

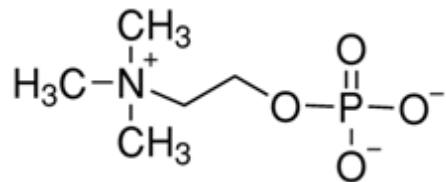
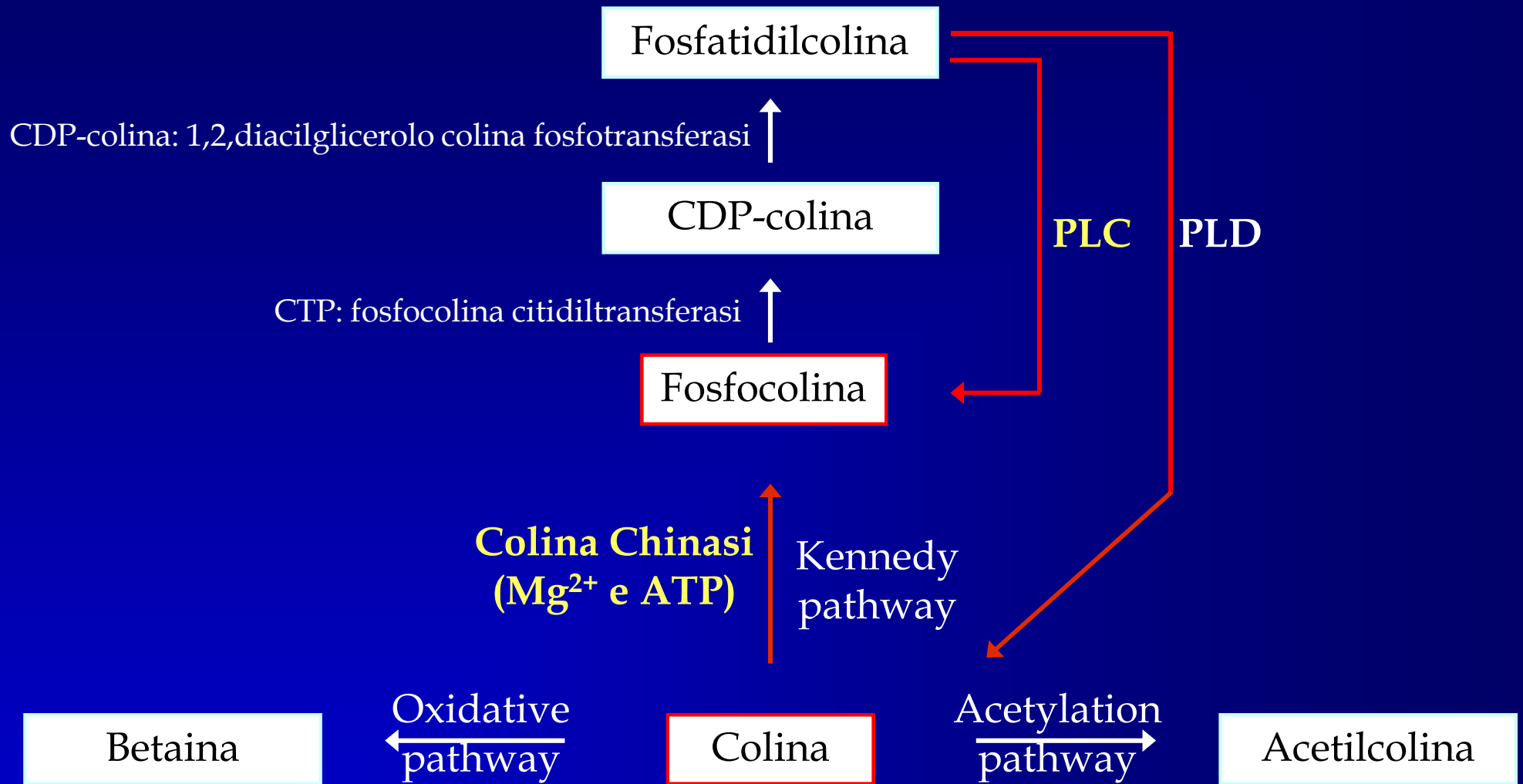


Università degli Studi della Basilicata
Dipartimento di Chimica

**UN BIOSENSORE A DOPPIO ELETTRODO
PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA
DI FOSFOCOLINA E COLINA IN FLUSSO**

Antonio Guerrieri, Rosanna Ciriello

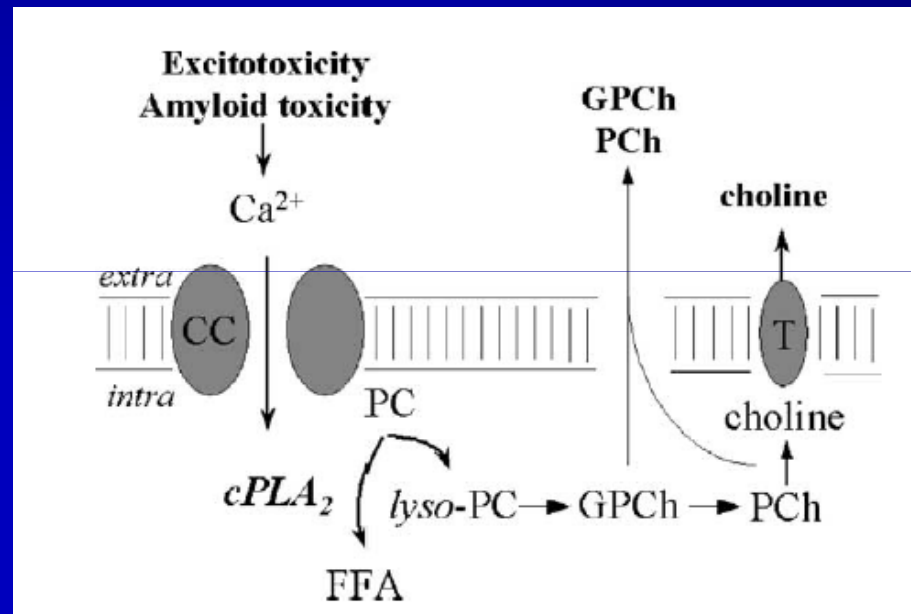
Metabolismo della colina



Metabolita idrosolubile della colina
Precursore della fosfatidilcolina

Accumulo di fosfocolina

- ➔ Carcinoma mammario (PCh valutata nell'ordine di 5-16 volte rispetto alle cellule epiteliali normali)
 - aumento della via biosintetica governata dalla colina chinasi
 - aumento delle vie cataboliche governate da fosfolipasi specifiche
- ➔ Disturbi neurodegenerativi (PCh nel fluido cerebrospinale di soggetti affetti da Morbo di Alzheimer superiore del 50%*)



* A. Walter, U. Korth, M. Hilgert, J. Hartmann, O. Weichel, M. Hilgert, K. Fassbender, A. Schmitt, J. Klein
Neurobiology of Aging 25 (2004) 1299-1303

TECNICHE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA PCh

→ Metodi Radioenzimatici (fosforilazione radioattiva mediante $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$)

→ Metodi Cromatografici

HPLC – ECDⁱ

→ NMR multinucleare (^1H NMR, ^{31}P NMR, ^{13}C NMR, ^2H NMR)

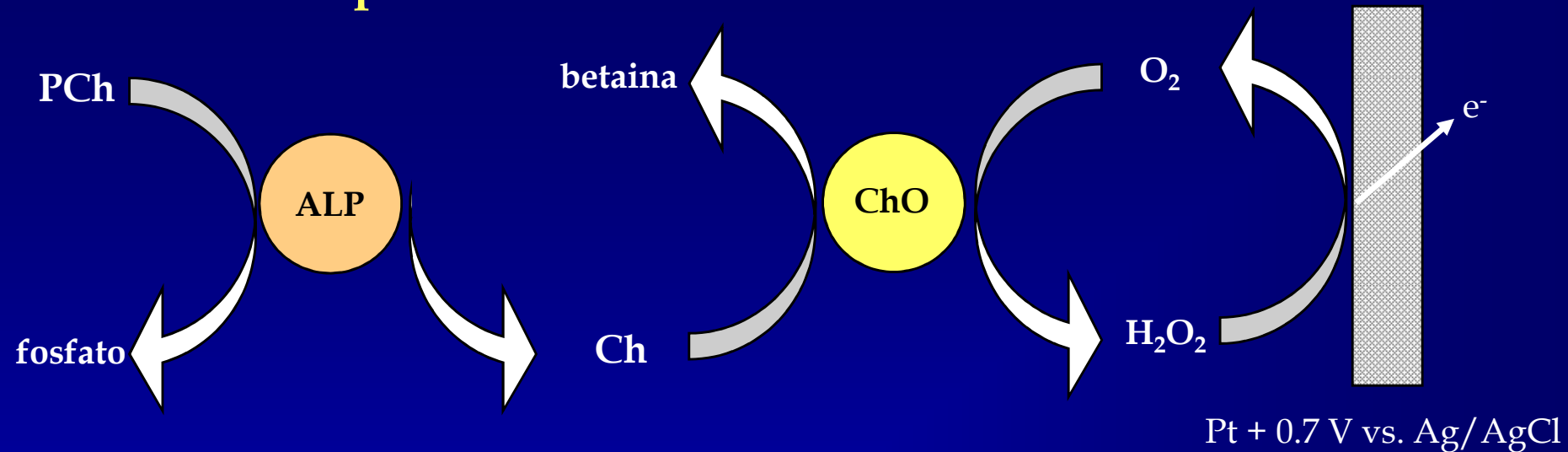
^1H NMR: determinazione della concentrazione totale della Ch e dei suoi metaboliti (difficoltà a differenziare i protoni metilici $[-\text{N}(\text{CH}_3)_3]$)

