

BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI 10.18524/1815-7459.2016.4.86648

ОПТИМІЗАЦІЯ ХОЛІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ РОБОТИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

*Д. Ю. Кучеренко^{1,2}, Д. В. Сєдюко², Д. В. Книжникова², І. С. Кучеренко^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2},
О. П. Солдаткін^{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*

*e-mail: didukh.d@gmail.com, daria.siediuko@ukr.net, melonika5@gmail.com,
kucherenko.i.s@gmail.com, alex_sold@yahoo.com, a_soldatkin@yahoo.com*

ОПТИМІЗАЦІЯ ХОЛІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ РОБОТИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

*Д. Ю. Кучеренко, Д. В. Сєдюко, Д. В. Книжникова, І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін,
О. П. Солдаткін*

Анотація. В роботі проведено оптимізацію роботи амперометричного біосенсора для визначення концентрацій холіну в біологічних рідинах. Для створення біоселективного елементу використовували холін оксидазу, іммобілізовану на поверхні амперометричного перетворювача. Досліджено вплив параметрів робочого буферного розчину (буферна ємність, іонна сила, рН) на характеристики біосенсора. Показано залежність активності іммобілізованого ферменту від рН розчину та визначено рН оптимум роботи біосенсора. Біосенсор характеризується гарною відтворюваністю сигналу та операційною стабільністю. В роботі перевірено можливість зберігання біосенсора за різних умов. Найкращі результати спостерігалися при зберіганні за температури -18 °С. Завдяки використанню мембрани з полі-т-фенілендіаміну було значно зменшено вплив інтерферуючих речовин на роботу біосенсора. Досліджено основні аналітичні характеристики біосенсора: чутливість, лінійний діапазон роботи, мінімальну межу визначення,

шум, дрейф, відтворюваність відгуків біосенсора. Розроблений біосенсор можна використовувати для визначення концентрацій холіну в біологічних зразках.

Ключові слова: холін, холін оксидаза, амперометричний біосенсор, полі-*m*-фенілендіамін

OPTIMIZATION OF THE CHOLINE-SENSITIVE BIOSENSOR FOR WORK IN BIOLOGICAL LIQUIDS

D. Yu. Kucherenko, D. V. Siediuko, D. V. Knyzhnykova, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, A. P. Soldatkin

Abstract. In this work, an amperometric biosensor for determination of choline concentration in biological liquids was optimized. The enzyme choline oxidase was used as a bioselective material and was immobilized by crosslinking with bovine serum albumin via glutaraldehyde on the surface of amperometric platinum disc electrode. Influence of working buffer parameters (buffer capacity, ionic strength and pH) and functional characteristics of the biosensor were investigated. Dependence of activity of the immobilized enzyme on solution pH was showed. Furthermore, biosensor storage stability during long period at different conditions was investigated. The storage at -18°C showed better results. It was showed, that application of semipermeable membrane – poly-*m*-phenylenediamine, remarkably decreased of the biosensor response to the interfering substances. The main analytical characteristics of developed biosensor such as sensitivity, linear range, detection limit, noise, drift and reproducibility of responses were investigated. The results show that developed biosensor can be used for choline determination in real biological liquids.

Keywords: choline, choline oxidase, amperometric biosensor, poly-*m*-phenylenediamine

ОПТИМИЗАЦИЯ ХОЛИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ РАБОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Д. Ю. Кучеренко, Д. В. Седюко, Д. В. Книжникова, И. С. Кучеренко, О. О. Солдаткин, А. П. Солдаткин

Аннотация. В работе проведено оптимизацию работы амперометрического биосенсора для определения концентраций холина в биологических жидкостях. Для создания биоселективного элемента использовали холин оксидазу, иммобилизованную на поверхности амперометрического преобразователя. Исследовано влияние параметров рабочего буферного раствора (буферная емкость, ионная сила и pH) на характеристики биосенсора. Показана зависимость активности иммобилизованного фермента от pH раствора и определен pH оптимум работы биосенсора. В работе проверена возможность хранения биосенсора при различных условиях. Благодаря использованию мембраны из поли-*m*-фенилендиамина было значительно уменьшено влияние интерферирующих веществ на работу биосенсора. Исследовано основные аналитические характеристики биосенсора, такие как чувствительность к холину, линейный диапазон работы, минимальная граница определения, шум, дрейф, воспроизводимость откликов биосенсора. Результаты свидетельствуют о том, что разработанный биосенсор можно использовать для определения концентраций холина в биологических образцах.

