

УДК 543.257.5

doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.5-16

БИОАФФИННЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ДНК-СЕНСОРА

С.С. Бабкина¹, Н.А. Улахович², Э.П. Медянцева², А.Р. Гатаулина²

¹МИРЭА – Российский технологический университет, г. Москва, 119454, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Разработан биоаффинный способ определения адреналина и дофамина с использованием иммобилизованной ренатурированной ДНК в составе амперометрического биосенсора. На основании данных спектрофотометрии и вольтамперометрии установлено, что состав и константы устойчивости образующихся комплексов с катехоламинами в зависимости от их концентрации изменяются от $[KAL_2]$ до $[KA_2L]$, где КА – катехоламин, L – пара нуклеотидов, $\lg \beta_{эфф} = 10.1–13.5$. Показано высокое сродство адреналина и дофамина к молекулам иммобилизованной ренатурированной ДНК, что позволяет провести эффективное концентрирование КА из анализируемого раствора с низкой концентрацией, в том числе из многокомпонентных жидкостей. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $5.5 \cdot 10^{-9}$ (адреналин) и $2.0 \cdot 10^{-8}$ (дофамин) моль/л. Предложенный способ отличается высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью (относительная погрешность не превышает 5%) и временем единичного определения не более 30 мин.

Ключевые слова: адреналин, амперометрический сенсор, биоаффинные методы, биосенсор, ДНК, дофамин, катехоламины

Введение

Контроль содержания катехоламинов в плазме крови и моче используется для диагностики некоторых онкологических заболеваний. В то же время эти соединения могут выступать в роли эффекторов ДНК. Все это обуславливает необходимость изучения изменений в структуре ДНК в их присутствии [1–3].

Избыточное выделение гормона стресса адреналина сопровождается выделением частиц активного кислорода, который вызывает нарушение целостности цепочек ДНК, приводя к мутациям, возникновению рака и дисфункциям организма, связанным со старением [4]. В работе [5] установлено непосредственное взаимодействие адреналина с двухнитиевой ДНК. Предпочтительное связывание с двухнитиевой, а не с одонитиевой ДНК позволило предположить, что комплекс адреналин – ДНК образуется за счет встраивания молекул адреналина в бороздки ДНК и интеркалирования [5]. Изучение взаимодействия адреналина и дофамина в более широком диапазоне концентраций с ДНК показало, что при низких концентрациях эффектора преимущественно реализуется электростатический

механизм взаимодействия, а при увеличении концентрации эффектора основную роль в образовании комплекса играет интеркаляция [6]. Перспективы создания сенсорных систем для диагностики различных заболеваний по содержанию катехоламинов и их метаболитов рассмотрены в обзоре [7].

Эти исследования показывают актуальность изучения взаимодействия ДНК с катехоламинами, более детального установления механизма этого процесса и определения катехоламинов с помощью ДНК-содержащих аналитических устройств. Учитывая установленные два варианта взаимодействия адреналина с ДНК, представляется целесообразным при разработке ДНК-сенсора для определения катехоламинов *in vitro* использовать ренатурированную форму ДНК при иммобилизации в составе сенсора. Эффективность такого подхода была доказана нами ранее при определении противоопухолевых препаратов с помощью амперометрических ДНК-сенсоров [8–10].

Целью настоящего исследования является установление характера взаимодействия адреналина и дофамина с ренатурированной иммобилизованной ДНК для последующей разработки биоаффинного способа определения этих катехоламинов с помощью амперометрического ДНК-сенсора.

1. Экспериментальная часть

1.1. Аппаратура и оборудование. Вольтамперометрические измерения проводили с помощью потенциостата/гальваностата μ Autolab type III (Eco Chemie V.V., Нидерланды). Рабочим электродом служил электрод из стеклоуглерода (СУЭ) с рабочей поверхностью 0.1 см^2 либо разработанный биосенсор (БС), в котором мембрану с иммобилизованной ренатурированной ДНК (р-ИДНК) наносили на поверхность СУЭ. Электрод сравнения – хлоридсеребряный.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Lambda 750 (Perkin-Elmer, Великобритания) в области длин волн 200–1000 нм в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Использовали термостат Пельтье РТР-1. Точность измерения оптической плотности (A) составляла 1%. Все измерения проводили при термостатировании $298 \pm 2 \text{ К}$.

Для получения дисперсий наноструктурированных материалов применяли ультразвуковую ванну – модель S30H фирмы Elmasonic (Германия) с частотой 37 КГц.