^{31}P edited ^1H NMRⁱⁱ (accoppiamento scalare tra il nucleo ^{31}P ed i protoni $\text{CH}_2\text{-O}$): possibilità di distinguere *ex vivo* la PCh dalla GPCh; buona risoluzione ma scarsa sensibilità.

i. S. Murai, H. Saito, R. Shirato, T. Kawaguchi *J of Pharmacological and Toxicological Methods* 46 (2002) 103-109

ii. N. M. Loening, A. M. Chamberlin, A. G. Zepeda, R. G. Gonzalez, L. L. Cheng *NMR in Biomedicine* 18 (2005) 413-420

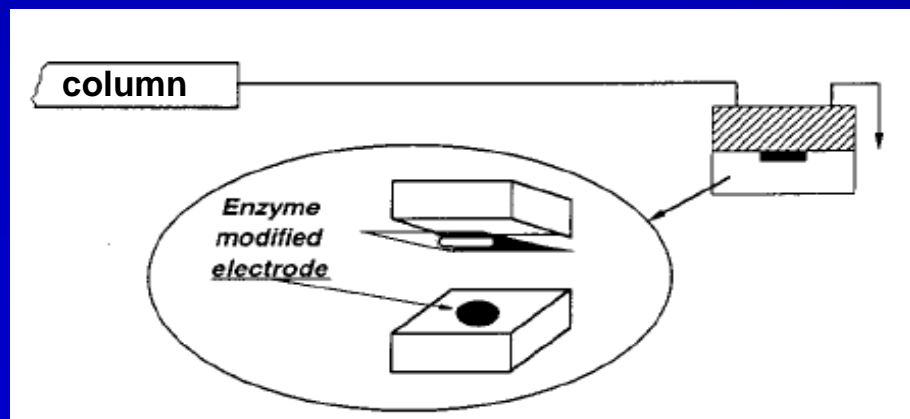
Biosensore a colina ossidasi/fosfatasi alcalina immobilizzate per la determinazione della PCh



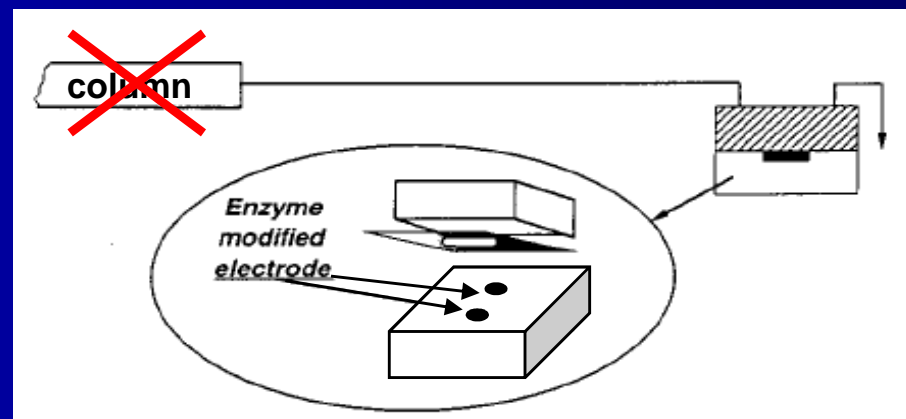
Determinazione simultanea di Ch e PCh

Analisi integrata di Ch e PCh

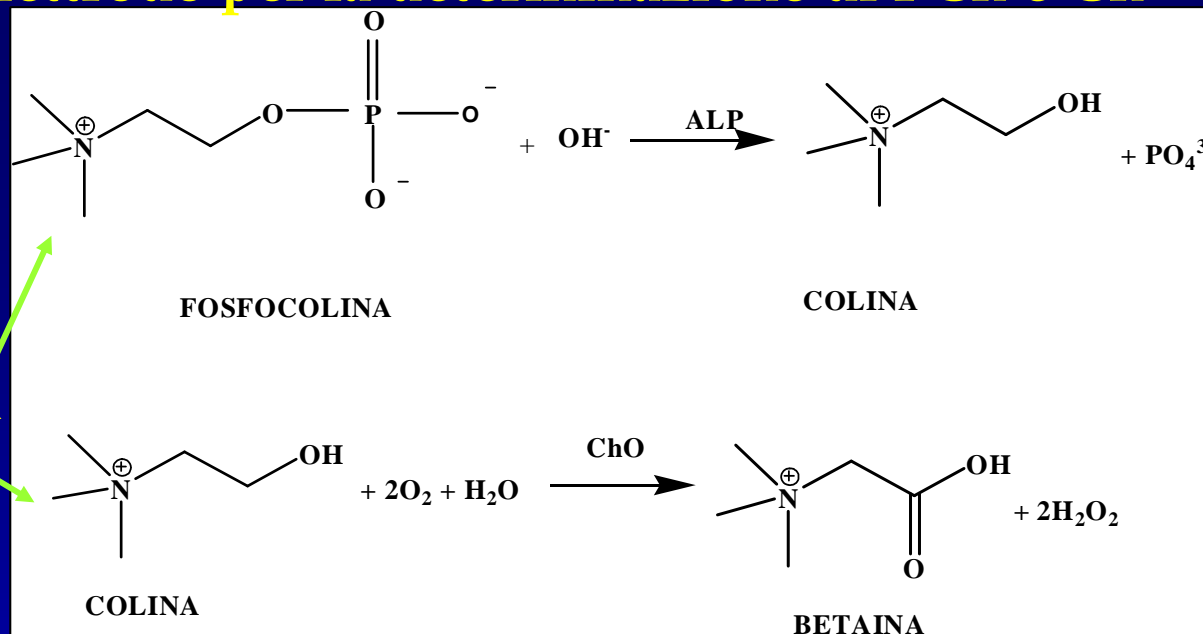
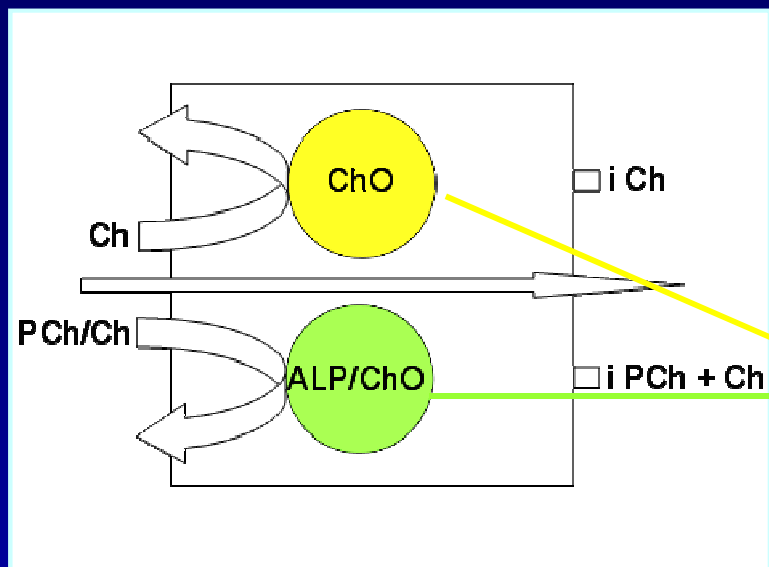
1) HPLC - Pt/ALP-ChO



