

УДК 543.866

УСЛОВИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ

*Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, Д.А. Гималетдинова,
А.Н. Фаттахова, Г.К. Будников*

Аннотация

Найдены приемы и рассмотрены подходы к разработке амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной моноаминоксидазы (МАО) и электродов из стеклоуглерода и платины. Выбраны наилучшие условия его функционирования: фоновый электролит-ацетатный буфер рН 5.5, концентрация субстрата – $1 \cdot 10^{-3}$. Аналитические возможности биосенсора показаны на примере определения антидепрессантов петилина и пиразидола с нижней границей определяемых содержаний (C_n) $8 \cdot 10^{-8}$ моль/л и $8 \cdot 10^{-7}$ моль/л соответственно.

Введение

Для решения фундаментальных проблем биологической и медицинской химии, непосредственно связанных с актуальными задачами современной теоретической и клинической медицины, первостепенное значение имеет изучение природы ключевых ферментов, нарушение функций которых представляет собой ведущее звено в механизме расстройств процессов обмена веществ при патологических состояниях. К числу таких веществ принадлежат аминоксидазы – окислительные ферменты, которые катализируют дезаминирование важнейших нейромедиаторов и биогенных аминов, участвующих также в регуляции функции сердечно-сосудистой системы, роста и деления клетки [1].

Среди большого числа биологически активных веществ биогенные амины занимают особое место. Это группа азотсодержащих органических соединений, образующихся в организме человека путем декарбоксилирования аминокислот. Многие из биогенных аминов – гистамин, серотонин, норадреналин, адреналин, тирамин – оказывают воздействие на процессы торможения и возбуждения в коре головного мозга и подкорковых центров, вызывают сдвиг кровяного давления расширением или сужением сосудов и другие изменения в организме. Биогенные амины, образующиеся в толстом кишечнике человека и животных под действием гнилостных бактерий, токсичны для организма. Некоторые биогенные амины входят в состав лекарственных препаратов, биологических жидкостей; нарушение обмена аминов в организме приводит к различным заболеваниям соматического и психического характера, что вызывает необходимость контроля их метаболизма в организме, а также необходимость разработки селективных и чувствительных методов определения аминосоединений для про-

ведения клинических анализов. Поэтому изучение действия ингибиторов и активаторов аминоксидаз, представляется перспективным направлением исследований в области биологической и медицинской химии.

Наиболее часто для определения биогенных аминов используют различные варианты хроматографии, а также методы анализа, основанные на вольтамперометрических измерениях. В то же время примеры биосенсоров на основе иммобилизованной моноаминоксидазы (МАО) немногочисленны и относятся, в основном, к биосенсорам с потенциометрической регистрацией аналитического сигнала [2–4]. Поэтому разработка новых аналитических устройств, сочетающих избирательность действия моноаминоксидазы с чувствительными амперометрическими способами детекции, представляется актуальной задачей.

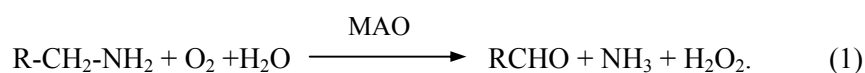
Анализ литературных данных показывает, что методы количественного определения биогенных аминов постоянно находятся в поле зрения исследователей. Однако все существующие методы их определения имеют определенные недостатки: сложная пробоподготовка образца, трудоемкость выполнения анализов, высокие требования к квалификации персонала и относительно высокая стоимость применяемого (хроматографического) оборудования.

Вольтамперометрическое определение биогенных аминов не отличается в большинстве случаев высокой избирательностью, особенно в случае сложных органических матриц. Несколько лучшие результаты по избирательности и чувствительности определений позволяют получить модифицированные электроды с заданными свойствами [5, 6]. Однако получение модифицированных поверхностей требует определенного навыка работы, т. к. от качества поверхности зависит воспроизводимость результатов и форма наблюдаемых вольтамперограмм. Кроме того, наилучшие результаты наблюдаются, зачастую, для узкого круга соединений.

