

МЕТОДИ АНАЛІЗУ L-АРГІНІНУ

Г. З. ГАЙДА¹, Н. Є. СТАСЮК¹, М. В. ГОНЧАР^{1, 2}

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів

²Інститут прикладної біотехнології і фундаментальних наук,
Жешувський університет, Польща

E-mail: galina_gayda@yahoo.com

Отримано 24.05.2013

Розглянуто сучасні фізико-хімічні та ензиматичні методи кількісного визначення L-аргініну. Більшість відомих методів визначення L-аргініну мають низку недоліків, основні з яких: низька селективність (хімічні), громіздкість та висока вартість апаратури (фізико-хімічні), недостатня стабільність (операційна та під час зберігання — біосенсиори), чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. Тому розроблення високоселективних і чутливих методів визначення вмісту L-аргініну, зокрема ензиматичних, з метою поліпшення системи моніторингу його рівня в медичній діагностиці та харчовій промисловості є актуальною проблемою.

Наведено результати власних досліджень щодо створення та апробації ефективних ензиматичних, зокрема біосенсорних, методів аналізу L-аргініну з використанням аргінази I печінки людини, виділеної з клітин рекомбінантних дріжджів *Hansenula polymorpha* NCYC-495 *pGAP1-HsARG1 (leu-2car1 Sc:LEU2)*. Аргіназа (КФ 3.5.3.1; L-аргінін-амідиногідролаза) відіграє вирішальну роль у гідролітичному розщепленні L-аргініну до L-орнітину та сечовини. Результати апробації створених на основі аргінази I амперометричних та потенціометричних біосенсорів, а також ензиматичних методів зі спектрофотометричною та флуоресцентною детекцією продукту свідчать про їхню ефективність для експрес-аналізу вмісту L-аргініну в фармацевтичних препаратах. Розроблені методи можуть бути перспективними для визначення L-аргініну в харчових продуктах (соках та винах), а також у сироватці крові для діагностики та контролю під час лікування деяких видів онкологічних захворювань. Висока селективність і простота запропонованих методів дадуть змогу істотно полегшити процедуру аналізу та замінити використовувані на цей час низькоселективні хімічні й дорогі хроматографічні методи.

Ключові слова: аналіз L-аргініну, біосенсиори, аргіназа I.

Амінокислота аргінін: L-Arg (α -аміно- δ -гуанідино-валеріанова кислота) — попередник L-орнітину, L-цитруліну, L-глутатіону, γ -аміномасляної кислоти, спермітину та інших сполук — одна з найбільш поляризованих, позитивно заряджених амінокислот [1].

Метаболізм L-Arg здійснюється, щонайменше, двома альтернативними шляхами: 1) окисним (за участю NO-синтази) з утворенням L-цитруліну та NO; 2) неокисним (за участю аргінази I) з утворенням L-орнітину та сечовини. Можливий і одночасний перебіг цих двох процесів [2].

У біосистемах L-Arg відіграє важливу роль у синтезі низки анаболічних гормонів, поліамінів та оксиду азоту.

Практично весь ланцюг перетворень L-Arg на похідні (L-орнітин, путресцин, L-цитрулін, спермідин) відбувається в трьох органах — кишечнику, печінці та нирках [3].

Рівень L-Arg в плазмі крові визначають за внутрішньовенного введення L-Arg у процесі діагностики та експериментального дослі-

дження захворювань ендокринної системи [4]. Відомо також, що визначення концентрації L-Arg у сироватці крові уможливорює діагностику та вивчення особливостей перебігу таких складних захворювань, як гепатокарцинома, меланоми шкіри та колоректальний рак [5–12]. Вимірювання концентрації L-Arg в сечі дає змогу діагностувати гомозиготну цистинурію [13].

У харчовій промисловості вміст L-Arg в амінокислотному складі сировини визначають з метою порівняння біохімічної цінності різних сортів м'яса та м'ясопродуктів [14]. Іншою важливою причиною моніторингу рівня L-Arg у харчових продуктах, зокрема у соках та винах, є принципова можливість утворення канцерогенного етилкарбамату — кінцевого продукту метаболізму L-Arg під дією мікроорганізмів [15].

На сьогодні визначення концентрації L-Arg в розчинах проводять методами: іонообмінної хроматографії [16, 17], флуориметрії [18], спектрофотометрії [19–26],

капілярного [27], зонного електрофорезу [28], полярографії [29], проточно-інжекційного аналізу [30], високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [31] та ензиматичними [32–34].

Перші спроби колориметричного (спектрофотометричного — СФ) визначення L-Arg обмежувались реакцією Сакагучі з α -нафтолом та натрію гіпохлоритом [20]. У подальших модифікаціях цього методу застосовували різноманітні хромогенні агенти, що містили: діацетил- α -нафтол [21], 2-метил- α -нафтол [22], 5-хлоро-7-йодо-8-гідроксигінолін (5-хлоро-7-йодо-ГХ) [23], α -нафтол та 2,3-бутандіонмонооксим — метод Вогес-Проскауера [24], тимол-(2-пропіл-5-метил)фенол і натрію гіпоброміт (метод Састрі) [25]; 8-гідроксигінолін (ГХ) та натрію гіпоброміт [26]; *n*-нітрофенілглюксаль та натрію аскорбат [19]; 1,2,4-тригідроксінтрахінон (ТГАХ) та гідрогену пероксид [35]. У табл. 1 наведено порівняльні характеристики найпоширеніших СФ-методів визначення L-Arg. Застосування цих методів у біологічних рідинах (плазмі та сечі) обмежується їхньою низькою селективністю, спричиненою позитивною реакцією на гуанідинові сполуки, тобто на точність вимірювань можуть впливати відносно високі концентрації L-лізину, L-проліну, L-цитруліну тощо [20, 35]. L-Arg у реальних зразках можна відокремлювати від інтерферуючих сполук, застосовуючи іонообмінні смоли [36], проте це ускладнює процедуру аналізу.

