувати не ідеальним диференційним режимом.

Крім того, в рамках вивчення селективності розробленого біосенсора, була перевірена чутливість біосенсора до деяких електроактивних речовин, які можуть бути присутніми в продуктах харчування, а саме до аскорбінової та лимонної кислот. Величина відгуку біосенсора на лимонну кислоту становила 133,3%, а на аскорбінову кислоту – 53,3% відносно відгуку біосенсора на таку ж концентрацію L-аргініну. Очевидно, що такі відгуки біосенсора є неінформативними і також зумовлені обмеженнями диференційного режиму вимірювання, оскільки ці органічні кислоти викликають значне підвищення фонові провідності досліджуваного розчину.

Оскільки присутність цих кислот у реальних зразках може дати неспецифічне завищення результату аналізу при визначенні концентрації L-аргініну, важливо контролювати присутність цих речовин перед проведенням аналізу. За їх наявності ми вважаємо за доцільне використовувати додаткові мембрани на поверхні кондуктометричного перетворювача, які б служили механічним бар'єром для проникнення таких речовин до поверхні перетворювача і тим самим мінімізували б їх внесок у фонову провідність в розчині в приелектродному шарі біосенсора. На нашу думку, однією з можливих речовин для використання в якості мембрани може бути поліфенілендіамін, який у наших попередніх роботах дав змогу значно підвищити селективність амперометричних електродів [39, 40].

З метою оцінити перспективність розробленого біосенсора для практичного застосування, необхідно було оцінити його основні аналітичні характеристики. Відповідно проведено аналіз відгуків, калібрувальної кривої, стабільності та селективності біосенсора при роботі в робочому розчині оптимізованого складу. Усі основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора були зібрані в табл. 1.

Таким чином, ліміт детекції біосенсора становив 2 мкМ, лінійний діапазон роботи –

Таблиця 1.

Основні аналітичні характеристики кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеїмінази

Лінійний діапазон, мкМ	Чутливість мкСм/мМ	Межа виявлення, мкМ	Шум базової лінії, мкСм/хв	Час відгуку, хв	Час аналізу, хв	RSD, %
20,0–750,0	1927,0	2,0	1,6	1,0–1,5	8,0	6,1

від 20 до 750 мкМ, а динамічний – від 0 до 2000 мкМ. Чутливість біосенсора до L-аргініну становить 1927 мкСм/мкМ, а шум та дрейф базової лінії складають 1,6 мкСм/хв та 0,72 мкСм/хв відповідно. Отримані аналітичні характеристики підтверджують перспективність біосенсора для подальшого кількісного аналізу L-аргініну в зразках фармацевтичних зразків.

Визначення аргініну в реальних зразках за допомогою кондуктометричного біосенсора на основі АДІ

Першим етапом було досліджено вплив різних процедур підготовки проб на результати біосенсорних вимірювань. Визначення проводилось для одного із зразків, а саме для харчової добавки «L-аргінін 500 мг» виробництва «Solgar Vitamin and Herb». Ми порівнювали результати

вимірювання в зразку без попередньої пробопідготовки (тільки перенесення вмісту капсули в розчин) і після наступних варіантів обробки зразка з метою видалення сполук, які можуть

впливати на точність визначення аргініну: (1) фільтрування та (2) центрифугування. Результати біосенсорного визначення аргініну в зразку після пробопідготовки представлені в рис. 6.