1.2. Материалы и реактивы. Использовали ДНК эритроцитов цыплят фирмы Reanal: соотношение N : P составляло 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 $\lambda 258 \text{ нм}$. Ренатурированную ДНК (р-ДНК) получали путем нагревания раствора ДНК на водяной бане с последующим медленным охлаждением в течение 5 мин [11].

Применяли следующие химические реагенты и растворы: нитрат целлюлозы (НЦ) ФТ-30 типа коллоксилин классификации «ч.» со средним содержанием азота 11.5–12.0%, углеродные нанотрубки (УНТ) с геометрическими параметрами: длина 0.1–10 мкм, внутренний диаметр 2–6 нм, внешний диаметр – 10–15 нм (Sigma-Aldrich, США), органические растворители классификации «х.ч.» (ацетон,

толуол, гексан) и 25%-ный раствор глутарового альдегида фирмы Reanal, ацетатный буферный раствор с pH 4.0–5.0, 0.9%-ный раствор NaCl.

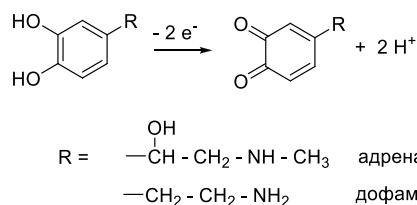
Применяли дофамин и адреналин фирмы Aldrich, США. Использовали также растворы адреналина (0.1%-ный раствор, фирма «Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко», Россия) и дофамина (раствор для инъекций 4%, фирма «Дофамин-Ферейн», Россия).

Образцы иммобилизованной р-ДНК получали путем растворения навески НЦ в системе органических растворителей при постоянном перемешивании на магнитной мешалке с последующим добавлением водного раствора р-ДНК, УНТ и раствора глутарового альдегида для химического связывания молекул р-ДНК с НЦ-матрицей.

1.3. Методика определения катехоламинов (КА) с помощью ДНК-содержащего биосенсора, основанная на установленном сродстве адреналина (АД) и дофамина (ДА) к молекулам иммобилизованной р-ДНК, позволяет провести эффективное концентрирование данных соединений из анализируемого раствора с низкой концентрацией. Для проведения биоаффинного мембранного концентрирования АД (либо ДА) амперометрический биосенсор, содержащий иммобилизованную р-ДНК, погружали в электрохимическую ячейку с раствором КА различной известной концентрации в ацетатном буферном растворе (pH 4.9 ± 0.1) на определенное время. Измеряли высоту анодного пика при потенциале 0.5–0.6 В. После каждого определения раствор сливали, ячейку промывали и заливали в нее 5 мл 1 М раствора NaCl. Через 20 мин (время реактивации) в ячейку заливали новый раствор АД или ДА в ацетатном буферном растворе и снимали вольтамперограмму в интервале потенциалов от 0 до 1.0 В при скорости наложения потенциала 0.5 В/с.

2. Результаты и их обсуждение

Адреналин (АД) и дофамин (ДА) окисляются на немодифицированном СУЭ необратимо в области потенциалов 0.5–0.60 В на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.5–4.9. В условиях вольтамперометрии анодно-катодные пики в случае дофамина растянуты по оси потенциалов (более чем на 200 мВ), при окислении адреналина наблюдается только анодный пик. Согласно электрохимической реакции двухэлектронный процесс приводит к преобразованию рассматриваемых КА до соответствующих хинонов:



При повторной регистрации вольтамперограммы окисления КА форма пиков ухудшается (пик сглаживается), причем при концентрациях меньше $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л пики практически уже не наблюдаются. Это затрудняет использование немодифицированного СУЭ для вольтамперометрического определения рассматриваемых КА.

В качестве модификатора поверхности СУЭ была выбрана р-ИДНК в составе НЦ мембраны или р-ИДНК в составе НЦ-мембраны, полученной при добавлении в соответствующий раствор дисперсии УНТ. Соотношение НЦ : УНТ бралось равным 10:0.1. Использование УНТ обеспечивает электропроводность биочувствительной части сенсора и более прочное закрепление ее на поверхности СУЭ и увеличивает рабочую поверхность электрода.

Амперометрический биосенсор, используемый в дальнейших исследованиях, представлял собой комбинацию СУЭ с мембраной из НЦ с включенной в нее р-ДНК. Раствор р-ДНК для иммобилизации наносили на поверхность электрода путем капельного испарения. Такой биосенсор позволяет расширить область рабочих концентраций и регистрировать вольтамперограммы в области концентраций от $(3-5) \cdot 10^{-4}$ до $8 \cdot 10^{-8} - 8 \cdot 10^{-9}$ моль/л. При этом величина тока при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л увеличивается практически в два раза.

