

УДК 543.257.5

## БИОАФФИННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ДНК-СЕНСОРА

*С.С. Бабкина, Н.А. Улахович, Г.К. Будников*

### Аннотация

Изучено взаимодействие алкалоидов на примере аймалина с ДНК, иммобилизованной в составе амперометрического биосенсора. Комплексообразование алкалоида с нативной иммобилизованной формой ДНК позволяет проводить его эффективное концентрирование из определяемых растворов. Найдены оптимальные условия концентрирования и условия реактивации биосенсора для его многократного использования. Предложена методика определения индольного алкалоида аймалина, применяемого в качестве кардиопрепарата и обладающего цитостатическим действием, с использованием разработанного ДНК-сенсора. Методика отличается чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и экспрессностью.

**Ключевые слова:** амперометрический биосенсор, нативная ДНК, алкалоид, аймалин.

### Введение

Электрохимические биосенсоры на основе ДНК получили широкое распространение в химическом анализе [1–5]. Их применение оказалось очень перспективным при анализе как высокомолекулярных биологически активных веществ [1, 6–8], так и низкомолекулярных [9–12]. Особое значение приобрели ДНК-сенсоры в анализе лекарственных средств [13–15]. Многие алкалоиды, используемые как лекарственные средства, могут быть определены с помощью таких биосенсоров.

Цель настоящего исследования – разработка биоаффинного метода определения индольного алкалоида аймалина на основе предложенного амперометрического биосенсора, содержащего нативную ДНК.

### 1. Экспериментальная часть

**1.1. Материалы и методы.** Вольтамперометрические определения проводились с помощью вольтамперометрической системы SVA-1BM-01 «Аналитик» (Болгария). Рабочим электродом служил стационарный стеклоуглеродный электрод (СЭ) либо разработанный ДНК-сенсор, в котором мембрана с иммобилизованной нативной ДНК (н-ИДНК) закрепляется на поверхности СЭ [16]. Электрод сравнения – насыщенный каломельный электрод (н.к.э.). Растворенный кислород удаляли из исследуемых растворов током аргона в течение 15 мин, во время регистрации вольтамперограмм газ пропускали над раствором.

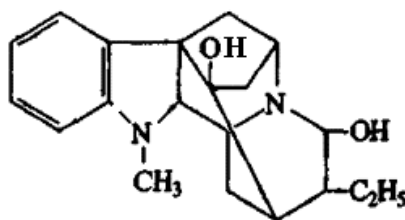
Использовали ДНК эритроцитов цыплят фирмы “Reanal”: соотношение N/P 1.6–1.7. Растворы ДНК с концентрацией 0.01 мг/мл в физиологическом растворе (0.9%-ный раствор NaCl) готовили по точной навеске. Концентрацию растворов ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при  $\lambda = 258$  нм.

Использовали следующие химические реагенты и растворы: перекристаллизованный аймалин, растворенный в диоксане, нитрат целлюлозы (НЦ) ФТ-30 типа коллоксилин марки ч. со средним содержанием азота 11.5–12%; органические растворители высокой чистоты марки х.ч. (ацетон, толуол, гексан, диоксан) и 25%-ный раствор глутарового альдегида фирмы “Reanal”, раствор перхлората лития. Исследуемые растворы готовили по точной навеске и методом последовательных разбавлений.

**1.2. Приготовление биочувствительной части амперометрического ДНК-сенсора.** Образцы н-ИДНК получали путем растворения навески НЦ в системе органических растворителей при постоянном перемешивании на магнитной мешалке с последующим добавлением водного раствора нативной ДНК (н-ДНК) и раствора глутарового альдегида для химического связывания молекул н-ДНК с НЦ-матрицей. После этого на поверхности чашки Петри формировали пленку и высушивали ее в течение 5 мин. Полученные образцы н-ИДНК хранили в холодильнике при  $t = 2-5$  °С. Биочувствительную часть сенсора, полученную по данной методике, закрепляли на корпусе электрохимического детектора (СЭ) с помощью прижимных колец [16].

## 2. Результаты и обсуждение

Широкое внедрение в кардиологическую практику индольного алкалоида аймалина в качестве антиаритмического кардиопрепарата обуславливает необходимость его чувствительного, точного и селективного определения как в чистом виде, так и на стадии выделения из растительного сырья, и при лекарственном мониторинге [17]. Однако его анализ хроматографическими и спектрофотометрическими методами трудоемок, неэкспрессен, малочувствителен, часто требует дополнительной экстракции [18–20].