2) FIA – biosensore a doppio elettrodo

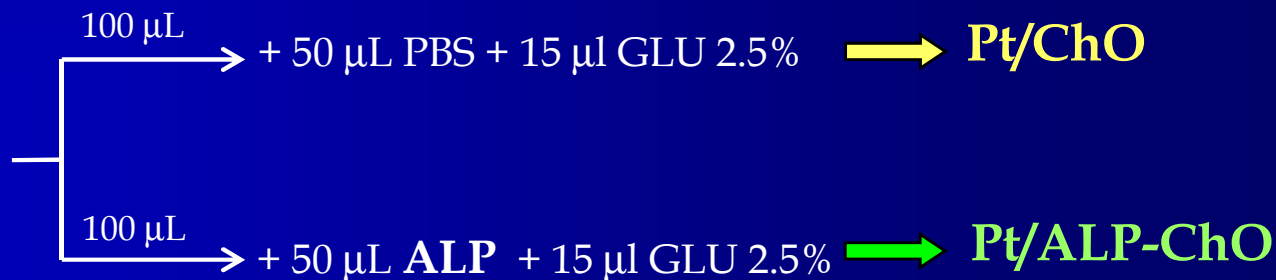


Biosensore a doppio elettrodo per la determinazione di PCh e Ch



Immobilizzazione enzimatica mediante co-crosslinking

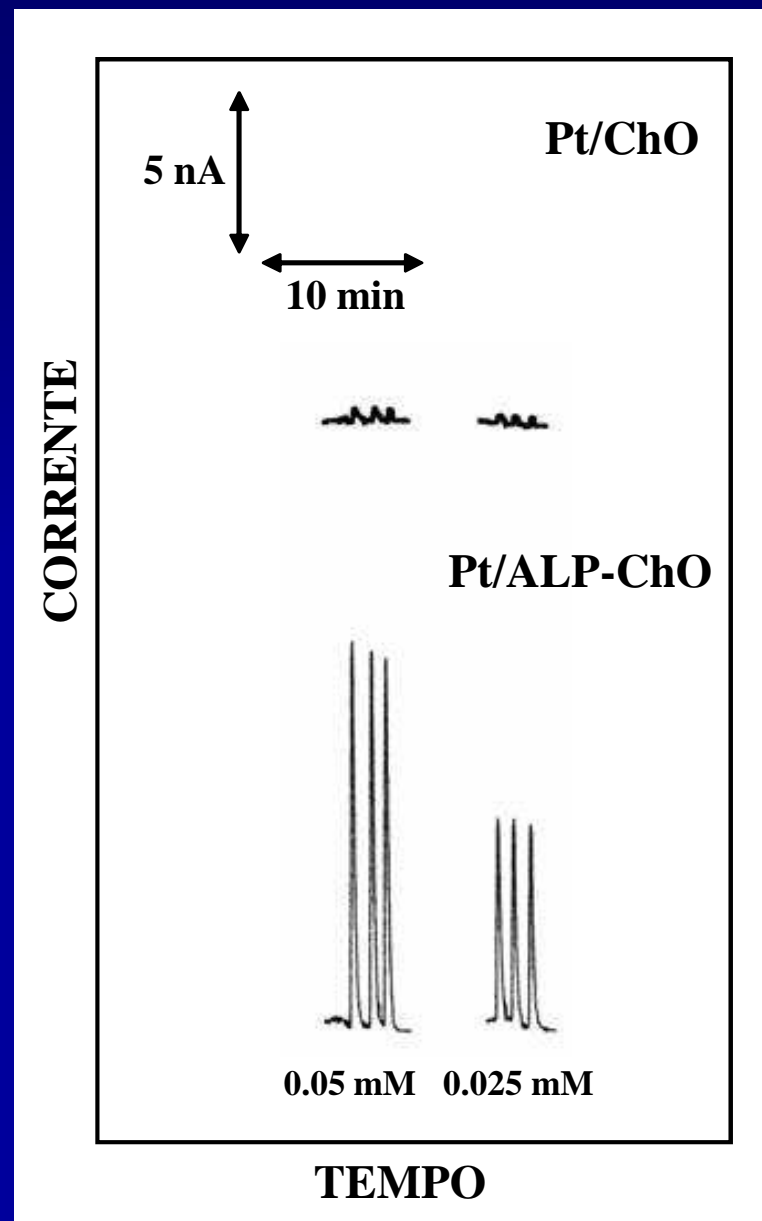
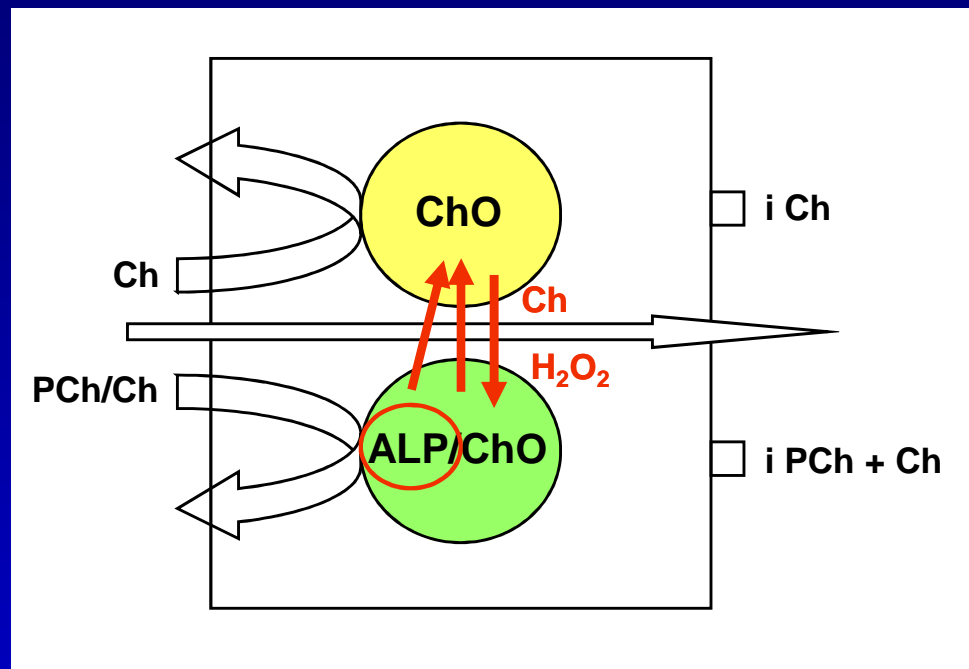
200 μL di PBS pH 6.5 I 0.1 M:
 - 16 mg di BSA
 - 1 mg di ChO



ChO from *Alcaligenes Species* (12U/mg solid)