Для обоснованного выбора условий определения рассматриваемых КА представляло интерес изучить процессы комплексообразования, происходящие между р-ДНК и КА с целью интерпретации процессов, происходящих на поверхности электрода.

На основе спектрофотометрических данных методом математического моделирования с использованием программы SPESSP [12, 13] были рассчитаны состав образующихся комплексов и другие параметры процесса комплексообразования. Программа позволяет решить уравнение для молярного коэффициента экстинкции путем минимизации целевой функции:

$$F = \sum_1^n (A_{\text{эксп},j} - A_{\text{расч},j})^2 \frac{1}{\sigma^2 A_{\text{эксп},j}^2},$$

где $A_{\text{эксп}}$ и $A_{\text{расч}}$ – экспериментально измеренная и рассчитанная величины оптической плотности; j и n – номер и количество экспериментов; σ – относительная погрешность измерения A (оптической плотности). Оценку достоверности результатов проводили по известным общепринятым критериям. Методика спектрофотометрических измерений с использованием ИДНК подробно описана в [14].

Комплексообразование происходит за счет взаимодействия КА с азотистыми основаниями ДНК [6]. Такой подход позволяет использовать р-ИДНК для концентрирования КА на поверхности предлагаемого биосенсора.

Результаты изучения комплексообразования КА с р-ИДНК представлены в табл. 1: определен состав комплексов, приведены логарифмы значений эффективных констант устойчивости ($\lg \beta_{\text{эфф}}$) образующихся комплексов, мольные доли комплексов.

В частности, изменение концентрации КА в системах КА-р-ИДНК приводит к изменению состава соответствующих комплексов (рис. 1, 2). Табл. 1 отражает этот процесс. Например, количество комплекса состава $[АД_2L]$, где L – пара нуклеотидов, уменьшается при увеличении концентрации АД и наблюдается увеличение доли комплекса состава $[АД_2L]$ (рис. 1, кривые 1, 2). При концентрации АД порядка $1.0 \cdot 10^{-6}$ моль/л мольные доли комплексов $[АД_2L]$ и $[АДL_2]$ составляют 0.78 и 0.15 соответственно.

Табл. 1

Результаты изучения комплексообразования катехоламинов с р-ИДНК (L), рН 4.9

Характеристики комплексообразования	Адреналин		Дофамин	
	[АД ₂ L]	[АДL ₂]	[ДА ₂ L]	[ДАL ₂]
Соотношение нуклеотид : КА	1:2	2:1	1:2	2:1
Lg β _{эфф}	11.2 ± 0.6	13.3 ± 0.5	10.1 ± 0.5	11.5 ± 0.6
Доля комплекса c _{КА} = 1.02 · 10 ⁻⁷ М	0.13	0.61	0.15	0.58
Доля комплекса c _{КА} = 1.05 · 10 ⁻⁶ М	0.78	0.15	0.72	0.12

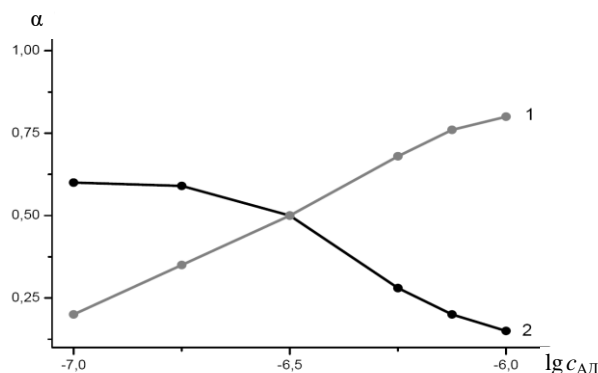


Рис. 1. Изменение мольной доли (α) комплексов адреналин – р-ИДНК: 1 – изменение мольной доли комплекса [АД₂L]; 2 – изменение мольной доли комплекса [АДL₂]; c_{ДНК} = 0.01 мг/мл, ацетатный буфер, рН 4.9

При концентрациях АД порядка 10⁻⁷ моль/л и меньше происходит в основном интеркаляция с образованием комплекса состава [АДL₂], (рис. 1, кривая 2) [15, 16].

При концентрациях АД порядка 1.10⁻⁶ моль/л и больше образуется более сложный комплекс состава [АД₂L], константа устойчивости которого несколько ниже по сравнению с комплексом состава [АДL₂], что можно объяснить стерическими препятствиями, связанными со строением АД (табл. 1). Различие можно связать с тем, что в молекуле адреналина присутствует дополнительная гидроксильная группа.