Таким образом, разработка новых аналитических устройств, позволяющих с высокой чувствительностью и избирательностью определять биогенные амины, лекарственные соединения, оценивать уровень каталитической активности жизненно важного фермента, обладающих определенной универсальностью действия, представляет интерес для биомедицинских исследований, пищевой и фармацевтической промышленности. Можно ожидать, что разработка и применение амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованной МАО, особенно в сочетании с приемами иммуноэкстракции, будут относиться именно к тем разработкам, которые удовлетворяют современным требованиям, предъявляемым к методам контроля качества жизни.

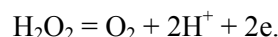
Результаты и обсуждение

Продуктами ферментативной реакции окислительного дезаминирования моноаминов являются альдегид и пероксид водорода, которые, согласно литературным данным [7], при определенных условиях проявляют электрохимическую активность, что может быть использовано в аналитических целях для разработки устройств, позволяющих регистрировать физиологически активные концентрации биогенных аминов:



Экспериментально показано, что альдегиды (на примере бензальдегида) на электродах из стеклоглерида (платины) электрохимически не окисляются в доступной области потенциалов. Поэтому на данном этапе исследования, регистрацию аналитического сигнала осуществляли по величине электрохимического сигнала окисления пероксида водорода.

Окисление пероксида водорода на стеклоглериодном и платиновом электродах протекает по следующему уравнению:



Предварительные исследования электрохимического окисления пероксида водорода в области pH от 4 до 5.5 (на фоне ацетатных буферных растворов) на стеклоглериодном и платиновом электродах показали, что максимум аналитического сигнала проявляется при $E = 0.8 \div 0.9$ В.

Именно ток при потенциале 0.8 В был использован в дальнейшем для контроля за свойствами иммобилизованной MAO (рис. 1, 2). Линейная зависимость между величиной тока и концентрацией пероксида водорода сохраняется в интервале концентраций $5 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

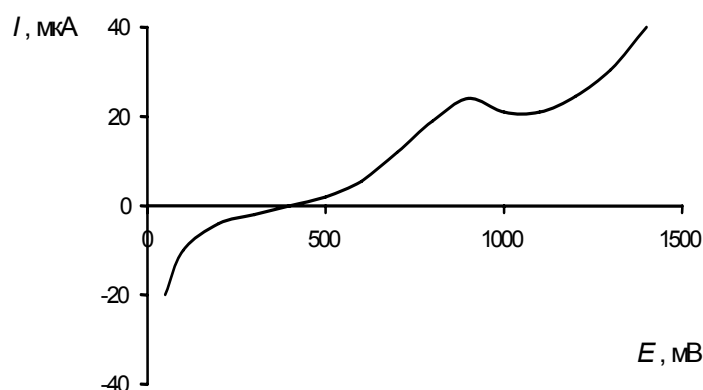


Рис. 1. Электрохимическое поведение пероксида водорода на стеклоглериодном электроде. Концентрация пероксида водорода — $5 \cdot 10^{-3}$ М. Ацетатный буферный раствор с pH 5.5. Скорость изменения потенциала 1 В/с

Таким образом, проведенные исследования показали, что и стеклоглериодный и платиновый электроды могут быть использованы в качестве первичного физического преобразователя при разработке соответствующего биохимического сенсора. Разработка такого вида биохимических сенсоров связана с необходимостью использования образцов иммобилизованной MAO (ИMAO).

Для получения образцов ИMAO применяли частично очищенную микросомальную фракцию моноаминоксидазы фронтальной коры головного мозга человека с активностью $43 \cdot 10^{-3}$ мкмоль серотонина / мин. · мг белка.