Найбільшого поширення набули хроматографічні методи кількісного аналізу L-Arg. Чутливий проточно-інжекційний хемілюмінесцентний (ХЛ) метод базується на взаємодії L-Arg з натрію гіпобромітом, однак критичним моментом реакції є низька стабільність цього реагенту [37]. Інший варіант проточно-інжекційного методу базується на

реакції L-Arg з трис-(2,2-біпіридил) рутенієм (ІІІ) за рН 10 з утворенням ХЛ-продукту. Недоліком цієї методики є неспецифічна взаємодія з іншими амінокислотами та необхідність попереднього відокремлення L-Arg на графітовому сорбенті C_{18} [38]. Застосування методу ВЕРХ із попередньою дериватизацією L-Arg *o*-фталевим альдегідом дає змогу досягти порогової чутливості до 0,3 мкг/мл (1,7 мкМ) [39].

Запропоновано визначення L-Arg за допомогою лазерної флуоресцентної спектроскопії [40], але цей підхід не набув широкого застосування на практиці, оскільки, як і більшість інших фізико-хімічних методів, потребує спеціального обладнання і операторів високої кваліфікації.

Для кількісного аналізу L-Arg розроблено ензиматичні методи з використанням трьох ензимів — аргінази, уреази та глутаматдегідрогенази [33] або октопіндегідрогенази [34]. Чутливість мультиензимного методу — 2 мкМ L-Arg (0,35 мкг/мл), лінійний діапазон визначення — до 0,47 мМ (81,8 мкг/мл) [33]. Недоліком цих методів є висока вартість аналізу, зумовлена використанням кількох комерційних ензимів.

На сьогодні відомо кілька типів біосенсорів на L-Arg, які відрізняються природою біоелемента (клітинний, ензимний), матеріалом електроду та характером перетворювача. Перші спроби визначення L-Arg клітинним біосенсором зробив Rechnitz [41], який закріпив шар клітин *Streptococcus faecium* на поверхні амонійселективного електрода (АСЕ). Згодом на поверхні газового чутливого електрода було іммобілізовано інші бактерії — *Streptococcus lactis* [42]. Розроблено інтегральні амперометричні біосенсиори для визначення L-амінокислот, які конструктивно складаються з кисневого електрода та газо-

Таблиця 1. Порівняльний аналіз фізико-хімічних методів визначення L-Arg

Метод		λ_{max} , нм	ϵ , $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$	Порогова чутливість		Лінійний діапазон		Час, хв
				мкг/мл	мМ	мкг/мл	мМ	
СФ	Сакагучі [20]	15,7	525	0,7	$4,0\cdot 10^{-3}$	1,0–45	0,006–0,26	40
	5-хлоро-7-йодо-ГХ [23]	57,4	440	0,9	$5,2\cdot 10^{-3}$	1,0–100	0,006–0,57	10
	Вогес-Проскауера [24]	3,07	535	0,8	$4,6\cdot 10^{-3}$	1,0–100	0,006–0,57	30
	Састрі [25]	13,0	440	0,3	$1,7\cdot 10^{-3}$	–	–	40
	ГХ [26]	66,0	500	1,2	$6,9\cdot 10^{-3}$	1,5–12	0,009–0,07	10
	<i>n</i> -Нітрофенілглюксаль [19]	–	475	–	–	0,03–0,33	$(0,2\text{--}2,0)\cdot 10^{-3}$	30
	ТГАХ [35]	–	540	1,5	$8,6\cdot 10^{-3}$	4,4–87,5	0,03–0,50	5
ХЛ	Натрію гіпоброміт [37]	–	–	0,02	$0,1\cdot 10^{-3}$	0,52–21,1	0,003–0,12	40
	Трис-(2,2-біпіридил)- рутеній [38]	–	–	$0,6\cdot 10^{-3}$	$3,4\cdot 10^{-6}$	$(0,8\text{--}1,5)\cdot 10^{-3}$	$(4,5\text{--}8,6)\cdot 10^{-6}$	30
Зонний електрофорез [28]		–	–	3,0	0,02	6,0–1 000	0,03–5,74	60
ВЕРХ, дериватизація [39]		–	–	0,3	$2,0\cdot 10^{-3}$	1,0–500	0,006–2,87	40

проникної мембрани. Для визначення L-Arg як біоселективний елемент такого сенсора застосовано аргініндекарбоксилазу [43].

У більшості ензимних біосенсорів як біоселективний елемент на L-Arg застосовують ензими аргінази та уреазу, що включені в желатинову мембрану та іммобілізовані на поверхні електрода. Для реєстрації сигналу використовують потенціометричні [41, 42, 44–49] (зазвичай на основі рН-залежних чутливих польових транзисторів та газових електродів), флуоресцентні оптоволоконні [50], кондуктометричні [51, 52] трансдуктори. Порівняльну характеристику відомих сенсорних систем для аналізу L-Arg наведено в табл. 2.

Потенціометричні ензимні сенсорні системи на основі ACE та кондуктометричні біосенсиори характеризуються високою чутливістю, операційною стабільністю і швидким часом відгуку на аналіт [48–52], але їхнім недоліком є низька селективність до низки амінокислот, зокрема глютамінової кислоти та L-лізину. Надзвичайно висока чутливість (10^{-9} М) досягається, згідно з даними Каур [50], для напівкількісного варіанта методу оцінювання аргініну з використанням нейлонових золь-гель-мембран, кон'югованих з аргіназою та уреазою. За кількісної реєстрації сигналу амонійселективним біоелектродом та модифікованим родаміном 6G оптоволоконним електродом (оптроном) чутливість оцінюється в нано- та пікомолях, відповідно [50].