Как видно из табл. 1, выбранная форма молекулы ДНК (р-ДНК) и способ ее иммобилизации (р-ИДНК) позволяют получить комплексы с высокими значениями эффективных констант устойчивости (lg β_{эфф} = 11.2–13.8).

В случае ДА наблюдается подобная ситуация (рис. 2, табл. 1). Однако константы устойчивости в этом случае несколько ниже, чем для АД (lg β_{эфф} = 10.1–11.5). Полученные более высокие значения констант устойчивости в системах АД – р-ИДНК и ДА – р-ИДНК по сравнению с описанными в литературе соответствующими значениями для нативной неиммобилизованной ДНК [6] свидетельствуют о преимуществе использования иммобилизованной ДНК, особенно в ренатурированной форме, в аналитических системах на основе ДНК.

Была сделана попытка смоделировать процессы, которые могут происходить при определении КА с помощью разработанного биосенсора. Для этой цели использовали образцы р-ИДНК площадью 1 см², которые помещали раствор,

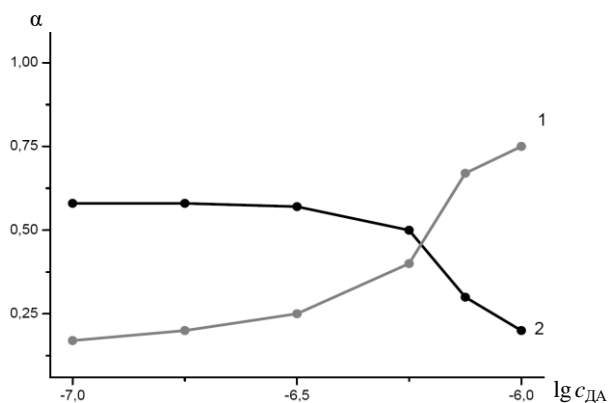


Рис. 2. Изменение мольной доли (α) комплексов дофамин – р-ИДНК: 1 – изменение мольной доли комплекса [ДА₂L]; 2 – изменение мольной доли комплекса [ДАL₂]; $c_{\text{ДНК}} = 0.01$ мг/мл, ацетатный буфер, pH 4.9

содержащий $10^{-6} - 10^{-5}$ моль/л КА. При этом после выдерживания образцов иммобилизованной р-ДНК в исследуемом растворе в течение 20 мин и их удаления высота анодного пика при 0.5–0.6 В уменьшается или не наблюдается вообще за счет комплексообразования АД и ДА с иммобилизованной р-ДНК. Это может быть связано с тем, что при иммобилизации происходит определенное фиксирование структуры молекулы, что и обеспечивает большую доступность мест связывания для молекул эффектора. Это может привести к повышению эффективности процесса концентрирования эффектора на поверхности биосенсора, обеспечивая определение низких концентраций КА, что и было подтверждено последующими исследованиями.

В спектрах поглощения раствора АД и ДА при pH 4.9 в ацетатном буферном растворе наблюдаются максимумы полос поглощения при λ 282 и 280 нм соответственно, которые соответствуют полосам поверхностного плазмонного резонанса рассматриваемых КА, согласно литературным данным [6]. После выдерживания в растворе КА ДНК-сенсора в течение 15–20 мин максимумы практически не наблюдались. Если же провести реактивацию р-ИДНК-содержащей мембраны 1 М раствором NaCl, то указанные аналитические сигналы вновь наблюдаются. Это является подтверждением того, что рассматриваемые КА связываются с выбранной формой р-ИДНК. Предварительно было доказано, что неспецифическое связывание КА просто с НЦ-матрицей не наблюдается.

Важное значение при установлении лучших условий получения максимального аналитического сигнала любого определения имеет выбор времени проведения отдельных этапов анализа. Выявление таких факторов – условие успешного концентрирования при конкретных заданных параметрах.

Выбор условий определения КА

Время концентрирования. Отсутствие в большинстве случаев обязательной пробоподготовки и проведение анализа в кинетическом режиме с перемешиванием значительно сокращают сам анализ. Несмотря на это, выбор в случае предлагаемого способа времени концентрирования катехоламинов и реактивации биочувствительной части также играет большое значение.