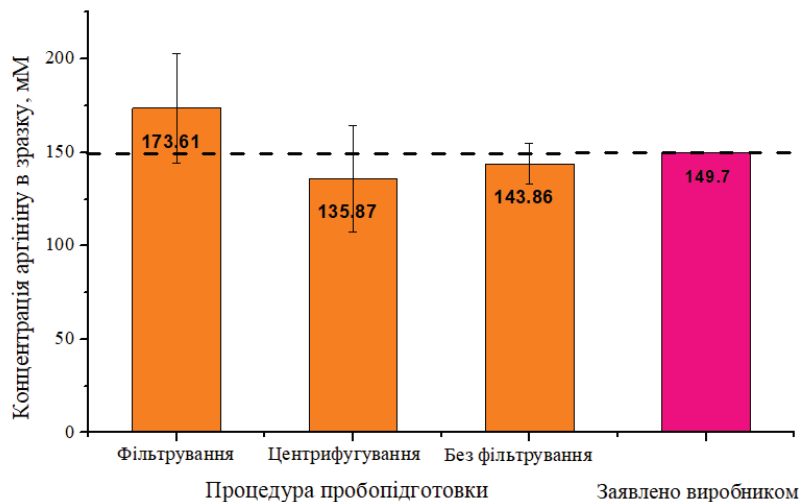


Рис. 6. Вплив різних методів пробопідготовки на результати біосенсорного визначення L-аргініну в капсулах фармацевтичних препаратів. Вимірювання в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2.

Отримані дані дозволяють зробити висновки, що фільтрація зразка перед аналізом призводить до попереднього концентрування зразка і, таким чином, до завищення результату вимірювання аргініну. Порівнюючи дані біосенсорного визначення для нефільтрованої проби та вміст аргініну заявлений виробником, можна припустити, що для отримання достовірного результату аналізу достатньо розведення проби без її подальшої додаткової обробки.

Варто також зазначити, що центрифугування нефільтрованого зразка також було непотрібним прийомом, оскільки воно призводило до деякого заниження результату вимірювання, очевидно, через затримку фільтром певної кількості L-аргініну з розчину. З проведеного дослідження можна зробити висновок, що використання розробленого біосенсора для аналізу капсул фармацевтичних зразків не вимагає додаткових процедур підготовки зразків що дає перевагу біосенсорному методу аналізу порівняно з традиційними аналітичними методами.

Апробацію кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеїмінази під час аналізу реальних зразків проведено шляхом визначення концентрації L-аргініну в трьох видах аргінінвмісних біологічно активних добавок, а саме в капсулах «L-аргінін» виробництва ТОВ «Еліт-Фарм» (Дніпро, Україна), капсулах «L-аргінін 500 мг» виробництва «Now Foods» (США) та капсулах «L-аргінін 500 мг» виробництва «Solgar Vitamin and Herb» (США). Перед аналізом вміст кожної капсули розчиняли в 5 мМ фосфатному буферному розчині (рН 6,2). Для визначення невідомих концентрацій аргініну в зразках було випробувано три біосенсорні методи (див. розділ матеріали та методи). Для вибору найкращого біосенсорного методу для визначення концентрації аргініну в зразку «Solgar Vitamin and Herb» було проведено 5 серій вимірювань усіма трьома методами (Рис. 7).

Як видно з рис. 7, метод з використанням калібрувальної кривої виявився найбільш неточним у порівнянні з даними, заявленими

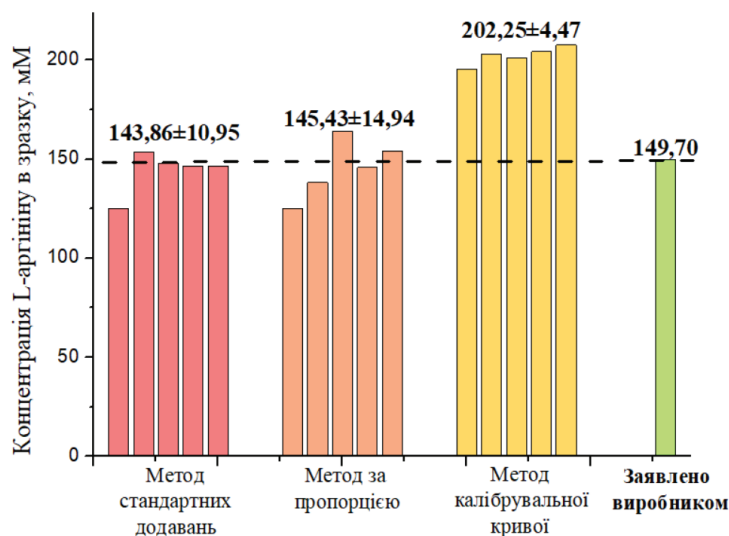


Рис. 7. Результати визначення концентрації L-аргініну у фармацевтичному зразку з використанням трьох біосенсорних методів. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2.