Різновид кондуктометричної сенсорної системи із п'єзокристалом (SAW- або ПАХ-сенсор) функціонує завдяки явищам поверхневих акустичних хвиль і змін провідності [52]. Принцип дії такої системи полягає у вимірюванні частотного зсуву, який відбувається в результаті генерування іонів амонію в ході послідовних ензиматичних реакцій гідролізу L-Arg за участю аргінази та уреазу.

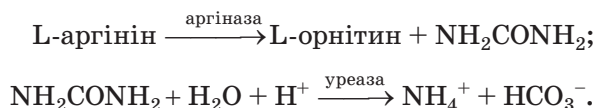
Таким чином, більшість існуючих методів визначення концентрації L-Arg потребує значних витрат часу, високоякісного обладнання, додаткової пробопідготовки та високої кваліфікації персоналу. Показано, що більшість із них має низку недоліків, а саме: низьку селективність (хімічні), громіздкість та високу вартість апаратури (фізико-хімічні), необхідність у використанні додаткових реагентів або ензимів (ензиматичні), недостатню стабільність (операційна та під час зберігання) і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин (більшість відомих біосенсорних методів). При цьому існуючі біосенсиори та сенсорні системи характеризуються низькою чутливістю (10^{-4} М) [48], вузьким лінійним діапазоном вимірюваних концентрацій аналіту (0,01–4,0 мМ), а також низькою селективністю [51]. Створення біосенсорів для визначення L-Arg може спростити та поліпшити систему моніторингу концентрації цього аналіту в медицині та харчовій промисловості. Нами здійснено дослідження щодо розроблення

Таблиця 2. Порівняльна характеристика різних типів біосенсорів для аналізу L-Arg [53]

Спосіб реєстрації сигналу	Біоелемент	Нижня межа визначення, Мм	Лінійний діапазон, мМ	Час відгуку (95%), хв	Стабільність, діб
Потенціометрія, ACE2 [41]	Бактерійні клітини	–	0,05–1,0	–	–
Потенціометрія, NH ₃ газовий електрод [42]	Бактерійні клітини	–	0,008–1,0	–	–
Потенціометрія, NH ₃ газовий електрод [44]	У/А ¹	–	0,03–3,0	5,0	–
Потенціометрія, рН-електрод [45]	У/А	–	0,025–0,3	10,0	–
Потенціометрія, рН-електрод [46]	У/А	–	0,01–1,0	–	–
Потенціометрія, рН-електрод [47]	У/А	–	0,1–1,0	–	–
Потенціометрія, ACE [48]	У/А	0,01	0,1–30,0	1,5–4,0	21
Потенціометрія, ACE [50]	У/А	$0,5 \cdot 10^{-6}$	10^{-6} – 10^3	0,7–5,0	60
Флуориметрія, оптоволоконний оптрод [50]	У/А	$0,5 \cdot 10^{-9}$	10^{-9} – 10^3	0,5–10,0	40
Кондуктометрія [51]	У/А	0,0005	0,01–4,0	2,0	45
Кондуктометрія ПАХ-сенсор [52]	У/А	0,002	0,002–0,4	1–13	–

Примітка. 1) У/А — уреазу і аргіназу; 2) ACE — амонійселективний електрод.

сенсорних систем для кількісного визначення L-Arg [53–55]. Основним біорозпізнавальним елементом сконструйованих біосенсорів була високоочищена аргіназа І печінки людини (далі — аргіназа), виділена нами з клітин рекомбінантних дріжджів *H. polymorpha* за власною технологією [56, 57]. Принцип дії запропонованих систем полягає у детектуванні амонійселективним електродом іонів амонію, які утворюються в результаті двох послідовних ензиматичних реакцій, каталізованих аргіназою та уреазою:



Сконструйований біоелемент потенціометричного біосенсора [54], що містив аргіназу (з активністю $900 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$) у комбінації з комерційною уреазою (КФ 3.5.1.5, тип IX із бобів, $26100 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$), дає позитивний відгук на L-Arg, причому спостерігається чітка лінійність (у напівлогарифмічній шкалі) потенціометричного сигналу в діапазоні концентрацій у межах від 0,50 до 10,0 мМ (рис. 1, а). Чутливість біосенсора становить 34,7 мВ на декаду ($R = 0,994$). 95% відгуку біосенсора досягається через 5 хв після внесення L-Arg. Величина позірної константи Міхаеліса-Ментен (K_m) для L-Arg — $4,7 \pm 0,4 \text{ мМ}$ (рис. 1, а).

Для дослідження можливості поліпшення деяких фізико-хімічних характеристик сконструйованого потенціометричного біосенсора аргіназу іммобілізували на золотих наночастинках (Au-НЧ) [58, 59].

На рис. 1, б наведено лінійний діапазон біосенсора з архітектурою біоселективного шару: аргіназа-Au-НЧ та уреаза [54]. Зафіксовано чітку лінійність потенціометричного відгуку в діапазоні концентрацій від 0,12

до 40,0 мМ. Чутливість біосенсора становить 26,2 мВ на декаду ($R = 0,998$), а величина позірної K_m для L-Arg — $1,1 \pm 0,2 \text{ мМ}$ (рис. 1, б). 95% відгуку біосенсора досягалось через 5 хв після внесення L-Arg. Таким чином, формування біоселективного шару аргіназа-Au-НЧ дало змогу знизити нижню межу визначення L-Arg від 0,5 мМ (рис. 1, а) до 0,12 мМ (рис. 1, б), підвищивши тим самим чутливість біосенсора в 4,2 раза. Ці результати свідчать про принципову можливість потенціометричного біосенсорного аналізу L-Arg за допомогою біензимного електрода, який складається з аргінази, іммобілізованої на металевих НЧ, та уреазі.