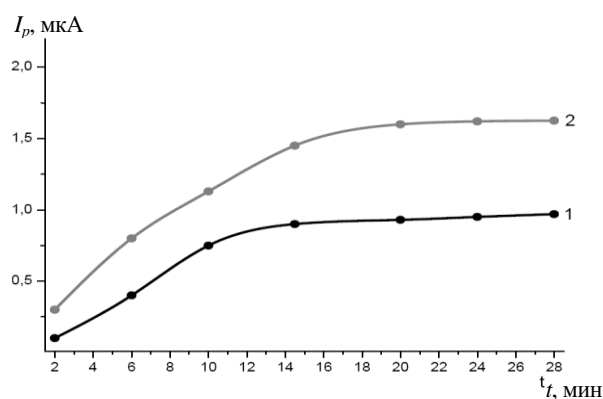


Рис. 3. Зависимость тока окисления АД и ДА от времени концентрирования катехоламинов на БС, содержащем р-ИДНК: 1 – $c_{\text{АД}} = 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л; 2 – $c_{\text{ДА}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л

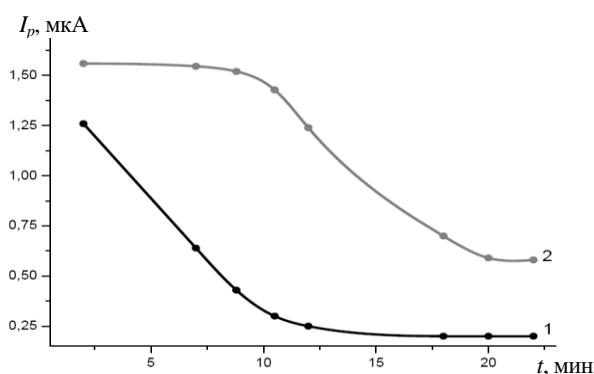


Рис. 4. Зависимость тока окисления АД и ДА от времени реактивации БС, содержащего р-ИДНК: 1 – $c_{\text{АД}} = 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л; 2 – $c_{\text{ДА}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л

На рис. 3 представлена зависимость тока окисления адреналина или дофамина от времени концентрирования. Для АД оно составило 12 мин, а для ДА – 20 мин в области концентраций $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Соответственно, при более низких концентрациях это время еще значительно уменьшается.

Время реактивации биочувствительной части биосенсора. Удаление определяемых соединений с поверхности биочувствительной части биосенсора обработкой его раствором с большой ионной силой (1 М NaCl) позволяет использовать биосенсор многократно, что делает способ более экономичным и экспрессным. Такая операция обеспечивает использование одной и той же поверхности биосенсора не менее 4–6 раз с погрешностью, соизмеримой с погрешностью измерения тока.

Согласно рис. 4, лучше всего токи окисления АД и ДА воспроизводятся на разработанном БС через 20 мин после обработки раствором 1 М NaCl.

Оценка аналитических возможностей методики определения катехоламинов. Предлагаемая методика определения КА (см. п. 1.3) хорошо зарекомендовала себя для растворов с концентрацией (порядка $10^{-8} - 10^{-9}$ моль/л) с минимальной пробоподготовкой. После проведения всех описанных операций измеряли высоту анодного пика при потенциале 0,5–0,6 В и по полученным данным строили

Табл. 2

Аналитические характеристики определения катехоламинов с помощью амперометрического р-ИДНК-сенсора, рН 4.9

Аналит	Диапазон концентраций, моль/л	Уравнение регрессии $I = a + b \lg c$ I , мкА; c , моль/л		R	c_H
		a	b		
Дофамин	$8 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-4}$	6.5 ± 0.3	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$	0.9988	$2.0 \cdot 10^{-8}$
Адреналин	$8 \cdot 10^{-9} - 3 \cdot 10^{-4}$	8.2 ± 0.3	$(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$	0.9990	$5.5 \cdot 10^{-9}$

Табл. 3

Результаты определения адреналина и дофамина в модельных растворах с помощью амперометрического р-ИДНК-сенсора ($n = 5$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.78$)

Введено $c \cdot 10^{-7}$, моль/л	Найдено $(c \pm \delta) \cdot 10^{-8}$, моль/л	s_T	$t_{\text{расч}}$
Адреналин			
0.50	0.45 ± 0.02	0.050	1.9
1.25	1.28 ± 0.06	0.048	1.4
Дофамин			
1.25	1.28 ± 0.06	0.050	1.7
2.50	2.47 ± 0.08	0.041	0.9
5.00	5.20 ± 0.20	0.040	0.5

градуировочные графики (табл. 2). Градуировочные зависимости применяли для определения концентрации АД или ДА в исследуемых объектах.

Время определения с учетом времени реактивации биочувствительной части не превышало 30 мин.