Известно, что аймалин также обладает цитостатическим эффектом, то есть ингибирует репликацию и транскрипцию ДНК. В его присутствии температура плавления (начала обратимой денатурации) н-ДНК увеличивается на 2.3 °С, что свидетельствует об упрочнении связей между двумя цепями спирали ДНК [20]. Поэтому представляет интерес разработать биосенсор, содержащий нативную ДНК, и биоаффинный метод анализа аймалина на его основе.

На вольтамперограмме раствора аймалина в 0.1 М LiClO<sub>4</sub> на СЭ наблюдается пик его окисления при +0.6 В отн. н.к.э. Процессу окисления аймалина способствует подающая электронную плотность гидроксильная группа, соседняя с окисляющимся атомом азота [21]. Полученное значение коэффициента скорости электродного процесса окисления аймалина 0.55 указывает на преимущественно диффузионный характер электродного процесса. Высота этого пика линейно зависит от концентрации аймалина, но в узком интервале концентраций ( $1.0 \cdot 10^{-4}$  –  $3.0 \cdot 10^{-7}$ ).

Для расширения области определяемых концентраций и увеличения чувствительности анализа проведено изучение электрохимического поведения аймалина в присутствии разработанного амперометрического н-ДНК-содержащего биосенсора на основе СЭ, получение которого описано в п. 1.2. При введении в раствор аймалина данного ДНК-сенсора наблюдается уменьшение высоты анодного пика при +0.6 В за счет комплексообразования аймалина с н-ДНК, иммобилизованной в составе биосенсора. Комплексообразование происходит за счет встраивания кольцевой системы алкалоида в двойную спираль ДНК между плоскостями пар комплементарных оснований гуанин (G) – цитозин (C) и ее интеркалирования (колебания) между ними. Отсутствие в составе молекулы аймалина углеводной части, в отличие от других интеркаляторов ДНК (например, дауномицина), приводит к тому, что его молекула не занимает малую бороздку молекулы ДНК, и облегчается доступ алкалоида к азотистым основаниям, следовательно, легче образуется его комплекс с ДНК.

Образование такого комплекса за счет нековалентных связей на поверхности ДНК-сенсора свидетельствует о том, что выбранный способ иммобилизации н-ДНК в составе НЦ-матрицы максимально сохраняет структуру молекул ДНК и их биологическую активность. Отсутствие спада пика на вольтамперограммах раствора аймалина, полученных на СЭ с закрепленной на нем НЦ-матрицей, не содержащей н-ДНК (контрольный опыт), свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции аймалина на матрице-носителе и еще раз подтверждает специфичность комплексообразования с н-ДНК.

Таким образом, становится возможным проведение эффективного биоаффинного концентрирования аймалина из анализируемого раствора с малой концентрацией на мембране с н-ИДНК в составе биосенсора. Для реактивации биочувствительной части сенсор после концентрирования помещали в 0.6 М раствор LiClO<sub>4</sub> и вновь снимали вольтамперограмму на ДНК-сенсоре в области от +0.2 до +0.9 В. Линейное увеличение высоты пика окисления аймалина при увеличении его концентрации позволяет проводить определение данного алкалоида.

Для выбора оптимального времени проведения анализа изучали зависимость высоты тока окисления аймалина после его концентрирования на ДНК-сенсоре от времени реактивации для разных концентраций алкалоида. На основании полученных данных было выбрано оптимальное время реактивации (10 мин) (рис. 1).

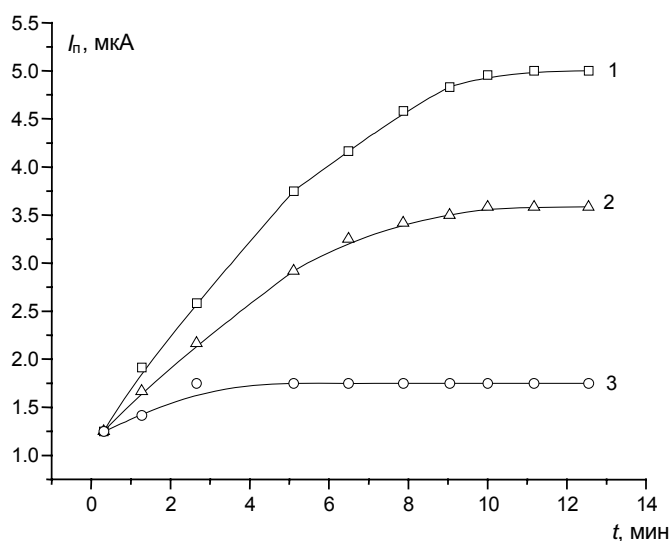


Рис. 1. Зависимость величины тока пика при +0.6 В от времени реактивации ДНК-сенсора при различных концентрациях аймалина (моль/л): 1 –  $1.0 \cdot 10^{-5}$ , 2 –  $5.5 \cdot 10^{-6}$ , 3 –  $1.0 \cdot 10^{-7}$ ; 0.6 М раствор  $\text{LiClO}_4$