На основі аргінази, уреазі та електроосадженого поліаніліну (ПАН) нами вперше створено амперометричний біосенсор для кількісного визначення L-Arg та досліджено його фізико-хімічні характеристики [53]. Для конструювання чутливого до іонів амонію хемосенсора на ПАН-платформі використано Nafion як компенсатор негативного заряду, що виникає в процесі анодної полімеризації ПАН. Оптимальну кількість циклів (11) електроосадження ПАН на поверхні Pt-електрода з попередньо адсорбованим Nafion було обрано експериментально [60]. Створюючи біензимний амперометричний сенсор на L-Arg, біоселективний шар формували шляхом почергової іммобілізації комерційної уреазі та аргінази на поверхні Pt-електрода, модифікованого ПАН-Nafion [53]. Схематичне зображення принципу дії біосенсора подано на рис. 2. Принцип детектування L-Arg базувався на генеруванні в результаті послідовних ензиматичних реакцій іонів амонію, які прямують до поверхні шару ПАН-Nafion, спричиняючи відновлення плівки ПАН на поверхні Pt-електрода та змінюючи при цьому редокс-потенціал.

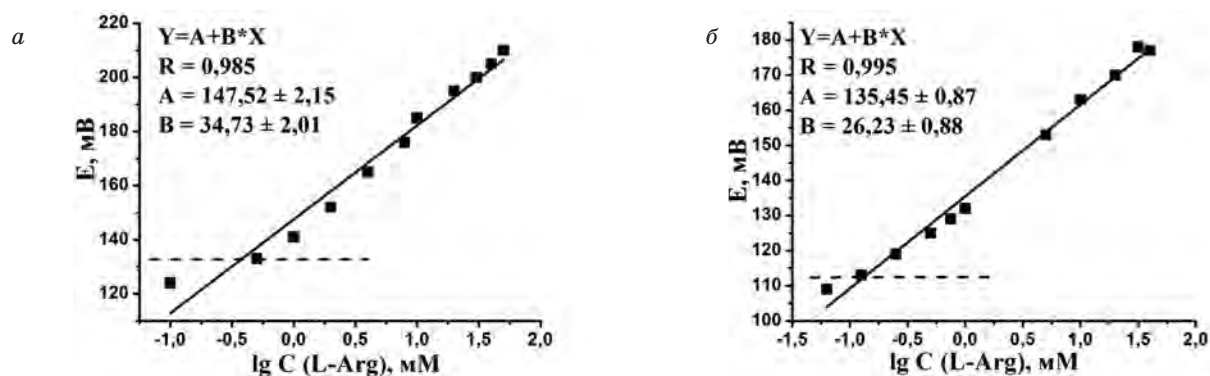


Рис. 1. Залежність потенціометричного відгуку від концентрації L-Arg для біензимного електрода, отриманого шляхом включення в 2%-ну кальційальгінатну мембрану (30 мМ Хепес-буфер, pH 7,5; 24 °C): аргінази та уреазі (а); аргінази-Au-НЧ та уреазі (б)

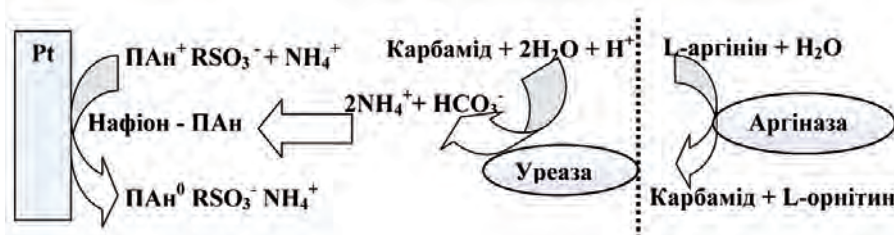


Рис. 2. Схема конверсії аналіту та перенесення електронів при функціонуванні амперометричного біосенсора на основі: аргінази I, уреази та ПАн-Nafion /Pt-електрода

Результати хроноамперометричного дослідження відгуку біензимного сенсора з архітектурою селективного шару аргіназа-уреаза-ПАн-Nafion/Pt-електрод на внесений L-Arg зображено на рис. 3. Лінійність відгуку сконструйованого біосенсора спостерігається в інтервалі концентрацій 0,07 мМ–0,6 мМ ($R = 0,999$). На основі концентраційної залежності, поданої на рис. 3, встановлено, що для біензимного сенсора максимальний струм насичення становить 1280 ± 160 нА (чутливість сконструйованого біосенсора — $110 \pm 1,3$ нА·мМ⁻¹·мм⁻²) з нижньою межею визначення L-Arg $3,8 \cdot 10^{-5}$ М.

Величина позірної K_m амперометричного біосенсора для L-Arg становить $1,28 \pm 0,29$ мМ. Швидкість розвитку відгуку сенсора на аналіт є високою: 50% відповіді в стаціонарному стані досягалася за 4 с, а 95% відповіді — на 10-ту секунду вимірювання. рН-оптимум створеного сенсора лежить в інтервалі 7,3–7,6. Біосенсор відзначається високою селективністю (позитивний сигнал, крім аргініну, лише на канаванін), широким діапазоном лінійності (0,07–0,6 мМ) та задовільною операційною стабільністю.