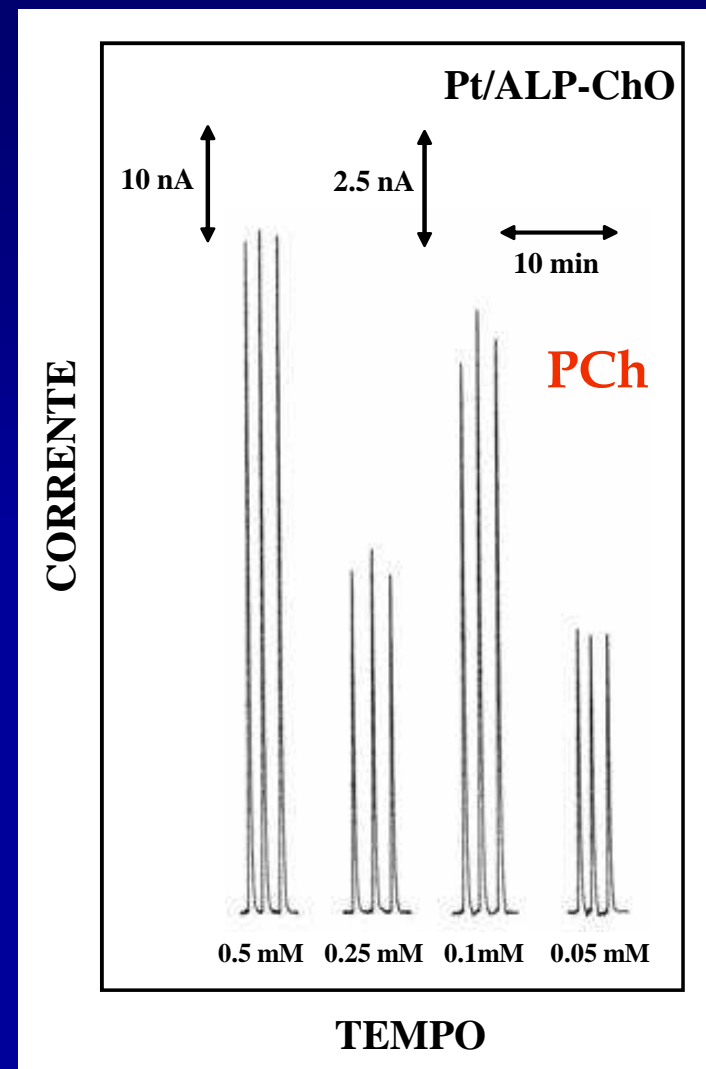
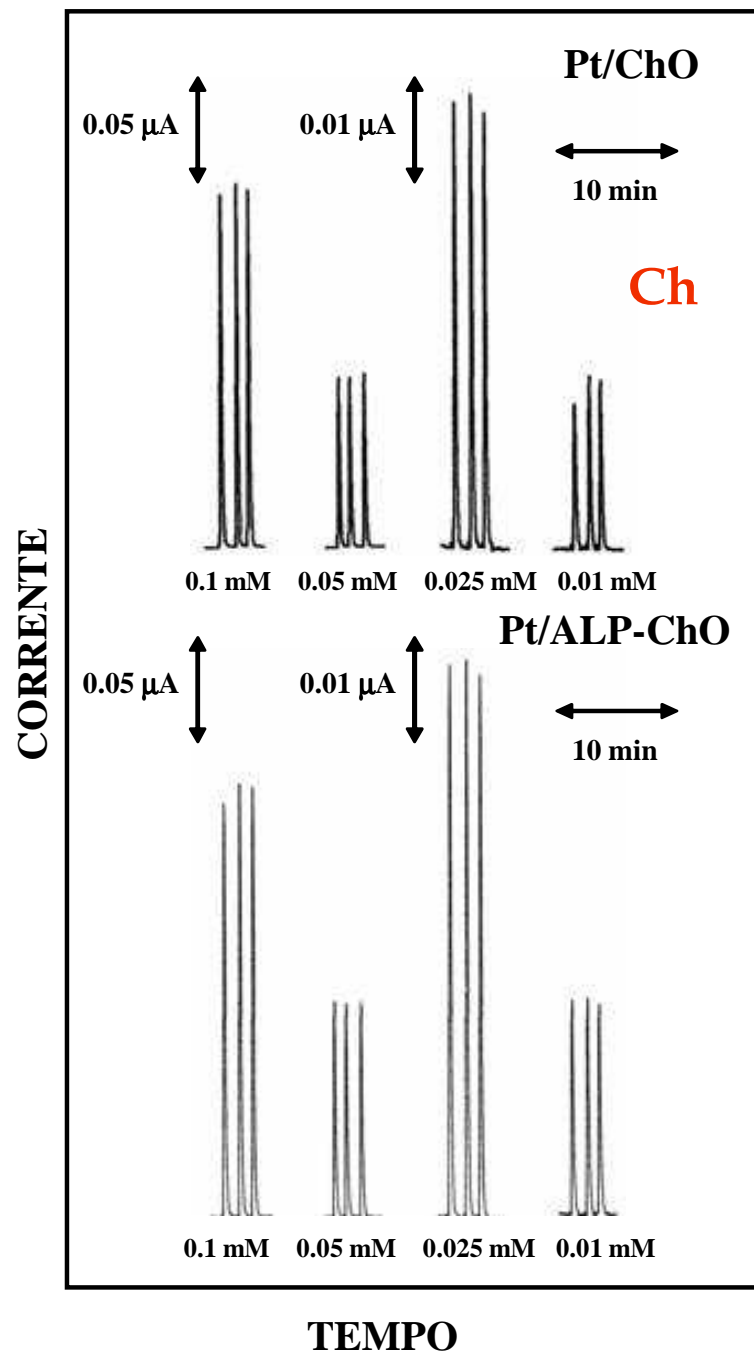
ALP from bovine intestinal mucosa (22990 U/mL)

Determinazione simultanea di PCh e Ch: assenza di effetti di cross-talk



Velocità di flusso 1 ml/min; elettrolita di supporto tampone borato pH 9.0, I 0.1 M; volume di iniezione 20 μ l; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl

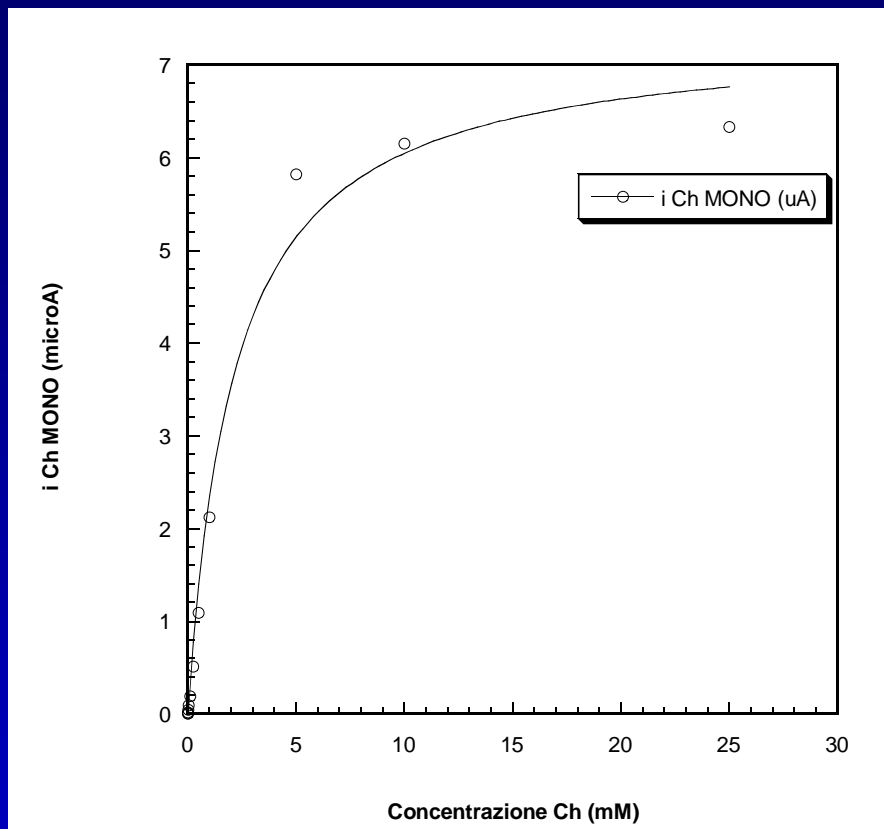
Comportamento dei singoli analiti



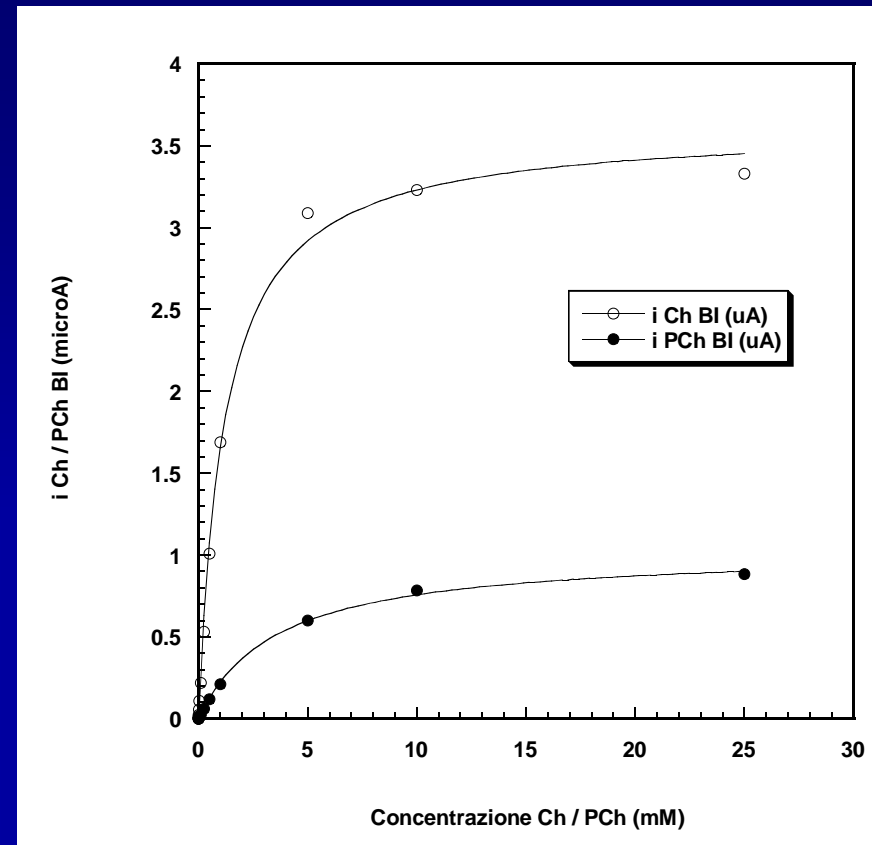
Velocità di flusso 1 ml/min; elettrolita di supporto tampone borato pH 9.0, I 0.1 M; volume di iniezione 20 μl ; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl

Curve di calibrazione di Ch e PCh sui singoli elettrodi

Pt/ChO

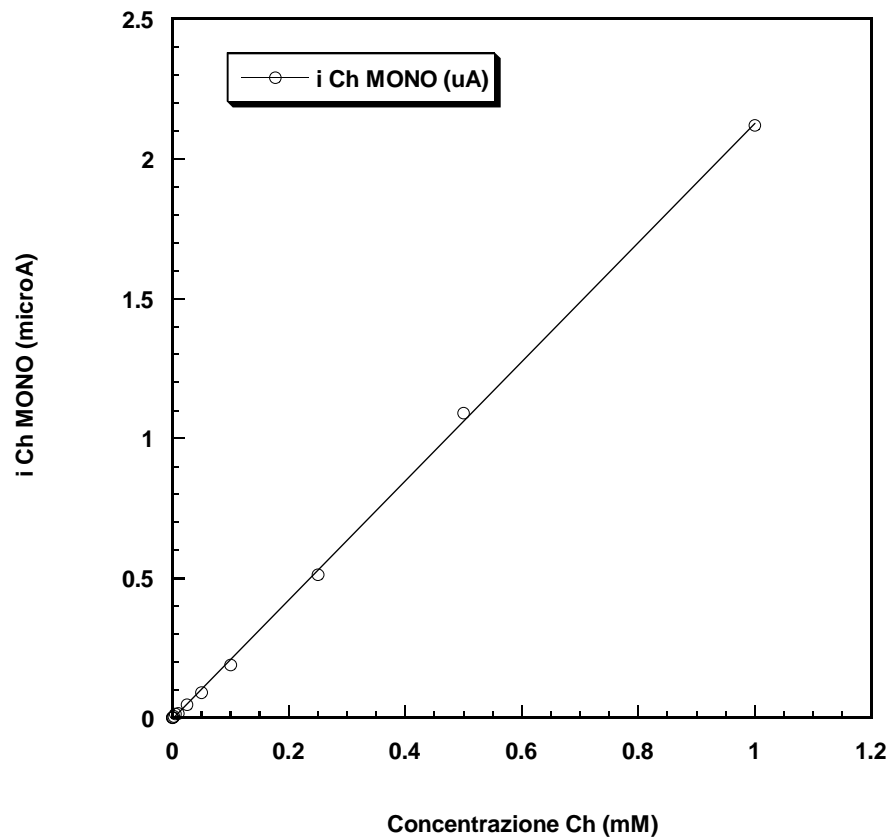


Pt/ALP-ChO

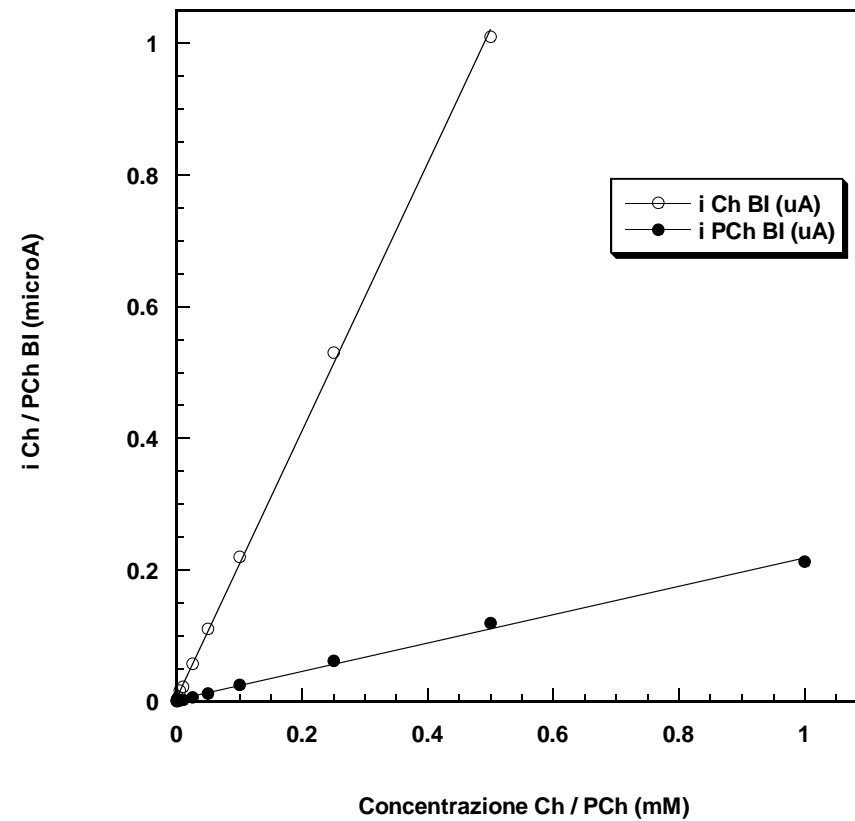


ANALITA	SENSORE	K'm (mM)	I'max (μA)
PCh	Pt/ALP-ChO	3.6 ± 0.2	1.03 ± 0.02
Ch	Pt/ALP-ChO	1.2 ± 0.1	3.6 ± 0.1
Ch	Pt/ChO	2.1 ± 0.3	7.3 ± 0.3

Pt/ChO

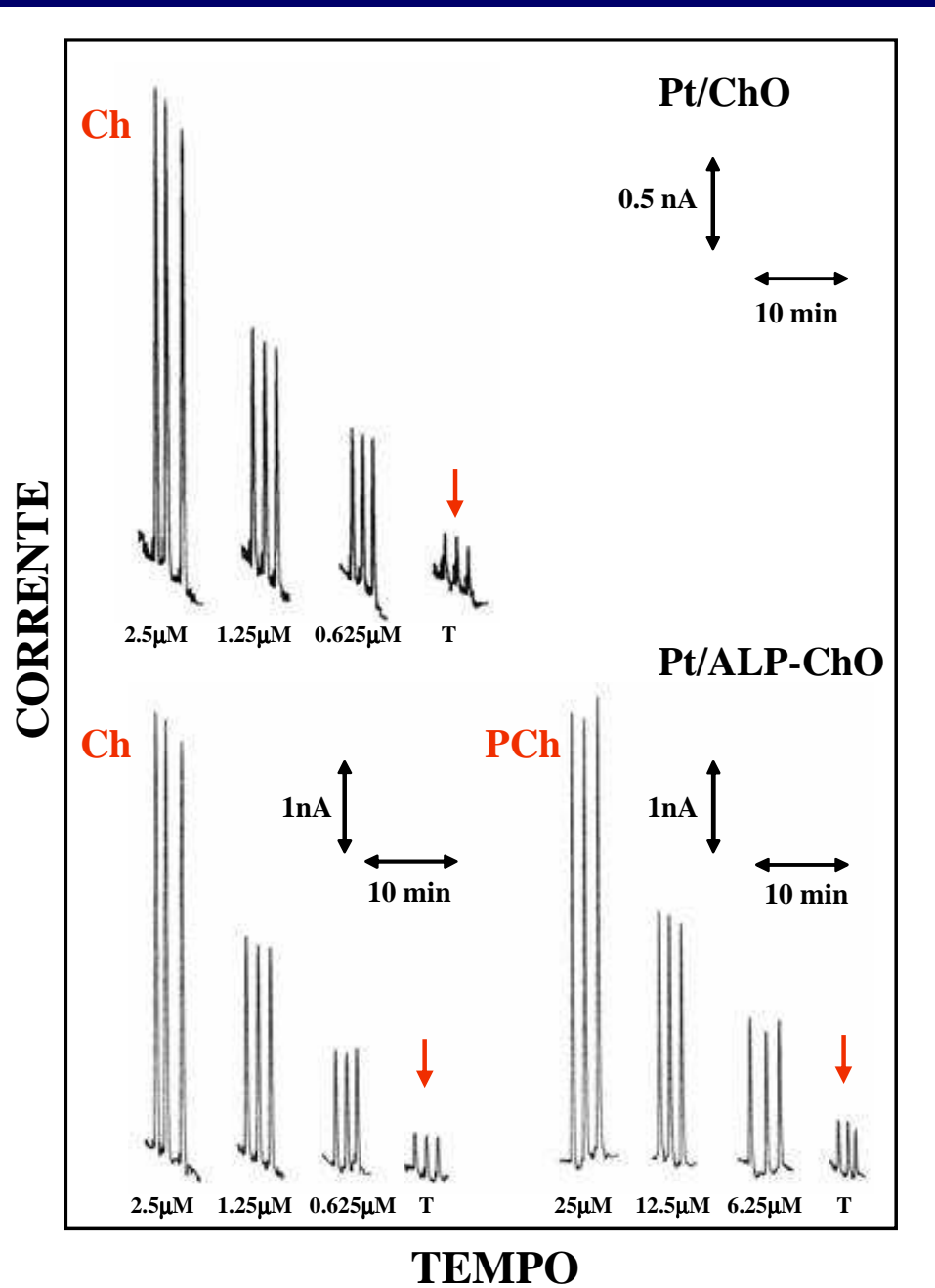


Pt/ALP-ChO



ANALITA	SENSORE	SENSIBILITÀ ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	INTERVALLO LINEARE (μM)
PCh	Pt/ALP-ChO	0.216	7 - 1000
Ch	Pt/ALP-ChO	2.03	0.7 - 1000
Ch	Pt/ChO	2.13	0.7 - 1000