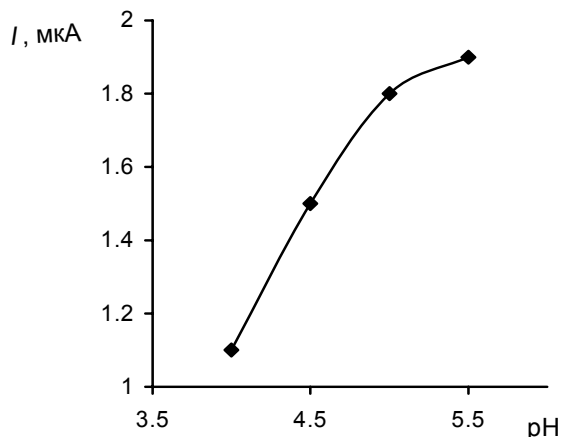


Рис. 2. Зависимость тока окисления пероксида водорода от pH

Для иммобилизации моноаминоксидазы в качестве матрицы использовали пищевой желатин марки П-11, из которого получали пленки с включенным в их состав ферментом.

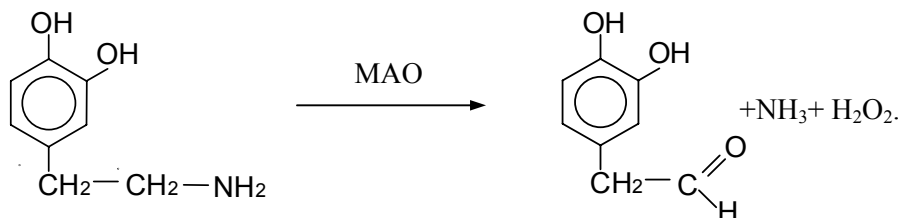
Исходя из биокаталитической реакции с участием MAO и литературных данных можно утверждать, что в качестве специфичных субстратов MAO могут выступать несколько соединений. Некоторые из них и были экспериментально опробованы в различных условиях.

В частности, к числу таких соединений относятся: дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин. Дофамин – один из доступных и недорогих субстратов MAO.

В роли электрохимически активной детектирующей системы применяли фермент-субстратную систему моноаминоксидаза типа А (MAO) – дофамин. Для детекции конечного аналитического сигнала использовали амперометрический биосенсор на основе стеклоглеродного электрода и биочувствительной части из желатиновой мембраны с включенной в нее MAO.

MAO катализирует реакции окислительного дезаминирования дофамина. Продуктами такой реакции являются альдегид, пероксид водорода и аммиак.

Биокаталитическая реакция с использованием дофамина в качестве субстрата может быть представлена в следующем виде:



В рассматриваемых условиях наблюдается электроокисление и самого дофамина на стеклоглероде при потенциале +0.55 В. В присутствии же иммобилизованной MAO в растворах дофамина можно наблюдать появление дополни-

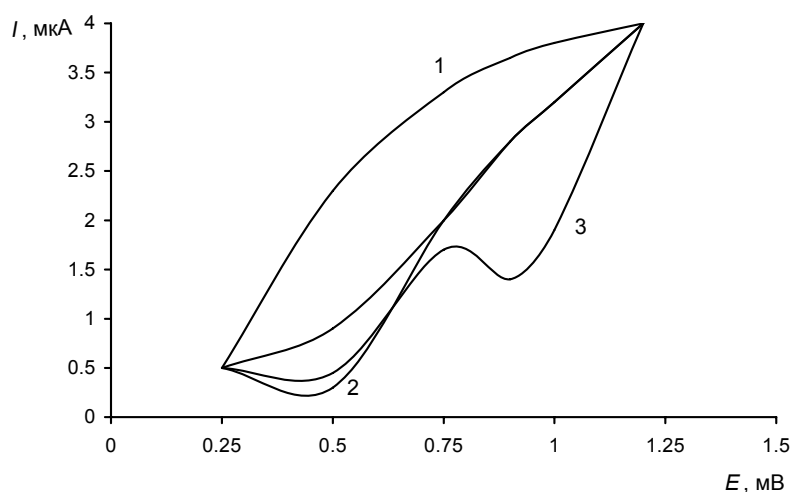


Рис. 3. Вольтамперограммы ацетатного буферного раствора с pH 5.5 (1), в присутствии растворов дофамина с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ М (2), в присутствии ИМАО (3)

тельного аналитического сигнала при потенциале $+0.8$ В, что соответствует окислению пероксида водорода (рис. 3).