виробником, що можна пояснити тим, що цей метод не враховує вплив матриці реального зразка. Метод розрахунку з використанням пропорції, як і очікувалося, був досить точним в розрахунку середнього значення, проте похибка вимірювання була найбільшою.

Для подальших експериментів було вирішено використовувати метод стандартних додавань, оскільки результати визначення аргініну цим методом показали гарну кореляцію з заявленою виробником концентрацією, а похибка вимірювання була в межах норми. Однак, при використанні даного методу (стандартних додавань) треба контролювати аби всі послідовні відгуки (стандартні додавання відомих концентрацій аргініну) були в межах лінійного діапазону роботи біосенсора.

Відомо, що при роботі біосенсорів з реальними зразками відтворюваність результатів погіршується порівняно з роботою в модельних розчинах. Відповідно, необхідним етапом роботи було дослідження стабільності (відтворюваності) процедури вимірювання концентрації аргініну в реальних зразках. Для цього протягом одного робочого дня було проведено серію біосенсорних вимірювань концентрації аргініну в зразку «Solgar Vitamin and Herb». Визначення концентрації аргініну в реально-

му зразку проводили 15 разів одним і тим же біосенсором. При цьому відносне стандартне відхилення становило 10,8%, порівняно з 6,2% для вимірювання аліквот модельного розчину, проте це добре відомий ефект для аналізу реальних зразків, зокрема фармацевтичних (рис. 8). Однак, дана величина похибки є допустимою для подальшого використання біосенсора для вимірювання реальних зразків.

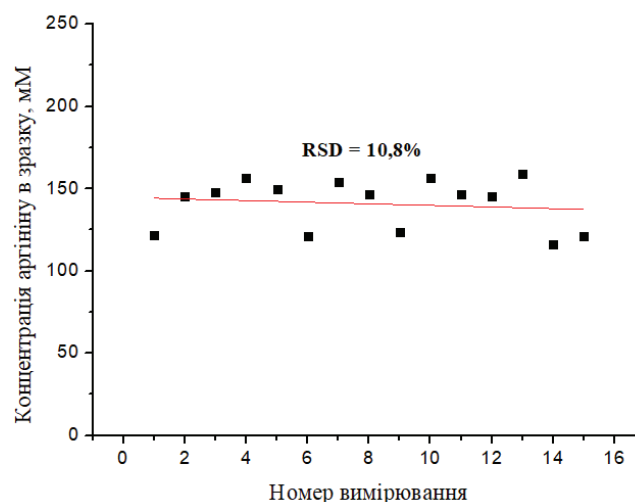


Рис. 8. Відтворюваність результатів вимірювання концентрації аргініну у реальному зразку біосенсором на основі АДІ. Вимірювання в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,2 (метод стандартних додавань (500-кратне розведення)).

Для контролю результатів біосенсорного вимірювання та даних, наданих виробниками, концентрацію аргініну в фармацевтичних зразках також визначали двома контрольними методами – методом іонообмінної хроматографії (проведено незалежною лабораторією Експертного центру діагностики та лабораторного забезпечення «Biolights») та спектрофотометричним методом (виконувалось з використан-

ням реактивів та методики використання комерційного набору МАК370, «Sigma-Aldrich»). Результати біосенсорного визначення аргініну в капсулах БАД у порівнянні з результатами контрольних методів та даними, заявленими виробниками, наведені на рис. 9.