Limite di rivelabilità



ANALITA	SENSORE	LOD (μM) (S/N=3)	LOD (pmoli iniettate)
PCh	Pt/ALP-ChO	6.9	139
Ch	Pt/ALP-ChO	0.68	13.6
Ch	Pt/ChO	0.65	13.0

Velocità di flusso 1 ml/min; elettrolita di supporto tampone borato pH 9.0, I 0.1 M;
volume di iniezione 20 μl ; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl

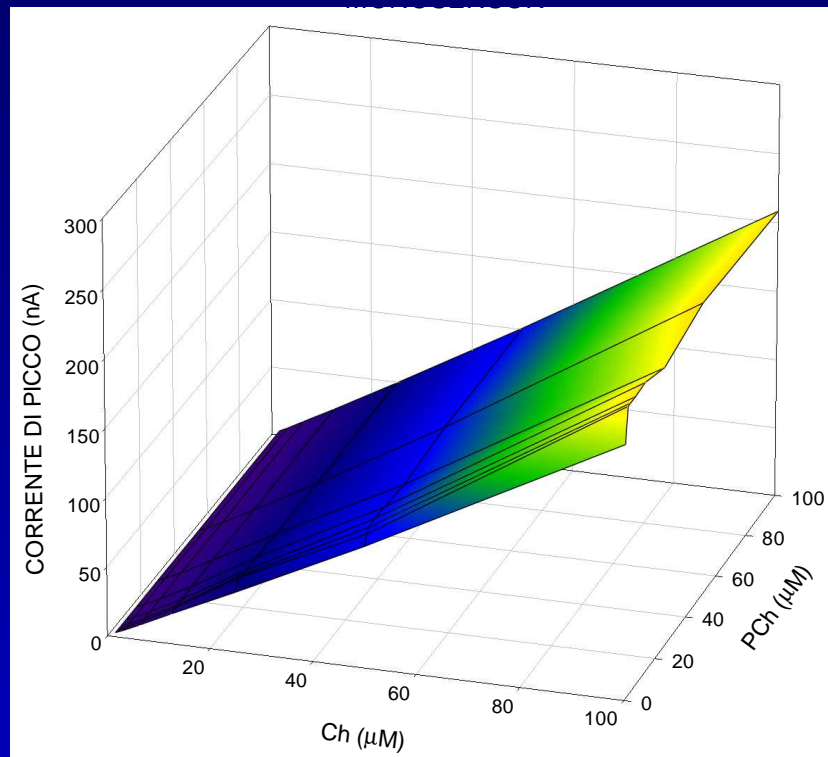
Determinazione simultanea di Ch e PCh

$$I_{\text{BI}} = K_1 [\text{Ch}] + K_2 [\text{PCh}] \quad (1)$$

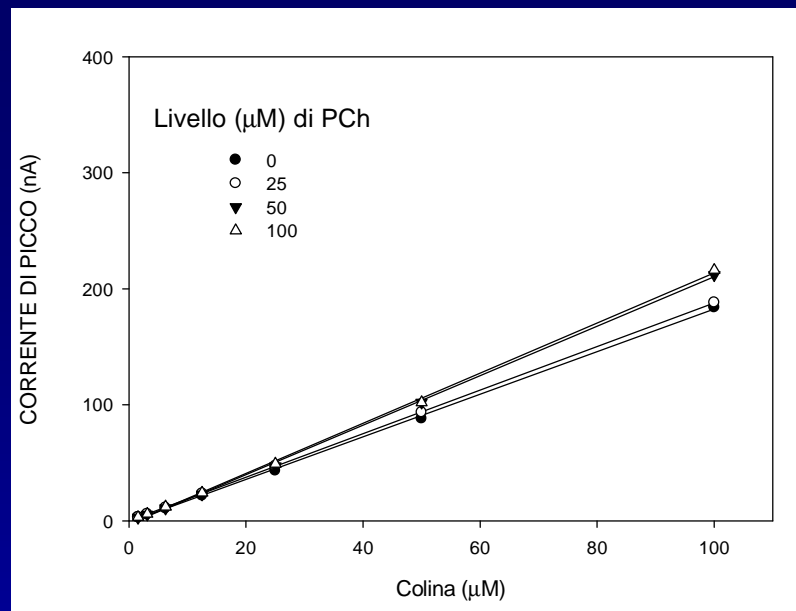
$$I_{\text{MONO}} = K_3 [\text{Ch}] \quad (2)$$

I_{BI} e I_{MONO} :	responsi in corrente su Pt/ALP-ChO (BI) e Pt/ChO (MONO);
$[\text{Ch}]$ e $[\text{PCh}]$:	concentrazioni dei due analiti;
K_1 e K_3 :	sensibilità di Ch su Pt/ALP-ChO (BI) e Pt/ChO (MONO);
K_2 :	sensibilità di PCh su Pt/ALP-ChO (BI)

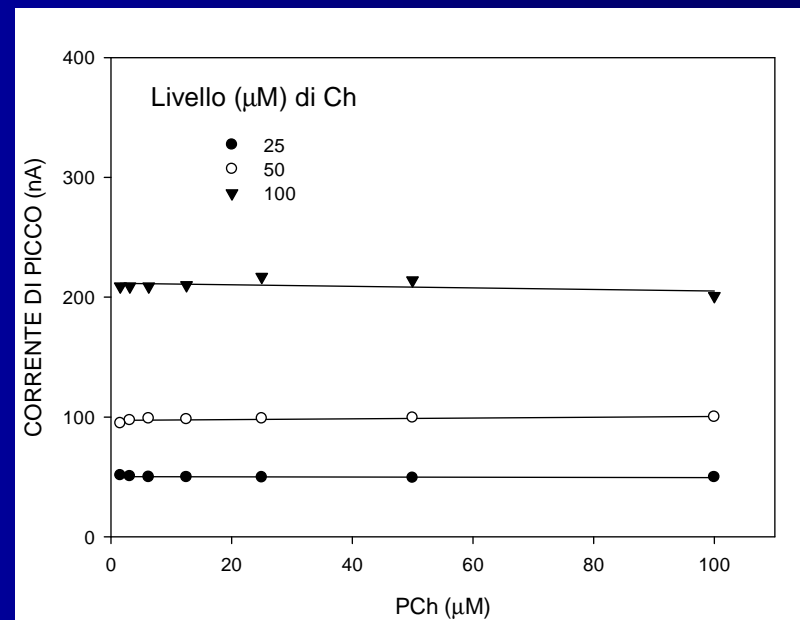
Pt/ChO (intervallo lineare di concentrazione)