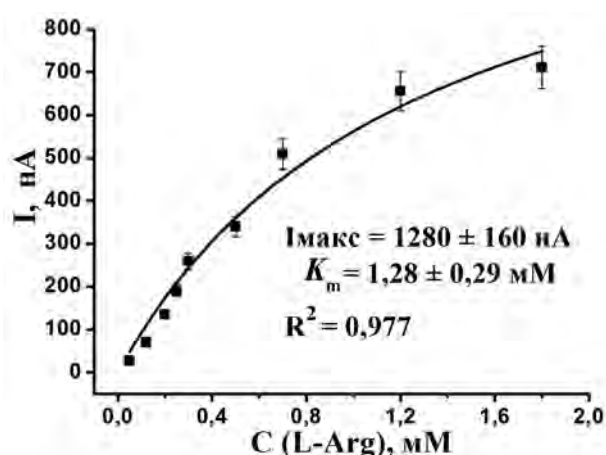


Рис. 3. Градувальний графік залежності сили струму від концентрації L-Arg для аргіназа-уреаза-ПАн-Nafion/Pt-електрода. Умови хроноамперометричного дослідження: потенціал –200 мВ; 30 мМ ФБ; рН 7,5; 22 °С

Нами розроблено ензиматичний метод кількісного визначення вмісту L-Arg з використанням аргінази [61, 62]. Метод ґрунтується на ензиматичному гідролізі L-Arg до L-орнітину та карбаміду (I стадія реакції, ензиматична). Карбамід під час нагрівання в кислому середовищі взаємодіє з 2,3-бутандіонмонооксидом (II стадія, хімічна) з утворенням кольорового продукту. Як результат, кількісно оцінити вміст L-Arg можна спектрофотометрично (Е-СФ метод) за оптичною густиною при $\lambda = 480$ нм [61] або ж флуоресцентно (Е-ФЛ метод) за інтенсивністю випромінювання при $\lambda = 510$ нм [62].

Досліджено кількісний склад робочого реагенту для проведення реакції та оптимізовано умови аналізу. Визначено, що лінійність калібрувальної кривої для Е-СФ-методу зберігається в межах 7 мкМ — 0,1 мМ у фотометрований пробі (рис. 4, а), нижня межа визначення L-Arg — 5 мкМ. Для Е-ФЛ-методу діапазон лінійності є набагато ширшим (57 нМ — 0,2 мМ у фотометрований пробі), а нижня межа визначення L-Arg (45 нМ) є нижчою (рис. 4, б).

Можливість практичного застосування всіх розроблених методів з використанням аргінази вивчали на зразках промислових фармацевтичних препаратів: «Тивортину» (Т), «Цитраргініну» (Ц), «Аміноплазмалу» 10% Е (А). Як свідчить порівняльний аналіз результатів визначення вмісту L-Arg у цих зразках різними методами [62], запропоновані біосенсорні та ензиматичні методи дають результати, які добре корелюють з показниками виробника й даними, одержаними за допомогою референтного методу (рис. 5). Кореляційний зв'язок має лінійний характер, а відповідні коефіцієнти кореляції (R) між результатами визначення вмісту L-Arg різними методами і даними виробника є близькими до 1 за високої достовірності таких зв'язків ($P < 0,006$). Відтворюваність результатів є високою під час аналізу всіх зразків методами 1–4: коефіцієнти варіації (КВ) не перевищують 2,2%, але є дещо нижчою, із КВ = 7,9%, у разі аналізу «Цитраргініну» потенціометричним біосенсором [61].

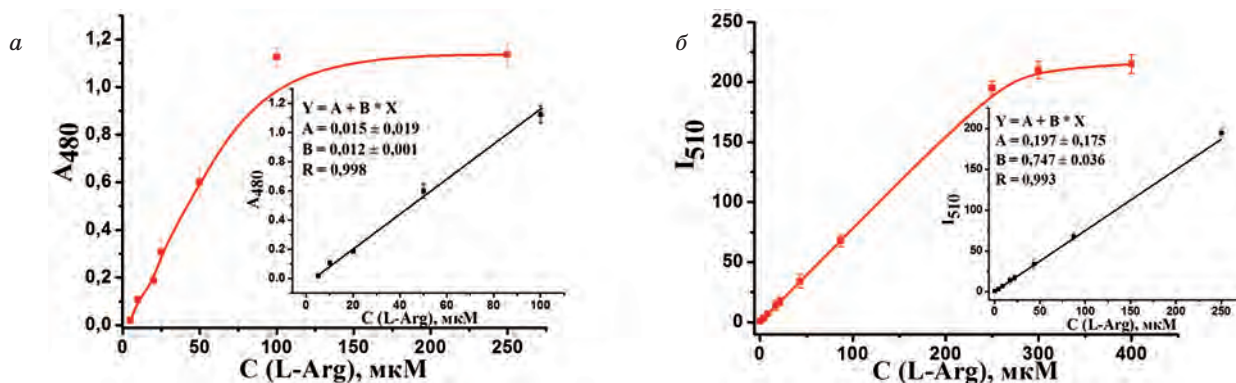


Рис. 4. Залежність оптичної густини (а) та інтенсивності випромінювання (б) реакційної суміші від концентрації L-Arg і діапазони лінійності Е-СФ- та Е-ФЛ-методів (вставки). Хвиля збудження флуоресценції — 380 нм. Концентрація аргінази І в кінцевій суміші — 1,5 Од/мл

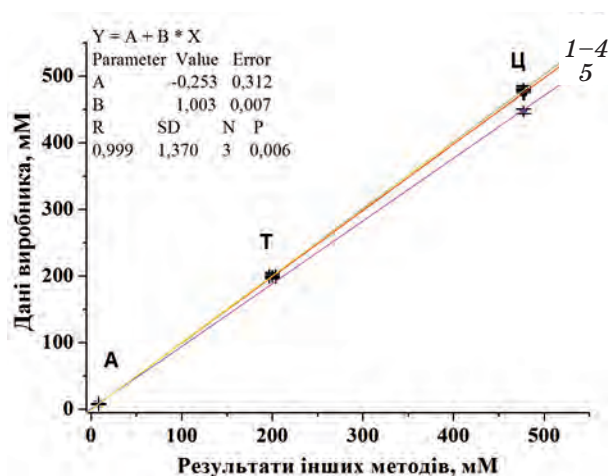


Рис. 5. Кореляційний зв'язок між даними виробника і результатами визначення вмісту аргініну (мМ) різними методами у зразках фармацевтичних препаратів А, Т і Ц (позначення в тексті).