Известно, что кислород воздуха легко окисляет гидрохиноновый фрагмент молекул катехоламинов, а в щелочных средах это окисление значительно ускоряется, а ИМАО проявляет наибольшую каталитическую активность именно в слабо-щелочной среде [2]. При pH 5.5 не наблюдается окисления самого дофамина, в то же время ИМАО проявляет еще достаточную каталитическую активность. Буферные растворы с таким значением pH использовали в качестве фоновых электролитов.

Большая разница в потенциалах (почти 0.3 В) позволяет получать аналитические сигналы, достаточно хорошо различимые по потенциалам, что не мешает фиксированию каждого отдельного сигнала в присутствии другого.

Наблюдаемые пики тока необратимы и контролируются скоростью протекания биокаталитической реакции (СЕ-механизм).

Изучение аналитического сигнала (ток электроокисления пероксида водорода) при использовании различных концентраций субстрата показало, что наиболее удобный для расчетов аналитический сигнал (по величине и форме) наблюдался при концентрации субстрата $1 \cdot 10^{-3}$ М. Использование меньших концентраций ($1 \cdot 10^{-4}$ М) приводило к получению небольшого по величине аналитического сигнала. Выбранное значение концентрации субстрата использовали при всех дальнейших измерениях и определениях с помощью МАО-биосенсора.

Линейная зависимость между величиной тока окисления продукта реакции (пероксид водорода) при соответствующем потенциале и концентрацией субстрата наблюдается в области концентраций $5 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-4}$ с выходом на предел при концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М (рис. 4).

Полученные результаты показывают, что биокаталитическая реакция протекает во времени (рис. 5). Система приходит в равновесное состояние через 14–15 мин., что отражается в выходе на предел аналитического сигнала.

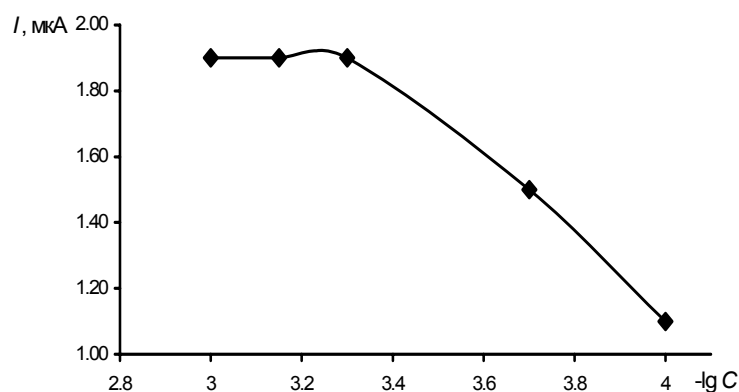


Рис. 4. Зависимость аналитического сигнала от концентрации субстрата

Наилучшие условия функционирования разработанного биосенсора: оптимальная концентрация субстрата – $1 \cdot 10^{-3}$ М, рН = 5.5, время инкубирования фермент-субстратного комплекса – 15 мин.

Подтверждением того, что наблюдаемый аналитический сигнал относится к пику окисления пероксида водорода, служит и то, что использование других соединений, относящихся к субстратам MAO, из перечисленных в начале этого раздела в качестве субстратов, также дает его после соответствующей инкубации.