Validità di impiego dell'equazione
 $I_{\text{MONO}} = K_3 [\text{Ch}]$

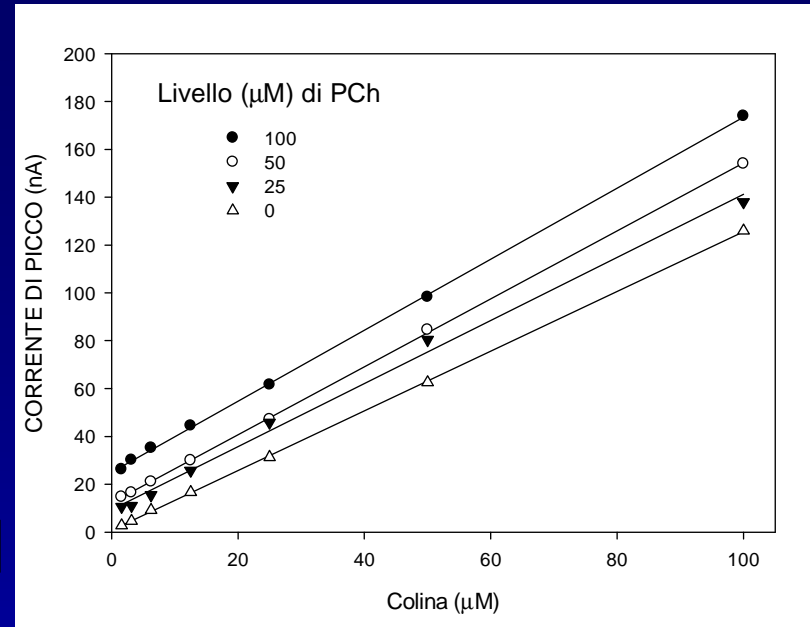
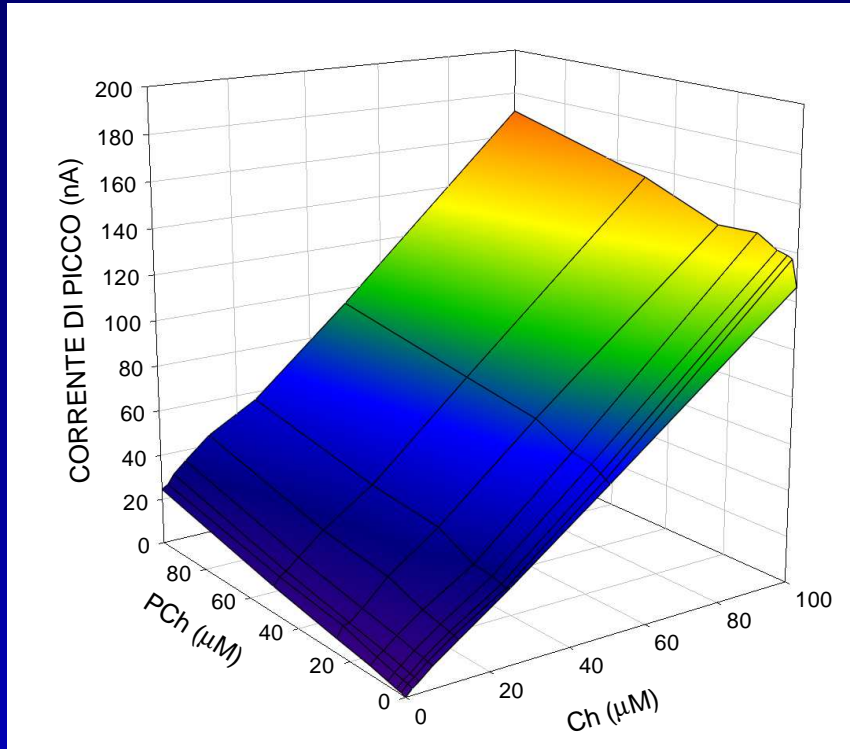


dependenza lineare dalla concentrazione di Ch

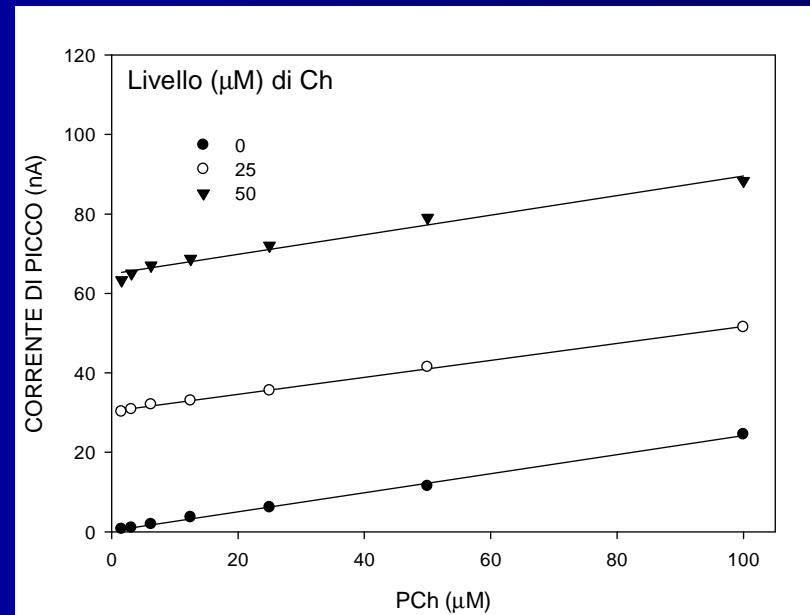


indipendenza dalla concentrazione di PCh

Pt/ALP-ChO (intervallo lineare di concentrazione)



dependenza lineare dalla concentrazione di Ch



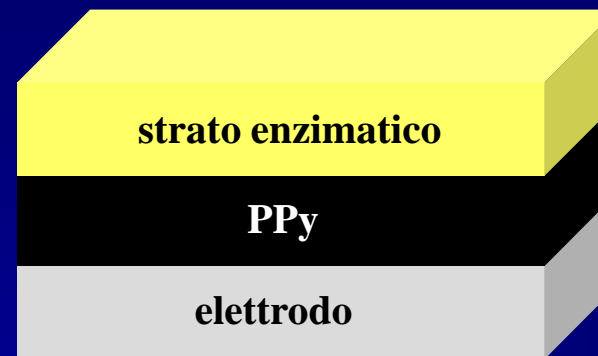
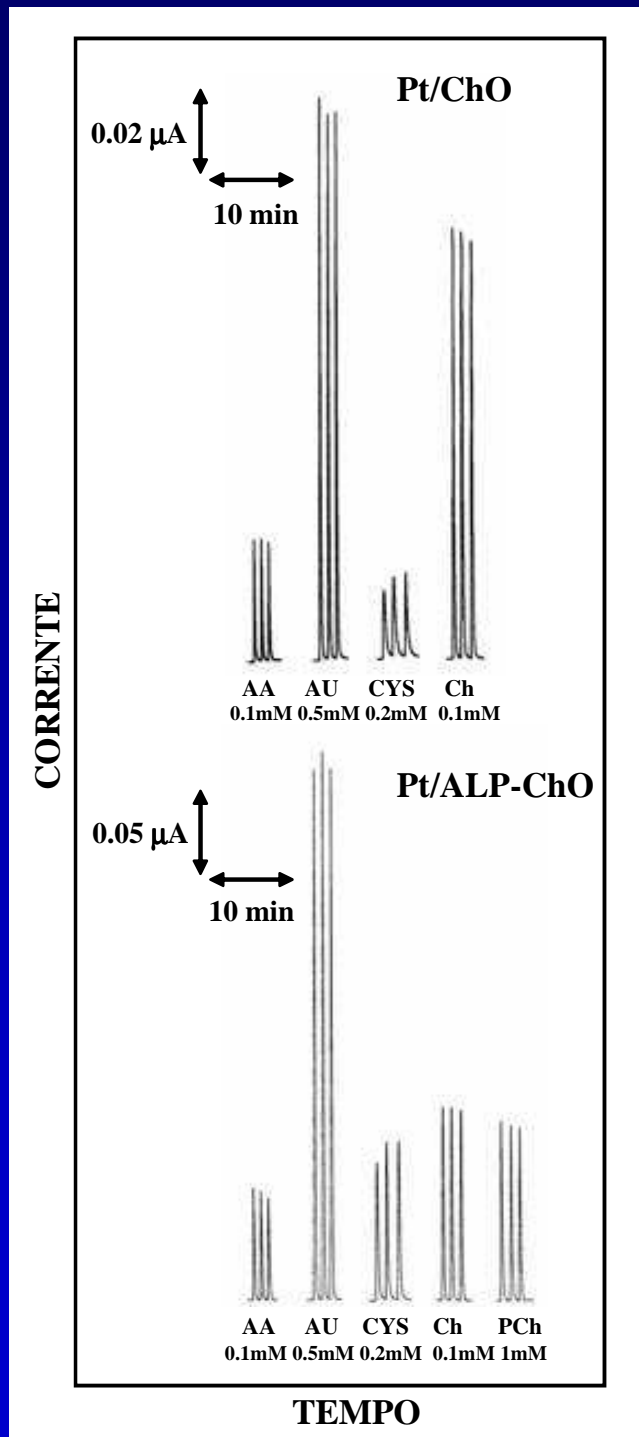
dependenza lineare dalla concentrazione di PCh