Методи: референтний хімічний (1); ензиматичні, із СФ- (2) та ФЛ- (3) детекцією продукту реакції; біосенсорні, амперометричний (4) і потенціометричний (5).
Параметри лінійної регресії наведено для методу 5

REFERENCES

1. Marini J. C. Arginine and ornithine are the main precursors for citrulline synthesis in mice. *J. Nutr.* 2012, 142(3), 572–580.
2. Yokoro M., Suzuki M., Murota K., Otsuka C., Yamashita H., Takahashi Y., Tsuji H., Kimoto M. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NOS inhibitor, metabolized in rat erythrocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76(7), 1334–1342.
3. Yan X., Takahara M., Xie L., Gondo C., Setsu N., Oda Y., Takeuchi S., Tu Y., Moroi Y., Furue M. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *J. Dermatol. Sci.* 2011, 61(3), 211–215.
4. Brusilow S. W., Horwich A. L., Scriver C. R. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8-th ed. New York: McGraw-Hill. 2001, P. 1909–1963.
5. Rotondo R., Mastracci L., Piazza T., Barisione G., Fabbi M., Cassanello M., Costa R., Morandi B., Astigiano S., Cesario A., Sormani M. P., Ferlazzo G., Grossi F., Ratto G. B., Ferrini S., Frumento G. Arginase II is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression. *Int. J. Cancer.* 2008, 123(5), 1108–1116.
6. Kotamtaju S., Williams C. L., Kalyanaraman B. Statin-induced breast cancer cell death: role of

- inducible nitric oxide and arginase dependent pathways. *Cancer Res.* 2007, 67(15), 7386–7394.
7. Lam T. L., Wong G. K., Chong H. C., Cheng P. N., Choi S. C., Chow T. L., Kwok S. Y., Poon R. T., Wheatley D. N., Lo W. H., Leung Y. C. Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett.* 2009, 277(1), 91–100.
 8. Glazer E. S., Stone E. M., Zhu C., Massey K. L., Hamir A. N., Curley S. A. Bioengineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma. *Transl. Oncol.* 2011, 4(3), 138–146.
 9. Lam T. L., Wong G. K., Chow H. Y., Chong H. C., Chow T. L., Kwok S. Y., Cheng P. N., Wheatley D. N., Lo W. H., Leung Y. C. Recombinant human arginase inhibits the *in vitro* and *in vivo* proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011, 24(2), 366–376.
 10. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian system. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 158(3), 638–651.
 11. Hernandez C. P., Morrow K., Lopez-Barcons L. A., Zabaleta J., Sierra R., Velasco C., Cole J., Rodriguez P. C. Pegylated arginase I: a potential therapeutic approach in T-ALL. *Blood.* 2010, 115(25), 5214–5221.
 12. Leu S. Y., Wang S. R. Clinical significance of arginase in colorectal cancer, *Cancer.* 1992, V. 70, P. 733–736.
 13. Morales S. M. Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach. *An Sist. Sanit. Navar.* 2011, 34(3), 453–461.
 14. Zell J. A., Ignatenko N. A., Yerushalmi H. F., Ziogas A., Besselsen D. G., Gerner E. W., Anton-Culver H. Risk and risk reduction involving arginine intake and meat consumption in colorectal tumorigenesis and survival. *Int. J. Cancer.* 2007, 120(7), 459–468.
 15. Uthurry C. A., Lepe J. A. S., Lombardero J., Del Hierro G. J. R. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.* 2006, V. 94, P. 262–270.
 16. Spayd S. E., Wample R. L., Evans R. G., Stevens R. G., Seymour B. J., Nagel C. W. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 1994, V. 45, P. 34–42.
 17. Huang Z., Ough C. S. Effect of vineyard locations, varieties and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 1989, V. 40, P. 135–139.
 18. Parniak M. I., Lange G., Viswanatha T. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1983, 7(4), 267–276.
 19. Yamasaki R. B., Shimer D. A., Feeney R. E. Colorimetric determination of arginine residues in proteins by p-nitrophenylglyoxal. *Anal. Biochem.* 1981, 111(2), 220–266.
 20. Sakaguchi S. Colorimetric determination of arginine. *J. Biochem.* 1950, V. 5, P. 25–32.
 21. Goldschmidt M. C., Lockhart B. M. Simplified rapid procedure for determination of agmatine and other guanidino containing compounds. *Anal. Chem.* 1971, V. 43, P. 1475–1479.
 22. Casadebaig F., Dupin J. P., Mesnard P. The Sakaguchi reaction: Analytical developments and application to drug control. *Ann. Pharm. Fr.* 1979, 37(7–8), 313–324.
 23. Khramov V. A., Petrova L. M., Binova E. Modification of Sakaguchi by using 5-chloro-7-iodo-8-hydroxy quinoline. *Lab. Delo.* 1980, V. 11, P. 651–653.
 24. Micklus M. J., Stein I. M. The colorimetric determination of mono- and disubstituted guanidines. *Anal. Biochem.* 1973, V. 54, P. 545–553.
 25. Sastry C. S. P., Tummuru M. K. Spectrophotometric determination of arginine in proteins. *J. Food Chem.* 1994, V. 15, P. 257–260.
 26. Wang H., Liang X. H., Zhao R. X., Feng L. D., Li H. Spectrophotometric determination of arginine in grape juice using 8-hydroxyquinoline. *Agric. Sci. China.* 2008, 7(10), 1210–1215.
 27. Zhang L., Liu Y., Chen G. Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in Rhizoma Dioscoreae by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1043(2), 317–321.
 28. Narezhnaya E. V., Askalepova O. I., Nikashina A. A., Krukier I. I., Pogorelova T. N. Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary disk electrophoresis. *Zh. Anal. Chim.* 2010, 65(12), 1309–1312. (In Russian).
 29. Rong Y., Junru, H. Dayi C. Determination of L-arginine in drug by single sweep oscillography. *J. Sichuan Containing Educ. Coll. Med. Sci.* 1999, V. 12, P. 1219–1236.
 30. Alonso A., Almendral M. J., Baez M. D., Porras M. J., Alonso C. Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques. *Anal. Chim. Acta.* 1995, 308(1–3), 164–169.
 31. Chu K. M., Huang P. W., Pao Li H. Determination of arginine, asymmetrical dimethylarginine, and symmetrical dimethylarginine in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Med. Sci.* 2003, 23(4), 201–206.
 32. Mayoral J. G., Alarcón F. J., Martínez T. F., Barranco P., Noriega F. An Improved End-point Fluorimetric Procedure for the determination of low amounts of trypsin activity in biological samples using rhodamine-110-based substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, V. 160, P. 1–8.
 33. Mira O. R. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic End-Point analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49(2), 549–552.
 34. Gaede G., Grieshaber M. A rapid and specific enzymatic method for the estimation of L-arginine. *Anal. Biochem.* 1975, 66(2), 393–399.
 35. Mitić S. S., Milić G., Pavlović A. N., Tosic S. B., Velimirović D. S. Development and evaluation of a kinetic-spectrophotometric method for