Ключевые слова: холин, холин оксидаза, амперометрический биосенсор, поли-*m*-фенилендиамин

Вступ

Холін (гідроокис 2-оксиетилтриметиламонію) є поширеною органічною сполукою, що відноситься до вітаміноподібних речовин [1]. Він є важливою речовиною для нервової системи, тому що з нього синтезується нейромедіатор ацетилхолін. Утворення ацетилхоліну в організмі неможливе без холіну, тому при нестачі холіну виникає ряд нервових розладів [2, 3]. На рівні організму холін бере участь у низці важливих біохімічних процесів, зокрема, в біосинтезі фосфоліпідів [3].

Через важливу роль холіну в організмі дефіцит холіну призводить до затримки розвитку і зростання, підвищенню рівня холестерину в крові, розвитку жирової інфільтрації печінки, варикозу, підвищенню артеріального тиску, надлишковій вазі тіла [3-5].

Діапазон нормальних концентрацій холіну в сироватці крові здорових людей (дітей та дорослих) становить 9,5-13,3 μM [6, 7]. При вагітності концентрація холіну зростає і становить 14,5-17,1 μM [7]. Нестача або надлишок холіну є показниками різних фізіологічних станів організму, зокрема, раку молочної залози [3, 8]. Моніторинг рівня холіну і ацетилхоліну в сироватці крові є важливим для виявлення нейродегенеративних захворювань, таких як нервово-м'язові захворювання, хвороба Альцгеймера, міастенія, порушення холінергічної нейротрансмісії [9, 10].

З вказаних причин кількісне визначення холіну в біологічних зразках є важливим для медичних потреб. Для визначення холіну використовують фізико-хімічні, хімічні та мікробіологічні методи. Сучасні фізико-хімічні методи високоточного визначення холіну, такі як іонна і рідинна хроматографія [11, 12], хромато-мас-спектрометрія [13] та ЯМР [14] потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність в досить складній попередній підготовці проб для аналізу [11].

Хімічний метод аналізу холіну оснований на утворенні забарвленої сполуки при взаємодії холіну з сіллю Рейнека. Цей метод використовують для визначення холіну у великих кіль-

костях за відсутності інтерферуючих речовин, тобто він має низьку специфічність та чутливість [15].

Є повідомлення, що для аналізу холіну в біологічних рідинах розроблено і застосовано біологічний метод оснований на оцінці інтенсивності росту міцеліальних грибів *Neurospora crassa* [16].

Сьогодні актуальним є питання створення більш зручного, точного та дешевого методу визначення вмісту холіну в досліджуваних зразках. Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів. Вони мають такі переваги як специфічність (дає можливість аналізувати складні суміші без попереднього очищення), висока чутливість (дає можливість визначити дуже низькі концентрації речовини), висока швидкість аналізу та невеликий розмір обладнання. Тому біосенсиори добре підходять для швидкого та достатньо точного визначення концентрацій холіну.

Для визначення холіну було розроблено ряд ферментних біосенсорів на основі холін оксидази (ХО), зокрема, амперометричні [17, 18] та (електро)хемілюмінесцентні [19, 20]. Також використовують біосенсиори, що містять біферментну систему - холін оксидазу та пероксидазу хрому. Пероксидаза хрому в цьому випадку прискорює розпад перекису водню, утвореного холін оксидазою, що збільшує відгук біосенсора [17]. Втім, розроблені біосенсиори часто є складними у виготовленні або використанні.

Метою даної роботи була адаптація характеристик розробленого нами в попередній роботі [21] амперометричного біосенсора для визначення концентрацій холіну у біологічних рідинах.

2. Матеріали і методи

2.1. Матеріали

В роботі було використано фермент холін оксидазу (ХО) із *Alcaligenes* sp. з активністю 15 од. акт./мг фірми Sigma-Aldrich (Японія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), гліцерол, HEPES, 50 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА), холін хлорид, m-фенілендіамін, аскорбінова кислота, дофамін, сечова кислота та лимонна кислота були отримані від фірми Sigma-Aldrich Chemie

(Німеччина). KH_2PO_4 та інші сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. Виготовлення біоселективних елементів біосенсора

Перед створенням біоселективних елементів біосенсорів на чисті перетворювачі наносили напівпроникну додаткову мембрану на основі *m*-фенілендіаміну за методикою, описаною в попередній роботі [22]. Процедура формування додаткової полімерної мембрани полягала в електрополімеризації молекул фенілендіаміну на поверхні перетворювача. Для цього амперометричний перетворювач поміщали у вимірювальну комірку, що містила 5 мМ водний розчин *m*-фенілендіаміну та проводили електрополімеризацію. Отримували 10-12 циклічних вольтамперограм для досягнення однорідного шару полімеру на поверхні сенсора. По закінченні процедури електрополімеризації електроди промивали дистильованою водою та висушували за кімнатної температури.