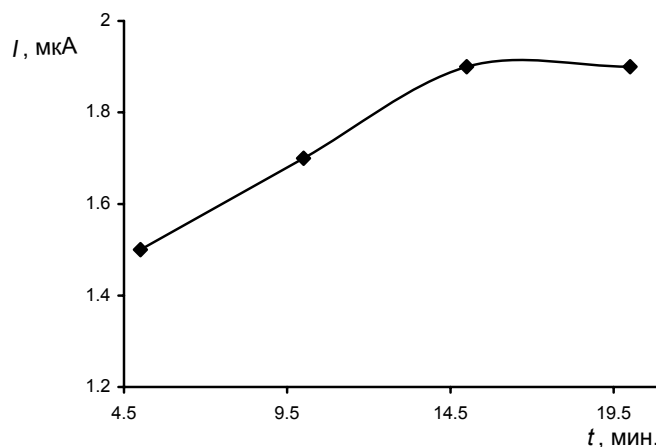


Рис. 5. Зависимость тока окисления пероксида водорода от времени инкубации фермента с субстратом рН = 5.5 ацетатный буферный раствор

Полученные результаты позволяют рассчитать изменение удельной каталитической активности иммобилизованной MAO. Для этого использовали формулу:

$$A = C_s \cdot V / (t \cdot 1000 \cdot m),$$

где A – активность фермента в мМоль/мин·см², C_s – концентрация субстрата (дофамин) в моль/л, V – объем исследуемого раствора в мл, t – время фикси-

Табл. 1

Изменение удельной каталитической активности ИМАО во времени

| Время хранения ИМАО | Удельная активность, мкмоль/мин·см ² |
|---------------------|---|
| 1 неделя | 3.1 ± 0.2 |
| 2 неделя | 3.0 ± 0.2 |
| 1 месяц | 2.8 ± 0.2 |

рования аналитического сигнала в мин., S – площадь, используемой в составе биосенсора мембраны с иммобилизованным ферментом в см².

Концентрацию субстрата, участвующую в реакции окислительного дезаминирования, находили из зависимости тока окисления пероксида водорода от концентрации субстрата. Время ферментативной реакции варьировали от 5 до 10 мин.

Полученные результаты приведены в табл. 1.

Согласно литературным данным, к соединениям, оказывающим влияние на соответствующую биокаталитическую реакцию, можно отнести вещества, влияющие на электрохимическое поведение дофамина, например, трициклический антидепрессант дезипрамина гидрохлорид (петилил). Он ингибирует обратный захват норадреналина, дофамина, серотанина, что приводит к их накоплению в синаптической щели и усилению физиологической активности.

Предварительные исследования показали, что в присутствии петилила наблюдается изменение высоты пика дофамина при $E = +0.55$ В. В определенной области концентраций петилила наблюдается увеличение величины аналитического сигнала дофамина и уменьшение сигнала от пероксида водорода, что указывает на его ингибирующее действие на МАО. Установлено, что такое действие петилила проявляется в области концентраций от $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Градуировочный график, построенный для определения петилила, имел линейный участок, описываемый уравнением

$$I_p I_0 = (135 \pm 2) + (-17.0 \pm 0.3)(-\lg C), \quad r = 0.9997.$$

Правильность определения петилила с помощью разработанной методики была оценена на модельных растворах способом «введено – найдено» (табл. 2).

Согласно литературным данным [8], в качестве ингибиторов МАО могут выступать некоторые из лекарственных соединений, например, пиразидол, являющийся ингибитором моноаминоксидазы обратимого действия.

Показана возможность определения пиразидола в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, что может быть использовано для оценки качества содержащих его фармакологических форм и содержания остаточных количеств этого лекарственного препарата в физиологических жидкостях.

Градуировочный график, построенный для определения пиразидола, имел линейный участок, описываемый уравнением

$$I_p I_0 = (8.5 \pm 0.3) + (-8 \pm 1)(-\lg C), \quad r = 0.9997.$$

Правильность определения петилила с помощью разработанной методики была оценена на модельных растворах способом «введено – найдено» (табл. 3).