- determination of arginine. *J. Chin. Chem. Soc.* 2007, V. 54, P. 47–54.
36. Cohen S. I. The determination of arginine released in human blood plasma after plasminogen activation. Use of a cation-exchange resin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1960, V. 86, P. 166–168.
 37. Gange M. E., Francis P. S., Costin J. W., Barnett N. W., Lewis S. W. Determination of arginine in dietary supplements. *J. Sci. Food Agric.* 2005, V. 85, P. 1217–1221.
 38. Costin J., Paul F., Lewis S. Selective determination of amino acids using flow injection analyses coupled with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 2003, 408(1), 67–77.
 39. Lobenhoffer J. M., Krug O., Bode-Boger S. M. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J. Mass Spectrom.* 2004, V. 39, P. 1287–1294.
 40. Notenboom C. D., Veerdonk F. C. G., Kamer J. C. A. A fluorescent modification of the Sakaguchi reaction on arginine. *J. Histochem.* 1967, V. 18, P. 117–121.
 41. Rechnitz G. A., Kobos R. K., Riechel S. J., Gebauer C. R. A bioselective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Anal. Chim. Acta.* 1977, V. 94, P. 357–365.
 42. Grobler S. R., Basson N., Van Wyk C. W. Bacterial electrode for L-arginine. *Talanta.* 1982, V. 29, P. 49–51.
 43. Botre F., Mazzei F. Interactions between carbonic anhydrase and some decarboxylating enzymes as studied by a new bioelectrochemical approach, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1999, 48(2), 463–467.
 44. Nikolelis D. P., Hadjiioannou T. P. Construction of an arginine enzyme electrode and determination of arginine in biological materials. *Anal. Chim. Acta.* 1983, V. 147, P. 33–39.
 45. Karacaoglu S., Timur S., Telefoncu A. Arginine selective biosensor based on arginase-urease immobilized in gelatin. *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.* 2003, V. 31, P. 357–363.
 46. Komaba S., Fujino Y., Matsuda T., Osaka K., Satoh I. Biological determination of Ag (I) ion and arginine by using the composite film of electroinactive polypyrrole and polyion complex. *Sens. Actuator. B. Chem.* 1998, V. 52, P. 78–83.
 47. Ivnitskii D. M., Rishpon J. Biosensor based on direct detection of membrane potential induced by immobilized hydrolytic enzymes. *Anal. Chim. Acta.* 1993, V. 282, P. 517–525.
 48. Koncki R., Walcerz I., Ruckruh F., Glab S. Bionzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination. *Anal. Chim. Acta.* 1996, V. 333, P. 215–222.
 49. Lvova L., Legin A., Vlasov Y., Cha G. S., Nam H. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem. *Sens. Actuator. B: Chem.* 2003, V. 95, P. 391–395.
 50. Kaur G. <http://hdl.handle.net/10603/2897>
 51. Saiapina O. Y., Dzyadevych S. V., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin O. P. Development and optimization of a novel conductometric bi-enzyme biosensor for L-arginine determination. *Talanta.* 2012, V. 92, P. 58–64.
 52. Liu D., Yin A., Ge K., Chen K., Nie L., Yao S. Enzymatic analysis of arginine with the SAW/conductance sensor system. *Enzym. Microb. Tech.* 1995, V. 17, P. 856–863.
 53. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Vus B., Gonchar M., Koval'chuk Ye. Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* 2012, 37(1), P. 46–52.
 54. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Koval'chuk Y., Gonchar M. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. *J. Mater. Sci. Eng. A.* 2011, V. 1, P. 819–827.
 55. Saiapina O. Y., Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P., Stasyuk N. Ye., Gayda G. Z., Gonchar M. V. Conductometric biosensor system for L-arginine determination. *Patent u201104302, MPK⁵¹ G01N 33/00 (2011.01). № 64025; declared 08.04.2011; published 25.10.2011; Bulletin № 20. (In Ukrainian).*
 56. Stasyuk N. Ye., Gayda G. Z., Koval'chuk Y. P., Gonchar M. V. Human arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and characterization. *Ukr. Biochem. J.* 2010, 82(6), 14–21. (In Ukrainian).
 57. Stasyuk N., Gayda G., Gayda A., Stasyuk O. V., Karpiak V. V., Koval'chuk Y. P., Gonchar M. V. The synthesis of affinity sorbents for purification of human arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. *Pratsi HTShA. Ser. "Khimiya i biokhimiya".* 2011, V. 28, P. 139–149. (In Ukrainian).
 58. Stasyuk N., Serkiz R., Gayda G., Koval'chuk Y. P., Gonchar M. V. Synthesis and characteristics of silver and gold nanoparticles for immobilization of recombinant arginase. *Visn. Lviv. Univ. Ser. "Khim.". 2011, V. 52, P. 261–267. (In Ukrainian).*
 59. Stasyuk N., Serkiz R., Mudry S., Gayda G., Zakalskiy A., Koval'chuk Y., Gonchar M., Nisnevich M. Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. *Nanotech. Develop.* 2011, V. 1:e3, P. 11–15.
 60. Stasyuk N. Ye., Gayda G. Z., Gonchar M. V., Koval'chuk Y. An amperometric chemosensor for ammonium ions detection. *Visnik Kharkiv. Nats.Un-tu. Ser. "Khim".* 2012, 21 (44), N 1026, P. 258–263. (In Ukrainian).
 61. Stasyuk N. Ye., Gayda G. Z., Gayda A. V., Gonchar M. V. A new enzymatic method for L-arginine assay. *Ukr. Biorg. Acta.* 2012, V. 1, P. 31–37. (In Ukrainian).
 62. Stasyuk N., Gaida G., Gonchar M. L-arginine assay with the use of arginase I. *Prikladnaya Biochem. i Microbiol.* 2013, 49(5), 529–534. (In Russian).