#### Методика определения аймалина в модельных растворах.

Проведено определение аймалина в модельных растворах по градуировочному графику, построенному при выбранных оптимальных условиях. Для этого амперометрический биосенсор, содержащий н-ИДНК погружали в электрохимическую ячейку с 5 мл раствора аймалина различной концентрации на 15 мин. Затем раствор аймалина сливали, ячейку промывали фоновым раствором и заливали в нее 5 мл 0.6 М раствора  $\text{LiClO}_4$ , деаэрировали током аргона в течение 10 мин и снимали вольтамперограммы в интервале от +0.2 до +0.9 В ( $v = 0.5$  В/с). Измеряли высоту анодного пика при +0.6 В. По полученным данным строили градуировочный график зависимости тока окисления аймалина от его концентрации.

Уравнение градуировочного графика зависимости  $I_n$  (мкА) от  $c$  (моль/л) имеет следующий вид:  $I_n = (3.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \cdot c + (1.67 \pm 0.01)$ ,  $r = 0.9997$ . Линейная область определяемых концентраций аймалина составляет  $1.0 \cdot 10^{-5} - 3.0 \cdot 10^{-10}$  моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний составляет  $3.0 \cdot 10^{-10}$  моль/л ( $S_r$  0.33). Результаты определения аймалина в модельном растворе представлены в табл. 1. Ошибка определения концентраций на уровне  $10^{-9}$  моль/л не превышает 20%, а концентраций на уровне  $5.0 \cdot 10^{-8}$  моль/л – 6%. В случае определения низких концентраций аймалина объем раствора при накоплении можно увеличить.

Таким образом, разработан биоаффинный метод определения низкомолекулярного эффектора ДНК – аймалина – с помощью амперометрического н-ДНК-содержащего биосенсора, найдены оптимальные условия его проведения. Время анализа – 25–30 мин. Следует отметить, что селективное определение аймалина данным методом возможно в присутствии других алкалоидов, потенциал

Табл. 1

Результаты определения аймалина с помощью БС ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $t_{\text{ТАБЛ}} = 2.78$ )

Введено, $\times 10^8$ , моль/л	Найдено ( $c \pm \delta$ ) $\cdot 10^8$ , моль/л	$S_r$	$t_{\text{РАСЧ}}$
0.10	$0.08 \pm 0.02$	0.18	2.7
0.25	$0.30 \pm 0.08$	0.21	0.2
1.50	$1.6 \pm 0.3$	0.15	0.9
5.50	$5.2 \pm 0.4$	0.06	2.1
8.00	$7.6 \pm 0.5$	0.05	2.2

окисления которых отличается не менее чем на 250 мВ от потенциала окисления аймалина. В противном случае требуется дополнительная пробоподготовка. Данный ДНК-сенсор может быть использован и для определения других алкалоидов и цитостатиков, способных встраиваться и интеркалировать между цепями ДНК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-03-00749 а).

### Summary

*S.S. Babkina, N.A. Ulakhovich, H.C. Budnikov.* Bioaffinity Method for the Determination of Alkaloids with Amperometric DNA-Sensor.

The interaction of alkaloids with DNA immobilized into amperometric biosensor has been studied taking ajmaline as an example. The alkaloid can be effectively concentrated from analytes due to its complex-forming with native immobilized DNA. The optimal conditions for concentrating and reactivation of the sensor have been found out. The method based on the developed DNA-sensor has been proposed for the determination of indole alkaloid ajmaline used as a cardiological medicine and having cytostatic action. The method is characterized by sensitivity, good reproducibility and speed.