Проверено влияние различных компонентов, которые могут присутствовать в биологических объектах (плазме крови, урине и др.), на определение КА. Установлено, что определение КА может быть проведено в присутствии 10-кратных количеств некоторых аминокислот (глицина, аланина, валина и др.), 100-кратных количеств неорганических ионов (SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), крахмала. Мешающее действие оказывают присутствие соизмеримых количеств цистеина, аскорбиновой кислоты, тирозина. В этом случае аналитический сигнал отличается от сигнала КА более чем на $\pm 5\%$ (число определений n не менее 5).

р-ДНК после иммобилизации сохраняет активность около 30 дней, практически не вымывается в течение этого времени из НЦ-мембраны. Следует отметить, что концентрирование адреналина и дофамина с помощью р-ИДНК позволяет снизить пределы определения КА до 5.5–20 нМ, что примерно на три порядка лучше, чем при использовании немодифицированного СУЭ.

Результаты определения адреналина и дофамина в модельных растворах указывают на то, что систематическая погрешность незначима, поскольку $t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$ (табл. 3). В табл. 4 приведены результаты определения рассматриваемых КА в соответствующих лекарственных препаратах.

Табл. 4

Результаты определения катехоламинов в лекарственных препаратах с помощью амперометрического р-ИДНК-сенсора ($n = 5$, $P = 0.95$)

Объект исследования	Аналит	Аттестованное содержание аналита, %	Найдено, %	s_t
Адреналин гидрохлорид (в ампулах)	Адреналин	0.100	0.098 ± 0.003	0.041
Дофамин гидрохлорид (в ампулах)	Дофамин	0.400	0.43 ± 0.02	0.047

Заключение

Таким образом, доказанное наличие специфического взаимодействия катехоламинов и р-ИДНК на поверхности биочувствительной мембраны, значения эффективных констант устойчивости образующихся комплексов, найденные условия проведения концентрирования – все это обеспечивает возможность проводить определение содержания дофамина и адреналина на уровне $c \cdot 10^{-8} - c \cdot 10^{-9}$ моль/л амперометрическим ДНК-сенсором практически без предварительной пробоподготовки.

Литература

1. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. Т. 1. – М.: Новая волна, 2002. – 539 с.
2. *Чиссов В.И., Дарьялова С.Л.* Онкология. – М.: ГЭОТАР Медицина, 2007. – 560 с.
3. *Paleček E., Bartošík M.* Intrinsic electrocatalysis in DNA // *ChemElectroChem*. – 2017. – V. 5, No 6. – P. 936–942. – doi: 10.1002/celec.201700888.
4. *Čabarkapa A., Živković L., Žukovec D., Djelić N., Bajić V., Dekanski D., Spremo-Potparević B.* Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using *in vitro* comet assay with human peripheral leukocytes // *Toxicol. in Vitro*. – 2014. – V. 28, No 3. – P. 451–456. – doi: 10.1016/j.tiv.2013.12.014.
5. *Yang G.-J., Xu J.-J., Chen H.-Y.* Studies on the interaction between catecholamine derivatives and DNA by means of spectroscopic and voltammetric methods // *Chem. J. Chin. Univ.* – 2004. – V. 25, No 7. – P. 1235–1239.
6. *Zheng S.-J., Lin X.-Q.* Spectral and electrochemical investigation of intercalations of adrenaline and CT-DNA // *Chin. J. Chem.* – 2003. – V. 21, No 7. – P. 767–771. – doi: 10.1002/cjoc.20030210712.
7. *Веселова И.А., Сергеева Е.А., Македонская М.И., Еремينا О.Е., Калмыков С.Н., Шеховцова Т.Н.* Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики // *Журн. аналит. химии*. – 2016. – Т. 71, № 12. – С. 1235–1249. – doi: 10.7868/S0044450216120124.
8. *Бабкина С.С.* Наноаналитика: применение сенсорных устройств на основе биоаффинных взаимодействий в медицине, фармакологическом и экологическом анализе // *Нанотехнологии: наука и производство*. – 2009. – № 2. – С. 23–27.
9. *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.
10. *Бабкина С.С., Моисеева Е.Н., Улахович Н.А.* Определение доксорубина с помощью амперометрического биосенсора // *Фармация*. – 2006. – № 5. – С. 9–11.