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної зшивки ферменту з БСА на поверхні амперометричного перетворювача. Вихідний розчин гелю для приготування ферментної мембрани містив 8 % (тут і далі – масова частка) ХО, 4 % БСА, 10 % гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати фермент впродовж іммобілізації та запобігти передчасному висиханню краплі і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Перед нанесенням ферментного гелю на поверхню перетворювачів його змішували з 1,6 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у співвідношенні 1:1. Одразу після цього отриману суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та тримали протягом 10 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після іммобілізації, біосенсиори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани та надлишку глутарового альдегіду.

2.3. Методика вимірювання

В роботі використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Як амперометричні

перетворювачі використовували платинові дискові електроди власного виробництва [23]. Робочі електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (хлорсрібний) підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-ми канальний пристрій (CH-8 multiplexer) того ж виробника, що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів, проте зазвичай до нього були підключені 3 – 4 робочі електроди. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм.

Перед безпосереднім початком роботи, біосенсор занурювали до вимірювальної комірки, заповненої 25 мМ буферним розчином НЕРЕС (рН 7,4) та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали певну аліквоту концентрованого модельного розчину холіну (50-200 мМ) та отримували біосенсорний сигнал. Цей сигнал автоматично реєструвався комп'ютером і виводився у графічному вигляді на екран монітора.

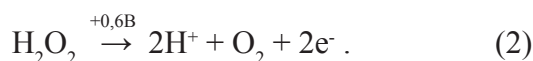
Усі дослідження проводились у трьох повторностях за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 3,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Більш детально використану схему установки для амперометричних вимірювань можна вивчити в попередніх роботах [24,25].

3. Результати та їх обговорення

3.1. Принцип роботи біосенсора

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення холіну лежить ферментативна реакція (1), яка відбувається в біоселективній мембрані. В результаті цієї реакції відбувається окиснення холіну з утворенням електрохімічно-активного перекису водню. При прикладанні позитивного потенціалу (+0,6 В) на електроді відбувається реакція розкладу перекису водню (2), в результаті якої змінюється сила струму, що безпосередньо реєструються вимірювальною установкою.





3.2. Дослідження впливу буферної ємності

Оскільки мета даної роботи – це використання розробленого біосенсора для аналізу холіну в складних біологічних рідинах, тому перш за все необхідно було дослідити як може залежати робота біосенсора від властивостей буферного розчину, в якому проводять вимірювання.

Спочатку було вирішено дослідити вплив концентрації буферного розчину (буферної ємності, відповідно) на величину відгуків біосенсорів. Для перевірки був використаний робочий буферний розчин HEPES в діапазоні концентрації від 1 мМ до 50 мМ. Результати експерименту представлені на Рис. 1. Величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням концентрації буферного розчину, що створює передумови використання розробленого біосенсора для визначення холіну в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

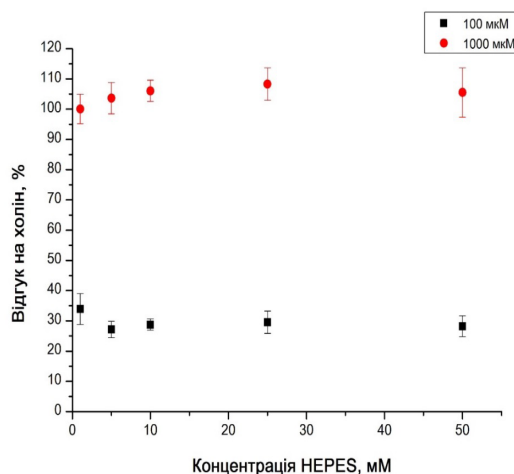


Рис. 1. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації буферного розчину. Концентрації холіну – 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводились в буферному розчині HEPES за різних концентрацій, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.3. Дослідження впливу іонної сили

Реальні біологічні зразки можуть характеризуватися значною іонною силою. Наприклад, присутніми можуть бути іони металів, що є в будь-яких клітинах (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} та ін.), а також іони органічних та неорганічних кислот. Іонна сила розчину змінюється також залежно від концентрації буферного розчину.

Дослідження величин відгуків біосенсорів в умовах різної іонної сили розчину проводили з використанням робочого буферного розчину, що містив NaCl в концентрації від 0 мМ до 50 мМ (Рис. 2). Більші концентрації NaCl не досліджувались, оскільки в будь-якому разі при вимірюванні буде відбуватися розведення зразку в робочій комірці.