Табл. 2

Результаты определение петилила с помощью биосенсора на основе ИМАО
($n = 5, p = 0.95$)

| Введено, моль/л | Найдено, моль/л | Sr |
|-------------------|-------------------------------|-------|
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ | 0.020 |
| $5 \cdot 10^{-6}$ | $(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$ | 0.030 |
| $5 \cdot 10^{-7}$ | $(4.7 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$ | 0.032 |

Примечание. $C_n = 8 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Табл. 3

Результаты определение пиразидола с помощью биосенсора на основе ИМАО
($n = 5, p = 0.95$)

| Введено, моль/л | Найдено, моль/л | Sr |
|-------------------|-------------------------------|-------|
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(2.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ | 0.021 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ | 0.028 |
| $5 \cdot 10^{-6}$ | $(5.2 \pm 0.4) \cdot 10^{-6}$ | 0.032 |

Примечание. $C_n = 8 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Таким образом, полученные экспериментальные результаты послужили основой для разработки амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной МАО и стеклоглеродного или платинового электродов. Выбранные условия получения биочувствительной части сенсора и его функционирования обеспечивают получение устойчивого максимального аналитического сигнала и возможность определения отдельных ингибиторов МАО с C_n на уровне $8 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Полученные результаты будут в дальнейшем использованы для иммуноэкстракционного определения лекарственных препаратов – ингибиторов МАО.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-03-33116).

Summary

E.P. Medyantseva, R.M. Varlamova, D.A. Gimaletdinova, A.N. Fattakhova, H.C. Budnikov. The conditions of functioning of the amperometric biosensor based on monoaminoxidase.

The approaches for the development of the amperometric biosensor based on immobilized monoaminoxidase and carbon glass and platinum electrodes have been obtained. Functioning conditions of the sensor: acetate buffer (pH 5.5), substrate concentration – $5 \cdot 10^{-3}$ M, potential of the analytical signal registration were chosen. The analytical possibilities of the biosensor were showed to determine antidepressants pethylil and pyrasidol; the detection limits were $8 \cdot 10^{-8}$ M and $8 \cdot 10^{-7}$ M respectively.

Литература

1. Горкин В.З. Аминоксидазы и их значение в медицине. – М.: Медицина, 1981. – 336 с.

2. *Кугушева Л.И., Кузнецова Л.П., Никольская Е.Б., Ягодина О.В.* Применение ферментсодержащих мембран для определения органических соединений // Журн. аналит. химии. – 1992. – Т. 47, № 8. – С. 1478–1482.
3. *Никольская Е.Б., Ягодина О.В., Искандеров Р.Р.* Зависимость аналитических характеристик биоспецифических и газочувствительных сенсоров от выбора потенциометрического датчика // Журн. аналит. химии. – 1995. – Т. 50, № 12. – С. 1275–1279.
4. *Budantsev A.Yu.* Biosensor for catecholamines with immobilized monoamine oxidase in tissue sections // Analytica Chim. Acta. – 1991. – V. 249. – P. 71–76.
5. *Hong Z., Yuzhong Z., Zhuobin Y.* Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly (hipuric acid) modified glassy carbon electrode // Electroanalysis. – 2002. – V. 14, No 14. – P. 1031–1034.
6. *Шайдарова Л.Г., Гедмина А.В., Челнокова И.А., Будников Г.К.* Электрокаталитическое окисление гидрохинона и пирокатхина на электроде, модифицированном поливинилпиридиновой пленкой с электроосажденным родием, и его использование для анализа фармпрепаратов // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59, № 11. – С. 1137–1144.
7. *Кулис Ю.Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов – Вильнюс: Мокслас, 1981. – 200 с.
8. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: в 2 т. – М.: ООО Новая Волна, 2002.

Поступила в редакцию
14.06.05

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Варламова Р.М. – аспирант кафедры аналитической химии химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Regina.Varlamova@ksu.ru

Гималетдинова Д.А. – студент химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Фаттахова Альфия Нурлимамовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

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

E-mail: Herman.Budnikov@ksu.ru