11. *Budnikov H.C., Medyantseva E.P., Babkina S.S.* An enzyme amperometric sensor for toxicants determination // *J. Electroanal. Chem.* – 1991. – V. 310, No 1–2. – P. 49–55. – doi: 10.1016/0022-0728(91)85251-J.
12. *Щербакова Э.С., Гольдштейн И.П., Гурьянова Е.Н., Кочешков Е.А.* Метод обработки на ЭВМ результатов физико-химического исследования комплексных соединений // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* – 1975. – № 6. – С. 1262–1271.
13. *Сальников Ю.И., Глебов А.Н., Девятков Ф.В.* Полиядерные комплексы в растворах. – Казань: Изд-во Казан. гос. ун-та, 1989. – 288 с.
14. *Бабкина С.С., Винтер В.Г., Зайнуллина А.С.* Иммуноферментный метод определения низкомолекулярных органических соединений со спектрофотометрической индикацией аналитического сигнала // *Журн. аналит. химии.* – 1994. – Т. 49, № 10. – С. 1119–1123.
15. *Rauf S., Gooding J.J., Ahtar K.* Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37, No 2. – P. 205–217. – doi: 10.1016/j.jpba.2004.10.037.
16. *Piedade J.A.P., Fernandes I.R., Oliveira-Brett A.M.* Electrochemical sensing of DNA-adriamycin interactions // *Bioelectrochemistry.* – 2002. – V. 56, No 1–2. – P. 81–83. – doi: 10.1016/S1567-5394(02)00013-0.

Поступила в редакцию
23.10.2019

Бабкина Софья Сауловна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии

МИРЭА – Российский технологический университет
пр. Вернадского, д. 78, г. Москва, 119454, Россия
E-mail: sofya.babkina@gmail.com

Улахович Николай Алексеевич, доктор химических наук, профессор кафедры неорганической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Nikolay.Ulakhovich@kpfu.ru

Медянцева Эльвина Павловна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: emedyant@gmail.com

Гатаулина Альфия Ринатовна, кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: alphiag@mail.ru

doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.5-16

**Bioaffinity-Based Method for Catecholamines Determination
with Amperometric DNA Sensor**S.S. Babkina ^{a*}, N.A. Ulakhovich ^{b**}, E.P. Medyantseva ^{b***}, A.R. Gataulina ^{b****}^aMIREA – Russian Technological University, Moscow, 119454 Russia^bKazan Federal University, Kazan, 420008 RussiaE-mail: *sofya.babkina@gmail.com, **Nikolay.Ulakhovich@kpfu.ru, ***emedyant@gmail.com,
****alphiag@mail.ru

Received October 23, 2019

Abstract

A bioaffinity-based method for the determination of adrenaline and dopamine involving immobilized renatured DNA incorporated into the amperometric biosensor was developed.

With the help of spectrophotometry and voltammetry data, it was found that the composition of complexes formed with catecholamines and their stability constants were changing with concentration from [KAL₂] to [KA₂L], where KA – catecholamine, L – base pare, and $\lg \beta_{\text{eff}} = 10.1–13.5$. The high affinity of adrenaline and dopamine to the immobilized renatured DNA molecule was revealed, thereby making it possible to run effective concentration of KA from the analyzed solutions of low concentration including multicomponent fluids.

The minimum reporting level was found to be $5.5 \cdot 10^{-9}$ (adrenaline) and $2.0 \cdot 10^{-8}$ (dopamin) mol/L, respectively. The proposed method is characterized by high sensitivity, reproducibility (relative accuracy does not exceed 5%), and single determination time shorter than 30 min.

Keywords: adrenaline, amperometric sensor, bioaffinity-based method, biosensor, DNA, dopamine, catecholamines

Figure Captions

Fig. 1. Changes in the mole fraction of adrenaline – r-IDNA complexes: 1 – changes in the mole fraction of the [AD₂L] complex; 2 – changes in the mole fraction of the [ADL₂] complex; $c_{\text{DNA}} = 0.01$ mg/mL, acetate buffer, pH 4.9.

Fig. 2. Changes in the mole fraction of dopamine – r-IDNA complexes: 1 – changes in the mole fraction of the [DA₂L] complex; 2 – changes in the mole fraction of the [DAL₂] complex; $c_{\text{DNA}} = 0.01$ mg/mL, acetate buffer, pH 4.9.