Як бачимо, величини відгуків біосенсорів практично не змінювались зі збільшенням іонної сили. Це свідчить про можливість використання даних біосенсорів для аналізу холіну в біологічних розчинах, що характеризуються різною іонною силою.

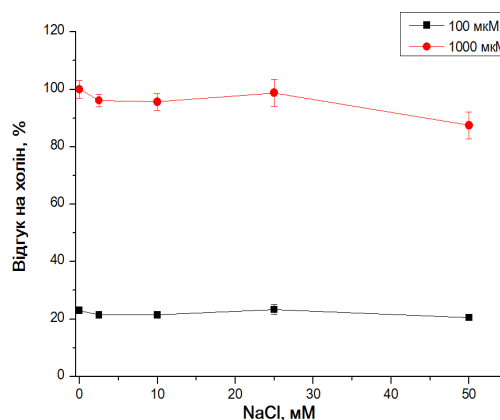


Рис. 2. Залежність величини відгуку біосенсора від іонної сили буферного розчину. Концентрації холіну – 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.4. Дослідження впливу рН

Як відомо, внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН оптимум його роботи. Тому було проведено дослідження впливу рН робочого буферного розчину на роботу біосенсора для визначення холіну. Для проведення

експерименту було використано універсальний буферний розчин (що містив тріс-НCl, KH_2PO_4 , лимонну кислоту та тетраборат натрію в концентраціях 5 мМ), який має однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Дослідження проводились у діапазоні рН від 5,5 до 10,5.

Результати експерименту наведено на Рис. 3. Найвищі відгуки біосенсора спостерігались при значенні рН від 7,5 до 9,5 з максимальним значенням при рН 9,5. За даними виробника, рН-оптимум вільного ферменту складає 8,0 – 8,5. Як відомо, при іммобілізації фермент може змінювати свій рН-оптимум; цим можна пояснити, що максимальна величина відгуків біосенсора спостерігається при рН 9,5. Але оскільки біосенсор призначений в основному для вимірювання холіну в крові, то подальші експерименти проводились при значенні рН 7,4, яке має кров. Хоча відгуки при рН 7,4 були меншими, ніж при оптимальному значенні, проте падіння не було дуже значним, що дозволяло проводити необхідні вимірювання.

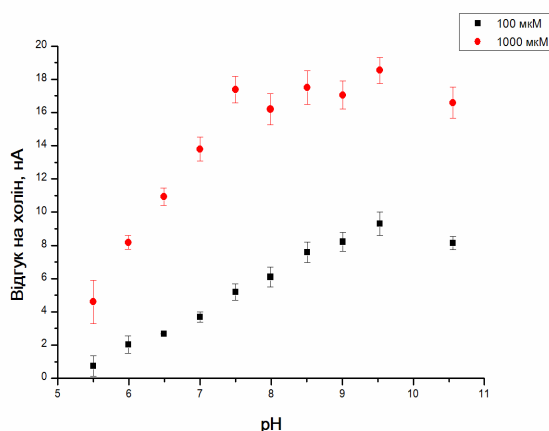


Рис. 3. Залежність величини відгуку біосенсора від рН буферного розчину. Концентрації холіну – 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 5 мМ універсальному буферному розчині при різних значеннях рН за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.5. Операційна стабільність

Важливою характеристикою біосенсора є можливість його стабільної роботи протягом тривалого часу використання. Тому метою наступного етапу роботи була перевірка опера-

ційної стабільності розробленого біосенсора на основі ХО. Для цього впродовж дня отримували 5 відгуків на три різні концентрації холіну (10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ), після чого біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури -18°C до наступного використання. Далі, через кілька діб, експеримент повторювався: знову отримували відгуки біосенсорів на ті ж концентрації холіну. Сумарний термін проведення тесту становив 11 діб. Результати дослідження представлено на Рис. 4. Як видно з рисунку, відгуки біосенсора на усі три концентрації холіну залишались стабільними протягом всього періоду вимірювань.