Аналізуючи результати аналізу зразків фармацевтичних препаратів усіма трьома методами було розраховано коефіцієнти кореляції

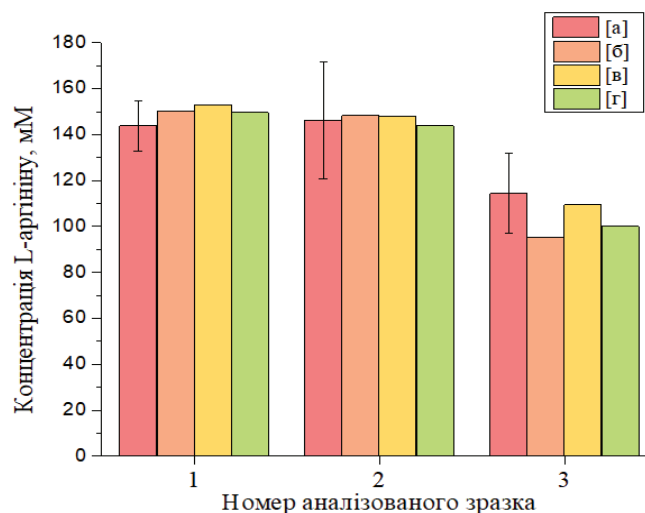


Рис. 9. Порівняння даних визначення концентрації L-аргініну у зразках БАДів, отриманих за допомогою біосенсорного методу ($n = 5$) та контрольних методів. Зразки БАД: 1 – «L-аргінін 500 мг» («Solgar Vitamin and Herb»); 2 – «L-аргінін 500 мг» («Now Foods»); 3 – «L-аргінін» (ТОВ «Еліт-Фарм»). [а]- біосенсорний метод, [б]- іонно-обмінна хроматографія, [в]- спектрофотометричний метод, [г]-заявлено виробником.

між різними методиками. На підставі розрахованих коефіцієнтів кореляції встановлено, що результати визначення L-аргініну біосенсором на основі аргініндеїмінази добре корелюють як з даними, отриманими методом іонообмінної хроматографії, так і з результатами спектрофотометричного дослідження. метод; коефіцієнти кореляції становили $R^2=0,987$ та $R^2=0,997$ відповідно. Отримана майже ідеальна кореляція між усіма методами вказує на те, що концентрації аргініну в фармацевтичних зразках правильно вказані і виробниками.

ВИСНОВКИ

Дана робота була спрямована на розробку, адаптацію та оптимізацію нового моноферментного кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну в фармацевтичних

препаратах. Біосенсор створений на основі рекомбінантної АДІ з *Mycoplasma hominis* і призначений для точного визначення концентрації аргініну в дієтичних добавках. Біосенсор було створено шляхом іммобілізації АДІ на чутливій поверхні гребінчастих електродів кондуктометричного перетворювача з використанням методики ковалентного зв'язування за допомогою глутарового альдегіду.

В процесі дослідження було перевірено відтворюваність сигналу біосенсора при вимірюванні модельного розчину аргінініну та при вимірюванні вмісту аргініну в реальних зразках в буферному розчині з оптимізованим складом. Біосенсор характеризувався хорошою відтворюваністю відгуків на додавання модельного розчину аргінініну ($RSD=6,1\%$) і при вимірюваннях реальних зразків ($RSD=10,8\%$).

З метою перевірки можливість подальшого застосування розробленого біосенсора для діагностики аргініну у фармацевтичних зразках, було проаналізовано його аналітичні характеристики. Лінійний діапазон роботи біосенсора при цьому становив 20–750 мкМ, мінімальна межа визначення – 2 мкМ. Середня тривалість аналізу становила 8 хвилин.

Концентрацію аргініну у фармацевтичних зразках визначали біосенсорним методом стандартних додавань, оскільки в ході експериментальної роботи він виявився найбільш ефективним і точним. Також, було проведено вибір методу попередньої обробки зразків та визначено, що найбільш оптимальним підходом є просте розчинення вмісту капсули фармацевтичного препарату в дистильованій воді без будь-якої подальшої додаткової обробки.

Встановлено, що результати визначення L-аргініну біосенсором на основі аргініндеїмінази добре корелюють як з даними, отриманими методом іонообмінної хроматографії, так і з результатами спектрофотометричного методу; коефіцієнти кореляції становили 0,987 та 0,997 відповідно.

Таким чином, кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази із *M. hominis* можна розглядати як перспективний аналітичний інструмент для високочутливого визначення концентрації L-аргініну в широкому спектрі реальних фармацевтичних зразків.