Fig. 3. Dependence of the oxidation current of AD and DA on the preconcentration time of catecholamines on the biosensor containing r-IDNA: 1 – $c_{\text{AD}} = 1 \cdot 10^{-7}$ mol/L; 2 – $c_{\text{DA}} = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

Fig. 4. Dependence of the oxidation current of AD and DA on the reactivation time of the biosensor containing r-IDNK: 1 – $c_{\text{AD}} = 1 \cdot 10^{-7}$ mol/L; 2 – $c_{\text{DA}} = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

References

1. Mashkovskii M.D. *Lekarstvennye sredstva* [Medicinal Drugs]. Vol. 1. Moscow, Novaya Volna, 2002. 539 p. (In Russian)
2. Chissov V.I., Dar'yalova S.L. *Onkologiya* [Oncology]. Moscow, GEOTAR Med., 2007. 560 p. (In Russian)
3. Paleček E., Bartošík M. Intrinsic electrocatalysis in DNA. *ChemElectroChem*, 2017, vol. 5, no. 6, pp. 936–942. doi: 10.1002/celec.201700888.

4. Čbarkapa A., Živković L., Žuvkoec D., Djelić N., Bajić V., Dekanski D., Spremo-Potparević B. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using *in vitro* comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol. in Vitro*, 2014, vol. 27, no. 3, pp. 451–456. doi: 10.1016/j.tiv.2013.12.014.
5. Yang G.-J., Xu J.-J., Chen H.-Y. Studies on the interaction between catecholamine derivatives and DNA by means of spectroscopic and voltammetric methods. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2004, vol. 25, no. 7, pp. 1235–1239.
6. Zheng S.-J., Lin X.-Q. Spectral and electrochemical investigation of intercalations of adrenaline and CT-DNA. *Chin. J. Chem.*, 2003, vol. 21, no. 7. pp. 767–771. doi: 10.1002/cjoc.20030210712.
7. Veselova I.A., Sergeeva E.A., Makedonskaya M.I., Eremina O.E., Kalmykov S.N., Shekhovtsova T.N. Methods for determining neurotransmitter metabolism markers for clinical diagnostics. *J. Anal. Chem.*, 2016, vol. 71, no. 12, pp. 1155–1168. doi: 10.7868/S0044450216120124.
8. Babkina S.S. Nanoanalytics: Application of sensors based on the bioaffinne interaction in medicine, pharmacology, and ecology analysis. *Nanotekhnol.: Nauka Proizvod.*, 2009, no. 2, pp. 23–27. (In Russian)
9. Babkina S.S., Budnikov H.C. Electrochemical biosensors based on nucleic acids and their use in bioaffinity assays for determining DNA and its effectors. *J. Anal. Chem.*, 2006, vol. 61, no. 8, pp. 728–739. doi: 10.1134/S1061934806080028.
10. Babkina S.S., Moiseeva E.N., Ulakhovich N.A. Doxorubicin determination by means of an amperometric biosensor. *Farmatsiya*, 2006, no. 5, pp. 9–11. (In Russian)
11. Budnikov H.C., Medyantseva E.P., Babkina S.S. An enzyme amperometric sensor for toxicants determination. *J. Electroanal. Chem.*, 1991, vol. 310, nos. 1–2, pp. 49–55. doi: 10.1016/0022-0728(91)85251-J.
12. Shcherbakova É.S., Gol'dshtein I.P., Gur'yanova E.N., Kocheshkov K.A. Method of treatment of the results of a physicochemical investigation of complex compounds in solutions on an electronic computer. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1975, vol. 24, no. 6, pp. 1165–1172. doi: 10.1007/BF00922039.
13. Salnikov Yu.I., Glebov A.N., Devyatov F.V. *Poliyadernye komplekсы v rastvorakh* [Polynuclear Complexes in Solutions]. Kazan, Izd. Kazan. Gos. Univ., 1989. 288 p. (In Russian)
14. Babkina S.S., Vinter V.G., Zainullina A.S. Immunoenzyme method for the determination of low-molecular organic-compounds with spectrophotometric indication of analytical signals. *J. Anal. Chem.*, 1994, vol. 49, no. 10, pp. 1005–1010.
15. Rauf S., Gooding J.J., Ahtar K. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, vol. 37, no. 2, pp. 205–217. doi: 10.1016/j.jpba.2004.10.037.
16. Piedade J.A.P., Fernandes I.R., Oliveira-Brett A.M. Electrochemical sensing of DNA-adriamycin interactions. *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 56, nos. 1–2, pp. 81–83. doi: 10.1016/S1567-5394(02)00013-0.

Для цитирования: Бабкина С.С., Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Гатаулина А.Р. Биоаффинный способ определения катехоламинов с использованием амперометрического ДНК-сенсора // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 1. – С. 5–16. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.5-16.

For citation: Babkina S.S., Ulakhovich N.A., Medyantseva E.P., Gataulina A.R. Bioaffinity-based method for catecholamines determination with amperometric DNA sensor. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 1, pp. 5–16. doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.5-16. (In Russian)