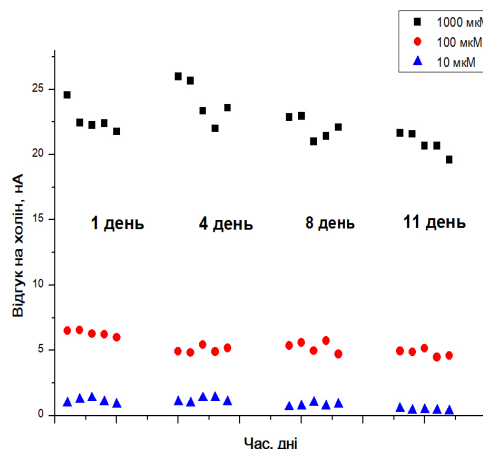


Рис. 4. Операційна стабільність відгуків біосенсора впродовж 11 днів. Концентрації холіну – 10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.6. Зберігання біосенсорів

З метою підбору оптимальних умов зберігання розробленого біосенсора, було перевірено як змінюється чутливість біосенсора до холіну при його зберіганні в різних умовах протягом тривалого часу. Сумарний термін зберігання становив 2 місяці. Результати дослідження зображено на Рис.5. Біосенсори на основі ХО зберігали в наступних умовах: $+25^{\circ}\text{C}$ в буферному розчині та сухому вигляді, $+4^{\circ}\text{C}$ в буферному розчині та сухому вигляді, -18°C в сухому вигляді. При зберіганні за температури $+25^{\circ}\text{C}$ біосенсори дуже швидко втратили свою

чутливість і стали непридатними для роботи. Тому ми вирішили навіть не приводити отримані результати на графіку. При зберіганні за температур $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ біосенсиори були стабільними протягом значно довшого часу. При цьому найкращі результати спостерігалися при зберіганні за температури $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, при якій чутливість біосенсорів залишалася незмінною протягом першого місяця, а потім починала падати, але залишалась досить високою і придатною для роботи ще більше, ніж один місяць за умов додаткового калібрування біосенсора.

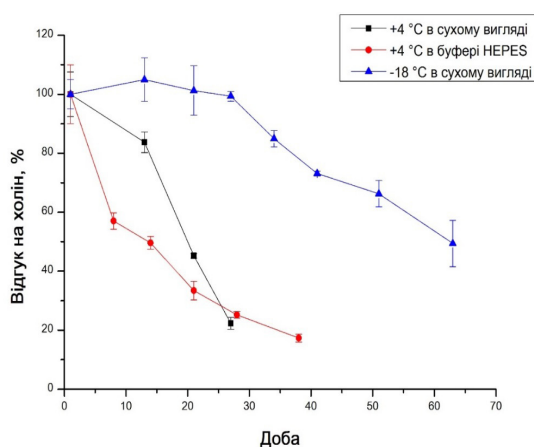


Рис. 5. Перевірка можливості зберігання біосенсорів на основі ХО в наступних умовах: $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухому вигляді, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в буферному розчині HEPES та $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухому вигляді. Концентрація холіну – 1 мМ. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, pH 7,4, за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.7. Селективність біосенсора

В нашій роботі був використаний безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом ($+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння), що створює передумови окиснення ряду електроактивних сполук (які можуть бути присутні в біологічних зразках) на поверхні електроду. Тому селективність амперометричного електрода була покращена шляхом нанесення додаткової напівпроникної полімерної мембрани на основі полі-м-фенілендіаміну (ПФД), яка обмежує дифузію інтерферуючих речовин до поверхні електрода. Методика нанесення ПФД-мембрани описана в «Матеріалах і методах».

Для підтвердження покращення селективності модифікованого перетворювача було перевірено чутливість електродів до можливих інтерферуючих речовин. До нанесення ПФД мембрани перетворювач достатньо сильно реагував на використані електроактивні речовини, що могло призвести до проблем при вимірюванні реальних біологічних зразків. Втім, після нанесення ПФД мембрани відгуки біосенсора на інтерферуючі речовини зникли зовсім або зменшились до незначних розмірів, при цьому чутливість перетворювача до перекису водню майже не змінилась (Рис. 6).