**Key words:** amperometric biosensor, native DNA, alkaloid, ajmaline.

### Литература

1. *Бабкина С.С., Будников Г.К.* Электрохимические биосенсоры на основе нуклеиновых кислот и их использование в биоаффинных методах определения ДНК и ее эффекторов // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т. 61, № 8. – С. 790–802.
2. *Fojta M.* Mercury electrodes in nucleic acid electrochemistry: Sensitive analytical tools and probes of DNA structure. A review // Collect. Czech. Chem. Commun. – 2004. – V. 69. – P. 715–747.
3. *Fojta M.* Electrode potential modulated cleavage of surface confined DNA by hydroxyl radicals detected by an electrochemical biosensor // Biosens. Bioelectron. – 2000. – V. 15. – P. 107–115
4. *Евдокимов Ю.М.* Биодатчики на основе нуклеиновых кислот // ВИНТИИ Итоги науки и техники. Биотехнология. – 1990. – Т. 26. – С. 134–161.
5. *Mascini M.* DNA electrochemical biosensor // Fresenius J. Anal. Chem. – 2001. – V. 369. – P. 15–22.

6. Kouřilová A., Babkina S., Cahová K., Havran L., Jelen F., Paleček E., Fojta M. DNA Hybridization on Membrane-Modified Carbon Electrodes // *Anal. Lett.* – 2005 – V. 38. – P. 1–15.
7. Paleček E., Kizek R., Havran L., Billova S., Fojta M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 469. – P. 73.
8. Evtugyn G., Mingaleva A., Budnikov H., Stoikova E., Vinter V., Eremin S. Affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes modified with DNA // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – V. 479. – P. 125.
9. Babkina S.S., Ulakhovich N.A. The study of complexing of heavy metals with DNA and new bioaffinity method of their determination based on amperometric DNA-based biosensor // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77, No 17. – P. 5678–5685.
10. Korbout O., Buckova M., Tarapcek P., Labuda J., Grundler P. Damage to DNA indicated by an electrically heated DNA-modified carbon paste electrode // *J. Electroanal. Chem.* – 2001. – V. 506. – P. 143–148.
11. Paleček E., Fojta M., Jelen F., Vetterl V. Electrochemical analysis of nucleic acids // *The Encyclopedia of Electrochemistry / Eds. A.J. Bard, M. Stratman.* – Wiley-VCH: Verlag GmbH, 2002. – V. 9 (Bioelectrochemistry). – P. 365–429.
12. Guo M., Chen J., Liu D., Nie L., Yao S. Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes // *Bioelectrochem.* – 2004. – V. 62. – P. 29.
13. Бабкина С.С., Мусеева Е.Н., Улахович Н.А. Определение противоопухолевого антибиотика доксорубицина с помощью амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной ДНК // *Фармация.* – 2006. – № 5. – С. 9–11.
14. Piedade J.A.P., Fernandes I.R., Oliveira-Brett A.M. Electrochemical sensing of DNA-adriamycin interactions // *Bioelectrochem.* – 2002. – V. 56, No 1. – P. 81–83.
15. Jelen F., Erdem A., Paleček E. Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode // *Bioelectrochem.* – 2002. – V. 55, No 1. – P. 165–167.
16. Budnikov H.C., Medyantseva E.P., Babkina S.S. An enzyme amperometric sensor for toxicant determination // *J. Electroanal. Chem.* – 1991. – V. 310. – P. 49–55.
17. Машковский В.Б. Лекарственные средства. – М.: Медицина, 1993. – С. 221–230.
18. Court W.E., Iwu M.M. Chromogenic reactions of *Rauwolfia* alkaloids after separation by thin-layer chromatography // *J. Chromatogr.* – 1980. – V. 187, No 1. – P. 199–207.
19. Duez P., Chamart S., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R., Hanocq M., Molle L. Comparison between high-performance thin-layer chromatography-densitometry and high-performance liquid chromatography for the determination of ajmaline, reserpine and rescinnamine in *Rauwolfia vomitoria* root bark // *J. Chromatogr.* – 1986. – V. 356. – P. 334–340.
20. Singh D.K., Srivastana B., Sahu A. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloids: Estimation of reserpine in pharmaceuticals // *Anal. Sci.* – 2004. – V. 20. – P. 571–573.
21. Органическая электрохимия: в 2 кн. / Под ред. М. Бейзера, Х. Лунда; пер. с англ. – М.: Химия, 1988. – Кн. 1. – 469 с.

Поступила в редакцию  
14.04.08

**Бабкина Софья Сауловна** – доктор химических наук, профессор кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *sofia-babkina@mail.ru*

**Улахович Николай Алексеевич** – доктор химических наук, заведующий кафедрой неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Nikolay.Ulakhovich@ksu.ru*

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*