ПОДЯКИ

Частина роботи виконана в рамках виконання робіт за напрямком використання бюджетних коштів «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок» бюджетної програми КПКВК 6541230 (договір 2/9–2025). Робота була також підтримана грантом Фонду Саймонса № 1030279 (Сергій Дзядевич та Олександр Солдаткін). Автори також висловлюють подяку Сергію Ярмолюку (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна) за люб'язне надання зразків біологічно активних добавок для проведення аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1]. C. Tomlinson, M. Rafii, R. O. Ball, P. B. Pencharz. Arginine can be synthesized from enteral proline in healthy adult humans // *J. Nutr.*, 141, pp. 1432–1436 (2011).
- [2]. E. S. Köhler, S. Sankaranarayanan, C. J. Van Ginneken, P. Van Dijk, J. L. M. Vermeulen, J. M. Ruijter, W. H. Lamers, E. Bruder. The human neonatal small intestine has the potential for arginine synthesis; developmental changes in the expression of arginine-synthesizing and -catabolizing enzymes // *BMC Dev. Biol.*, 8, pp. 1–15 (2008).
- [3]. R. Yatsyshyn, M. Sukhorebska. Improving efficiency of treatment of patients suffering from osteoarthritis with co-existent abdominal obesity secondary to dyslipidemia // *Galician Med. J.*, 22, pp. 92–96 (2015).
- [4]. J. George, S. Ben Shmuel, A. Roth, I. Herz, S. Izraelov, V. Deutsch, G. Keren, H. Miller. L-arginine attenuates lymphocyte activation and anti-oxidized LDL antibody levels in patients undergoing angioplasty // *Atherosclerosis*, 174, pp. 323–327 (2004).
- [5]. F. Moutaouakil, H. El Otmani, H. Fadel, F. Sefrioui, I. Slassi. L-arginine efficiency in MELAS syndrome. A case report // *Rev. Neurol. (Paris)*, 165, pp. 482–485 (2009).
- [6]. R. K. Oka, A. Szuba, J. C. Giacomini, J. P. Cooke. A pilot study of L-arginine supplementation on functional capacity in peripheral arterial disease // *Vasc. Med.*, 10(3), pp. 265–274 (2005).
- [7]. M. Ozsoy, Y. Ozsoy, T. Coskun, K. Naml, A. Var, B. Özyurt. The effects of L-arginine on liver damage in experimental acute cholestasis: an immunohistochemical study // *HPB Surg.*, 2011, Article ID306069 (2011).
- [8]. J. K. Yoon, A. E. Frankel, L. G. Feun, S. Ekmekcioglu, K. B. Kim. Arginine deprivation therapy for malignant melanoma // *Clin. Pharmacol.*, 5, pp. 11–19 (2013).
- [9]. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization // *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, Volume 1 (2008).