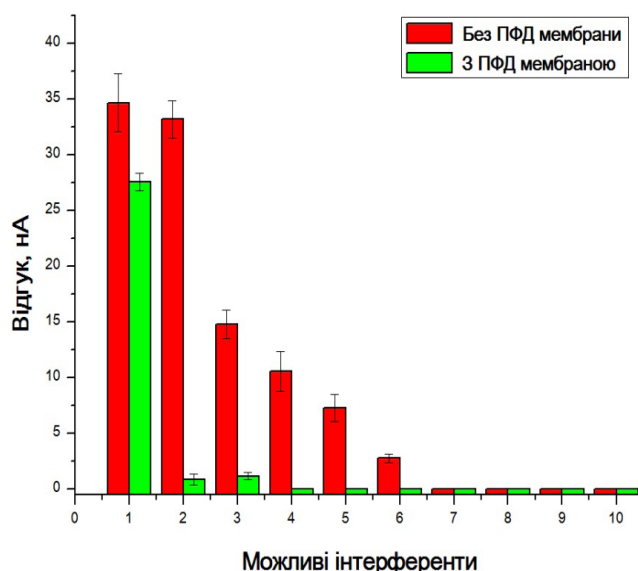


Рис. 6. Відгуки амперометричного перетворювача до та після нанесення ПФД мембрани при додаванні до робочої комірки: 1 – перекису водню (50 мкМ), 2 – аскорбінової кислоти (500 мкМ), 3 – дофаміну (20 мкМ), 4 – сечової кислоти (100 мкМ), 5 – парацетамолу (100 мкМ), 6 – цистеїну (100 мкМ), 7 – лимонної кислоти (500 мкМ), 8 – NaCl (1 мМ), 9 – KCl (1 мМ), 10 – CaCl₂ (1 мМ). Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, pH 7,4, за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.8. Аналітичні характеристики біосенсора

За оптимальних умов було визначено аналітичні характеристики біосенсора. Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення холіну наведена на Рис. 7. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рів-

нянням $I = 41,7 \cdot C + 0,4$ ($R^2 = 0,991$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (нА), C – концентрація холіну (мМ).

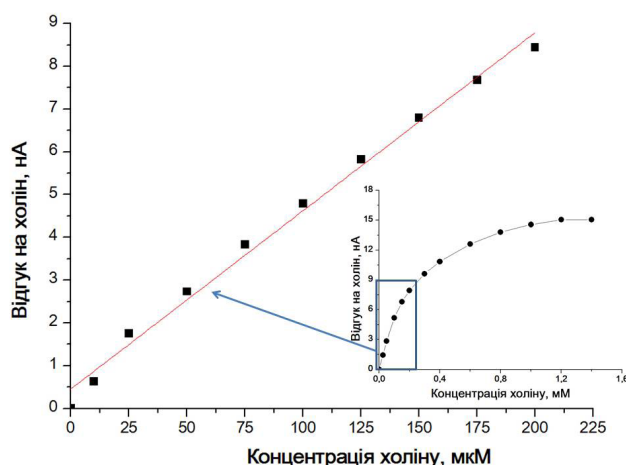


Рис. 7. Калібрувальна крива біосенсора на основі ХО для визначення холіну. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Основні аналітичні характеристики біосенсора наведені наведено у Табл. 1. Біосенсор характеризується гарною чутливістю до суб-

Досліджено вплив параметрів робочого буферного розчину на роботу біосенсора: показано, що іонна сила та буферна ємність не впливають на відгуки біосенсора, а також визначено рН оптимум його роботи. Показано, що біосенсор характеризується гарною операційною стабільністю впродовж 11 днів. Перевірено різні умови зберігання біосенсора і встановлено, що найкращим варіантом є зберігання за температури -18°C в сухому вигляді. Доведено, що завдяки нанесенню додаткової ПФД мембрани на поверхню амперометричного перетворювача перед іммобілізацією ферменту було значно зменшено вплив основних інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

Виходячи з отриманих після оптимізації аналітичних характеристик біосенсора встановлено, що запропонований біосенсор на основі ХО в подальшому можна використати для вимірювання концентрацій холіну в реальних біологічних зразках та як складову частину масиву біосенсорів для одночасного вимірювання декількох речовин.

Подяка

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для

Таблиця 1

Основні аналітичні характеристики біосенсора для визначення холіну.

Чутливість, нА/мМ	Лінійний діапазон роботи, мМ	Мінімальна межа вимірювання, мМ	Шум базової лінії, нА	Похибка відтворюваності відгуків, %	Дрейф базової лінії, нА/с
39-43	1-200	1-3	0,01-0,02	5-7	0-0,07

страту та відтворюваністю відгуків, а також має досить малий шум сигналу та мінімальну межу вимірювання, що створює передумови його використання для визначення холіну в реальних біологічних зразках.

4. Висновки

В роботі проведено оптимізацію амперометричного біосенсора для подальшого визначення концентрації холіну в біологічних рідинах.

медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

Список використаної літератури

- [1]. Y.-H. Bai, Y. Du, J.-J. Xu, H.-Y. Chen. Choline biosensors based on a bi-electrocatalytic property of Mn_2O_3 nanoparticles modified electrodes to H_2O_2 // *Electrochemistry Communications*, 9(10), pp. 2611-2616 (2007).
- [2]. J. A. Dani, D. Ji, F.-M. Zhou. Synaptic

plasticity and nicotine addiction // *Neuron*, 31(3), pp. 349-352 (2001).

[3]. R. Wurtman, M. Cansev, I. Ulus. Choline and its products acetylcholine and phosphatidylcholine. In *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, Ed. A. Lajtha, pp. 443-501, Springer (2009).