МЕТОДЫ АНАЛИЗА L-АРГИНИНА

Г. З. Гайда¹, Н. Е. Стасюк¹, М. В. Гончар^{1,2}¹Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов²Институт прикладной биотехнологии
и фундаментальных наук,
Жешувский университет, Польша

E-mail: galina_gayda@yahoo.com

Охарактеризованы современные физико-химические и энзиматические методы количественного определения L-аргинина. У большинства известных методов анализа L-аргинина есть недостатки: низкая селективность (химические), громоздкость и высокая стоимость оборудования (физико-химические), недостаточная стабильность (операционная и при хранении — биосенсоры), чувствительность к интерферирующему влиянию сопутствующих веществ. Поэтому разработка высокоселективных и чувствительных методов определения концентрации L-аргинина, в частности энзиматических, для усовершенствования системы мониторинга его уровня в клинической диагностике и пищевой промышленности является актуальной проблемой.

Представлены результаты собственных исследований по разработке и апробации эффективных энзиматических, в том числе биосенсорных, методов анализа L-аргинина с использованием аргиназы I печени человека, выделенной из клеток рекомбинантных дрожжей *Hansenula polymorpha* NCYC-495 *pGAP1-HsARG1 (leu2car1 Sc:LEU2)*. Аргиназа (КФ 3.5.3.1; L-аргинин-амидиногидролаза) играет решающую роль в гидролитическом расщеплении L-аргинина до L-орнитина и мочевины. Результаты апробации предложенных амперометрического и потенциометрического биосенсоров на основе аргиназы I, а также энзиматических методов со спектрофотометрической и флуоресцентной детекцией продукта продемонстрировали их эффективность для экспресс-анализа L-аргинина в фармацевтических препаратах. Разработанные методы могут быть перспективными для определения L-аргинина в пищевых продуктах (соках и винах), а также в сыворотке крови для диагностики и контроля при лечении некоторых видов онкологических заболеваний. Высокая селективность и простота предложенных методов позволят существенно упростить процедуру анализа и заменить используемые в настоящее время низкоселективные химические и дорогостоящие хроматографические методы.

Ключевые слова: анализ L-аргинина, биосенсоры, аргиназа I.

THE METHODS OF L-ARGININE ANALYSIS

G. Z. Gayda¹, N. E. Stasyuk¹, M. V. Gonchar^{1,2}¹Institute of Cell Biology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Lviv²Institute of Applied Biotechnology and Basic
Sciences, Rzeszow University, Poland

E-mail: galina_gayda@yahoo.com

Physicochemical and enzymatic methods of quantitative L-arginine estimation are described. A variety of detection procedures for L-arginine analysis have been developed. The majority of the frequently used approaches are marked by poor precision, low sensitivity and selectivity. These methods are time-consuming, expensive and require skilful labor techniques, so it needs to develop novel highly selective and sensitive ones for improvement of L-arginine monitoring in clinical diagnostics and food industry.

Experimental data concerning development and testing of effective enzymatic methods of L-arginine determination, including biosensors, are presented. All proposed methods are based on human liver arginase I isolated from the recombinant yeast strain *Hansenula polymorpha* NCYC-495 *pGAP1-HsARG1 (leu2car1 Sc:LEU2)*. Arginase I (EC 3.5.3.1; L-arginine amidinohydrolase), a key enzyme of the urea cycle, catalyses the conversion of L-arginine to ornithine and urea.

An effectiveness of the proposed enzymatic methods for L-arginine assay, as amperometric and potentiometric biosensors so as enzymatic methods with spectrophotometric and fluorometric detection of the product, was demonstrated on the samples of commercial pharmaceuticals.

These methods seem to be prospective for L-arginine analyses in food industry (juices and wines) and in medicine, for diagnostics and drug control in blood serum under treatment of cancer malignances. Hence, the proposed L-Arg selective and simple methods would be convenient and useful in the future for routine clinical analysis and food quality control.

Key words: L-arginine analyses, biosensors, arginase I.