- [10]. V. Gopalakrishnan, P. J. Burton, T. F. Blaschke. High-performance liquid chromatographic assay for the quantitation of L-arginine in human plasma // *Anal. Chem.*, 68(20), pp. 3520–3523 (1996).
- [11]. M.A. Parniak, G. Lange, T. Viswanatha. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures // *J. Biochem. Biophys. Methods*, 7(4), pp. 267–276 (1983).
- [12]. M.E. Gange, P.S. Francis, J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis. Determination of arginine in dietary supplements // *J. Sci. Food Agric.*, 85(7), pp. 1217–1221 (2015).
- [13]. Y. Tahboub. A predictive-kinetic method for the quantitation of amino acids with ninhydrin // *Anal. Chim. Acta*, (1985).
- [14]. H.A.A. Medien. Spectrophotometric method for determination and kinetics of amino acids through their reaction with syringaldehyde // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 54(2), pp. 359–365 (1998).
- [15]. A. Zinellu, S. Sotgia, L. Deiana, C. Carru. Quantification of arginine and dimethylated arginines in human plasma by field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection // *Methods Mol. Biol.*, 984, pp. 131–138 (2013).
- [16]. J. Martens-Lobenhoffer, S.M. Bode-Böger. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography–mass spectrometry with very straightforward sample preparation // *J. Chromatogr. B*, 798(2), pp. 231–239 (2003).
- [17]. R.M. De Orduña. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic end-point analysis // *J. Agric. Food Chem.*, 49(1), pp. 549–552 (2001).
- [18]. N. Y. Stasyuk, G. Z. Gayda, L. R. Fayura, Y. R. Boretskyy, M. V. Gonchar, A. A. Sibirny. Novel arginine deiminase-based method to assay L-arginine in beverages // *Food Chem.*, 201, pp. 320–326 (2016).
- [19]. M. Kameya, Y. Asano. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection // *Enzyme Microb. Technol.*, 57, pp. 36–41 (2014).
- [20]. N. Stasyuk, G. Gayda, H. Yepremyan, A. Stepien, M. Gonchar. Fluorometric enzymatic assay of L-arginine // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 170, pp. 184–190 (2017).
- [21]. M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier. Nanomaterials for biosensing applications: A review // *Front. Chem.*, 2, Article 108707 (2014).
- [22]. N. Verma, A. K. Singh, M. Singh. L-arginine biosensors: A comprehensive review // *Biochem. Biophys. Reports*, 12, pp. 228–239 (2017).
- [23]. N. Y. Stasyuk, G. Z. Gayda, A. E. Zakalskiy, L. R. Fayura, O. M. Zakalska, Sibirny, M. Nisnevitch, M. V. Gonchar. Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg) S nanoparticles // *Talanta*, 238, Article 122996 (2022).
- [24]. N. Stasyuk, G. Gayda, O. Demkiv, L. Darmohray, M. Gonchar, M. Nisnevitch. Amperometric biosensors for L-arginine determination based on L-arginine oxidase and peroxidase-like nanozymes // *Appl. Sci.*, 11(15), Article 7024 (2021).
- [25]. G. Gayda, N. Stasyuk, A. Zakalskiy, M. Gonchar, E. Katz. Arginine-hydrolyzing enzymes for electrochemical biosensors // *Curr. Opin. Electrochem.*, 33, Article 100941 (2022).
- [26]. O. V. Soldatkina, O. O. Soldatkin, T. P. Velychko, V. O. Prilipko, M. A. Kuibida, S. V. Dzyadevych. Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals // *Bioelectrochemistry*, 124, pp. 40–46 (2018).
- [27]. N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, B. Vus, Y. Koval'chuk, M. Gonchar. Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode // *Biosens. Bioelectron.*, 37(1), pp. 46–52 (2012).
- [28]. N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, M. Gonchar, Y. Koval'chuk. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial

- urease // *J. Mater. Sci. Eng. A*, 1, pp. 819–827 (2011).
- [29]. N. Y. Stasyuk, G. Z. Gayda, M. V. Gonchar. L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cells over-producing human liver arginase I // *Sensors Actuators B Chem.*, 204, pp. 515–521 (2014).
- [30]. T. Berninger, C. Bliem, E. Piccinini, O. Azzaroni, W. Knoll. Cascading reaction of arginase and urease on a graphene-based FET for ultrasensitive, real-time detection of arginine // *Biosens. Bioelectron.*, 115, pp. 104–110 (2018).
- [31]. O. Y. Saiapina, S. V. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, O. P. Soldatkin. Development and optimization of a novel conductometric bi-enzyme biosensor for L-arginine determination // *Talanta*, 92, pp. 58–64 (2012).
- [32]. O. Y. Saiapina, S. V. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault. Potentiality of application of the conductometric L-arginine biosensors for the real sample analysis // *Biopolym. Cell*, 28, pp. 441–448 (2012).
- [33]. S. Misawa, M. Aoshima, H. Takaku, M. Matsumoto, H. Hayashi. High-level expression of Mycoplasma arginine deiminase in Escherichia coli and its efficient renaturation as an anti-tumor enzyme // *J. Biotechnol.*, 36(2), pp. 145–155 (1994).
- [34]. S. Ghosh, K. Martin Sagayam, D. Halder, L. J. Johnston, Z. J. Jakubek, S. Beck, V. G. Melnyk, A. D. Vasylenko, L. N. Semenycheva, O. V. Slitskiy, O. Y. Saiapina, S. V. Dzyadevych. Solutions for enhancement of sensitivity and metrological reliability of conductometric biosensor systems // *Eng. Res. Express*, 3(4), Article 045008 (2021).
- [35]. S. V. Dzyadevych, V. G. Melnyk, P. I. Borshchov, S. V. Dzyadevych, O. Y. Saiapina, O. D. Vasylenko. Article in Technical Electrodynamics // *Tech. Electrodyn.*, 2021, pp. 68–75
- [36]. O. O. Soldatkin, V. M. Peshkova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, A. V. El'skaya. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor // *Mater. Sci. Eng. C*, 28(7), pp. 959–964 (2008).
- [37]. O. O. Soldatkin, O. F. Sosovskaya, I. V. Benilova, M. V. Gonchar, Y. I. Korpan. Enzymatic conductometric sensor for formaldehyde detection in model samples // *Biopolym. Cell*, 21(6), pp. 425–432 (2005).
- [38]. K. O. Berketa, O. Y. Saiapina, L. R. Fayura, A. A. Sibirny, S. V. Dzyadevych, O. O. Soldatkin. Development of conductometric arginine-sensitive biosensor based on arginine deiminase // *Sens. Electron. Microsyst. Technol.*, 20(1), pp. 36–53 (2023).
- [39]. I. S. Kucherenko. Characteristics and optimal working conditions of amperometric biosensor for adenosine triphosphate determination // *Biotechnol. Acta*, 7(1), pp. 66–74 (2014).
- [40]. D. Yu. Kucherenko, D. V. Siediuko, D. V. Knyzhnykova, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, A. P. Soldatkin. Optimization of the choline-sensitive biosensor for work in biological liquids // *Sens. Electron. Microsyst. Technol.*, 13(4), pp. 50–60 (2016).

Стаття надійшла до редакції 11.02.2025 р.

UDC: 543.555+577.15+543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325652>

ADAPTATION OF MONOENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR HIGHLY SENSITIVE DETERMINATION OF ARGININE IN DIETARY SUPPLEMENTS

*Kseniia Berketa^{1,2}, Olga Saiapina¹, Lyubov Fayura³, Andriy Sibirny^{3,4}, Sergiy Dzyadevych^{1,2},
Oleksandr Soldatkin^{1,5}*

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, 150 Akademika Zabolotnoho St,
Kyiv, 03680, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska St, Kyiv, 01003, Ukraine,

³ Institute of Cell Biology of NASU, 14/16 Drahomanova St, Lviv, 79005, Ukraine,

⁴ Rzeszow University, 4 Zelverovyha St, Rzeszow, 35601, Poland

⁵ National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”,
37 Beresteyskyi Ave, Kyiv, 03056, Ukraine

E-mail: ksenya.berketa.10@gmail.com, osayapina4@gmail.com, fayural@gmail.com,
sibirny@yahoo.com, dzyad@yahoo.com, soldatkinsasha@gmail.com

Abstract. The work describes the development of a monoenzyme conductometric biosensor for the determination of arginine in pharmaceutical samples. The biosensor was created by immobilizing recombinant arginine deiminase (ADI) on electrodes using covalent crosslinking in glutaraldehyde vapours. To achieve maximum sensitivity, the influence of the working buffer solution parameters, such as pH, buffer capacity, ionic strength, temperature, and protein concentration, on the operation of the biosensor was investigated.

The analytical characteristics, signal reproducibility, and storage stability of the biosensor with the optimized buffer solution were studied. To test the biosensor, arginine in food additives was determined using the standard addition biosensor method. The work shows that the results correlate well with ion-exchange chromatography and enzymatic spectrophotometric analysis. The influence of different sample preparation options on the accuracy of arginine determination was also studied.

The biosensor is effective for the accurate determination of arginine in dietary supplements intended to correct its deficiency.

Keywords: arginine, monoenzyme biosensor, arginine deiminase, conductometric transducer, real samples analysis