[4]. S. Zeisel. Vitamin-like molecules. In *Modern Nutrition and Health and Disease*, Eds. A.C. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, K.L. Tucker, T.R. Ziegler, pp. 440-452, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (1998).

[5]. S.H. Zeisel, K. Da Costa, P.D. Franklin, E.A. Alexander, J.T. Lamont, N. Sheard, A. Beiser. Choline, an essential nutrient for humans // *The FASEB journal*, 5(7), pp. 2093-2098 (1991).

[6]. Y.O. Ilcol, R. Ozbek, E. Hamurtekin, I.H. Ulus. Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk // *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(8), pp. 489-499 (2005).

[7]. Y.O. Ilcol, G. Uncu, I. Ulus. Free and phospholipid-bound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns // *Archives of physiology and biochemistry*, 110(5), pp. 393-399 (2002).

[8]. X. Xu, M.D. Gammon, S.H. Zeisel, Y.L. Lee, J.G. Wetmur, S.L. Teitelbaum, P.T. Bradshaw, A.I. Neugut, R.M. Santella, J. Chen. Choline metabolism and risk of breast cancer in a population-based study // *The FASEB Journal*, 22(6), pp. 2045-2052 (2008).

[9]. D.D. Wise, T.V. Barkhimer, P.A. Brault, J.R. Kirchhoff, W.S. Messer, R.A. Hudson. Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection // *Journal of Chromatography B*, 775(1), pp. 49-56 (2002).

[10]. S. Upadhyay, G. Rao, M.K. Sharma, B.K. Bhattacharya, V.K. Rao, R. Vijayaraghavan. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents // *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), pp. 832-838 (2009).

[11]. M. Sánchez-Paniagua López, J. Hervás Pérez, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz. Amperometric biosensors based on choline oxidase entrapped in polyacrylamide microgels // *Electroanalysis*, 19(2-3), pp. 370-378 (2007).

[12]. K. Oates, L. Chen, B. De Borja, J. Rohrer. *Determination of Choline in Infant Formula and Other Food Samples by Ion Chromatography*. Thermo Fisher Scientific, 450 p. (2012).

[13]. S.H. Zeisel. Choline: determination using gas chromatography/mass spectrometry // *The Journal of nutritional biochemistry*, 1(1), pp. 55-59 (1990).

[14]. P. J. Bolan, S. Meisamy, E. H. Baker, J. Lin, T. Emory, M. Nelson, L.I. Everson, D. Yee, M. Garwood. In vivo quantification of choline compounds in the breast with ¹H MR spectroscopy // *Magnetic resonance in medicine*, 50(6), pp. 1134-1143 (2003).

[15]. M. M. Phillips. Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements // *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(8), pp. 2103-2112 (2012).

[16]. O. Wiss. Microbiological estimation of vitamins and amino-acids. Recommendations of the Eidg. Lebensmittelbuch-Kommission // *Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und-Hygiene.*, 41, pp. 225-258 (1950).

[17]. M. Yang, Y. Yang, G. Shen, R. Yu. Bionzymatic amperometric biosensor for choline based on mediator thionine in situ electropolymerized within a carbon paste electrode // *Analytical biochemistry*, 334(1), pp. 127-134 (2004).

[18]. Z. Song, J.-D. Huang, B.-Y. Wu, H.-B. Shi, J.-I. Anzai, Q. Chen. Amperometric aqueous sol-gel biosensor for low-potential stable choline detection at multi-wall carbon nanotube modified platinum electrode // *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 115(2), pp. 626-633 (2006).

[19]. H. Dai, Y. Chi, X. Wu, Y. Wang, M. Wei, G. Chen. Biocompatible electrochemiluminescent biosensor for choline based on enzyme/titanate nanotubes/chitosan composite modified electrode // *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), pp. 1414-1419 (2010).

[20]. A. M. Garcia-Campana. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. CRC Press, New York, 622p. (2001).

[21]. D. Yu. Kucherenko, D. V. Siediuco, D. V. Knyzhnykova, O. O. Soldatkin, A. P. Soldatkin. Development of amperometric biosensor for choline determination // *Biopolymers and Cell*, 32(3), pp. 229-234 (2016).

[22]. I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, D.Yu. Diduch, A.P. Soldatkin. Characteristics and optimal working conditions of amperometric biosen-

sor for adenosine triphosphate // *Biotechnologia acta*, 7(1), pp. 66-74 (2014).

[23]. A.Nazarova, N. Krisanova, A. Borysov., I. Kucherenko, O. Soldatkin., N. Pozdnyakova, A. Soldatkin, T. Borisova. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor // *Talanta*, 135, pp. 67-74 (2015).

[24]. I.S. Kucherenko, D.Yu. Didukh, O.O. Soldatkin, A.P. Soldatkin. Amperometric biosensor system

for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose // *Analytical Chemistry*, 86, pp. 5455 – 5462 (2014).

[25]. V.M. Pyeshkova, I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, S.V. Dzyadevych. Method of testing and optimization of amperometric transducers // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 10(3), pp.88-98 (2013).

Стаття надійшла до редакції 20.09.2016 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI 10.18524/1815-7459.2016.4.86648

OPTIMIZATION OF THE CHOLINE-SENSITIVE BIOSENSOR FOR WORK IN BIOLOGICAL LIQUIDS

D. Yu. Kucherenko^{1,2}, D. V. Siediuko², D. V. Knyzhnykova², I. S. Kucherenko^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,2}, A. P. Soldatkin^{1,2}

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

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

Summary

Choline is a widespread organic compound. It is an important substance for the nervous system as a precursor of the neurotransmitter acetylcholine. Choline deficiency causes various nervous and metabolic pathologies. For these reasons, quantitative determination of choline in biological samples becomes relevant in clinical analysis for the identification of various pathologies.

The aim optimization of amperometric biosensor work based on choline oxidase detection of choline concentration in biological liquids.

Methods: In this work, amperometric method of analysis is used. The disc platinum electrodes were used as amperometric transducers, which were connected to the PalmSens potentiostat. Choline oxidase was immobilized onto amperometric transducer surface by covalent binding of the enzyme with BSA and glutaraldehyde.

Results: optimization of the biosensor work for detection of choline concentration in biological liquids was done. Influence of working buffer parameters (buffer capacity, ionic strength and pH) and characteristics of biosensor were investigated. Storage stability at different conditions was studied. Application of additional membrane based on polyphenylenediamine remarkably decreased the biosensor response to interfering substances. The main analytical characteristics of the biosensor were investigated.

Conclusions: Developed biosensor has high specificity and stability to choline, has high signal reproducibility and operational stability. The developed biosensor can be used for choline determination in real biological samples or as a structural component of a biosensor array for simultaneous determination of different substances.

Keywords: choline, choline oxidase, amperometric biosensor, poly-m-phenylenediamine

ОПТИМІЗАЦІЯ ХОЛІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ РОБОТИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

Д. Ю. Кучеренко^{1,2}, Д. В. Сєдюко², Д. В. Книжникова²
І. С. Кучеренко^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}, О. П. Солдаткін^{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

Реферат

Холін є поширеною органічною сполукою, що відноситься до вітаміноподібних речовин. Він є важливою речовиною для нервової системи, тому що з нього синтезується нейромедіатор ацетилхолін. При нестачі холіну виникає ряд нервових та метаболічних розладів. Тому кількісне визначення холіну в біологічних зразках є важливим для медичних потреб. На сьогоднішній день існує багато методик визначення концентрації холіну, однак найбільш перспективним є використання біосенсорів, які є дуже точними, швидкими, характеризуються високою селективністю, не потребують попередньої підготовки проби, а також відображають результат вимірювання в режимі реального часу.

Метою даної роботи була оптимізація роботи амперометричного біосенсора на основі холін оксидази для визначення концентрацій холіну в біологічних рідинах.

Методи дослідження: В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Як амперометричні перетворювачі в роботі використовували платинові дискові електроди, які за триелектродною схемою вимірювання під'єднувались до потенціостату PalmSens (Нідерланди). Імобілізація холін оксидази на поверхню перетворювача здійснювалась за допомогою ковалентного зшивання ферменту з БСА глутаровим альдегідом.

Результати дослідження: Проведено оптимізацію роботи амперометричного біосенсора для визначення холіну в біологічних рідинах. Досліджено вплив параметрів робочого буферного розчину (буферна ємність, іонна сила, рН) на характеристики біосенсора. Перевірено можливість зберігання біосенсора за різних умов. Завдяки використанню додаткової мембрани з полі-*m*-фенілендіаміну значно зменшено вплив інтерферуючих речовин на роботу біосенсора. Досліджено основні аналітичні характеристики біосенсора.

Висновки: Запропонований в роботі біосенсор має високу чутливість та селективність до холіну, характеризується гарною відтворюваністю та операційною стабільністю. Запропонований біосенсор на основі ХО в подальшому можна використати для вимірювання концентрацій холіну в реальних біологічних зразках та як складову частину масиву біосенсорів для одночасного вимірювання декількох речовин.

Ключові слова: холін, холін оксидаза, амперометричний біосенсор, полі-*m*-фенілендіамін