Validità di impiego dell'equazione
 $I_{BI} = K_1 [Ch] + K_2 [PCh]$

$$I_{\text{BI}} = K_1 [\text{Ch}] + K_2 [\text{PCh}] \quad (1)$$

$$I_{\text{MONO}} = K_3 [\text{Ch}] \quad (2)$$

Selettività della determinazione di Ch e PCh



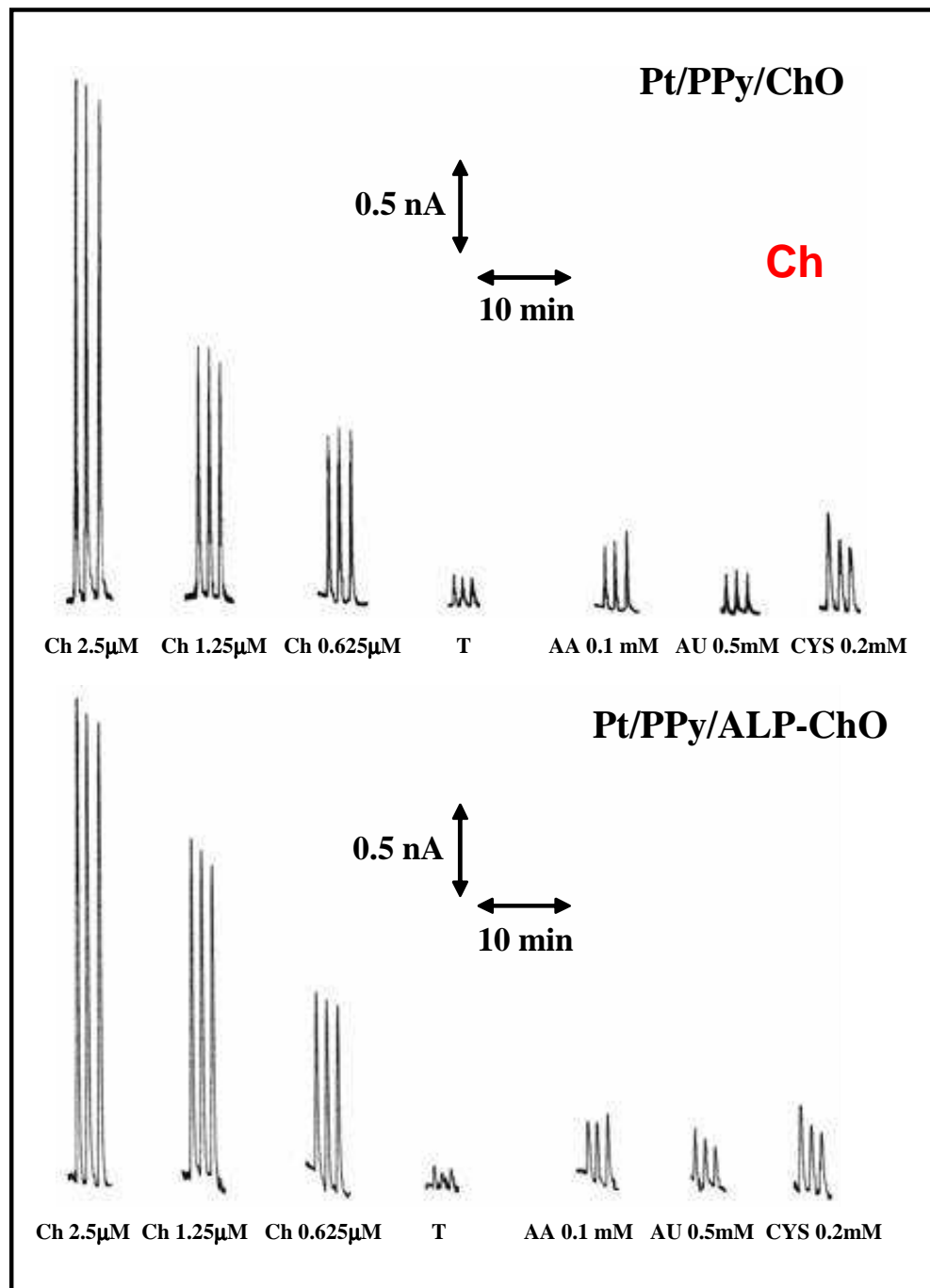
ELETTROSINTESI DEL POLIPIRROLO

- Soluzione di deposizione: pirrolo 0.4 M in KCl 0.1 M
- Potenziale applicato: 0.7 V vs SCE
- Carica di deposizione: 300 mC/cm²

OVEROSSIDAZIONE

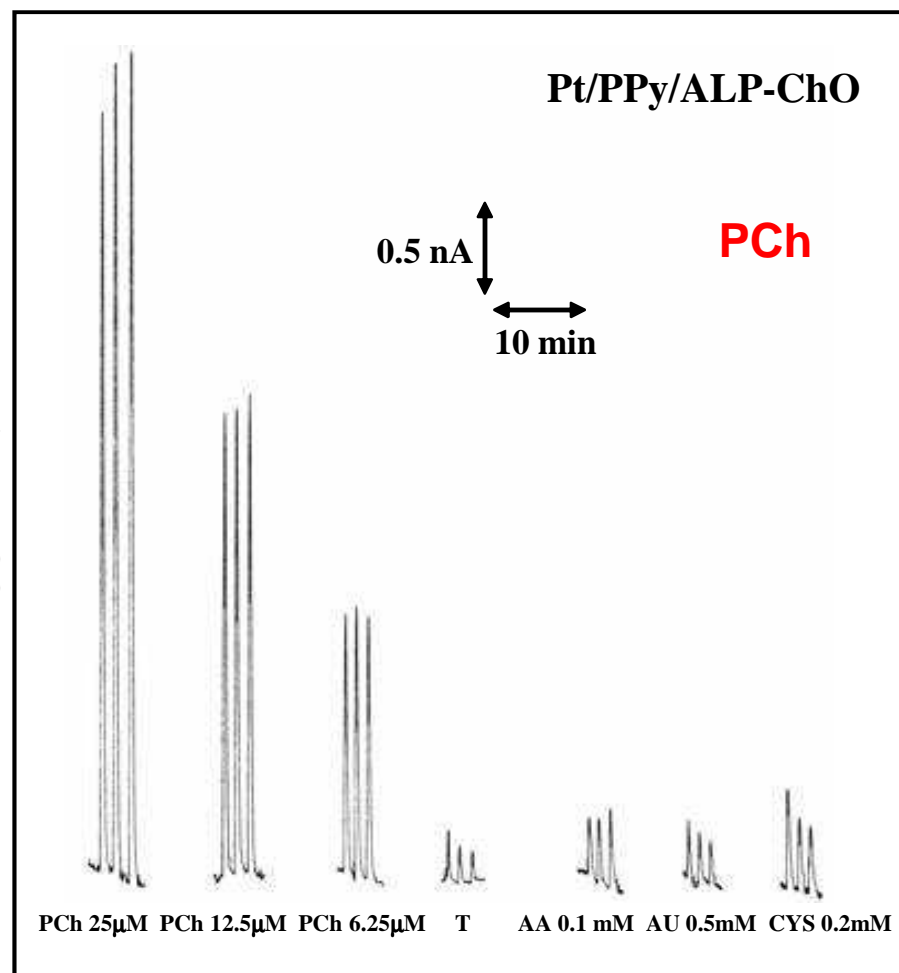
- Potenziale applicato: +0.7 V vs Ag/AgCl
- Soluzione elettrolitica: tampone fosfato (pH 7.0)
- Durata: 6-7 ore fino al raggiungimento di un valore di corrente stazionario e prossimo allo zero

CORRENTE



TEMPO

CORRENTE



TEMPO

Velocità di flusso 1 ml/min; elettrolita di supporto tampone borato pH 9.00, I 0.1 M; volume di iniezione 20 μ l; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl

ANALITA	SENSORE	SENSIBILITÀ ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	INTERVALLO LINEARE (μM)
<i>1 ml/min</i>			
PCh	Pt/PPy/ALP-ChO (Pt/ALP-ChO)	0.197 (0.216)	3 – 1000 (7 – 1000)
Ch	Pt/ PPy/ALP-ChO (Pt/ALP-ChO)	1.30 (2.03)	0.3 – 1000 (0.7 – 1000)
Ch	Pt/ PPy/ChO (Pt/ChO)	1.39 (2.13)	0.3 – 1000 (0.7 – 1000)



Available online at www.sciencedirect.com



Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 1710–1718

**BIOSENSORS
&
BIOELECTRONICS**

www.elsevier.com/locate/bios

Electrosynthesized poly(pyrrole)/poly(2-naphthol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaneous determination of acetylcholine and choline by a dual electrode amperometric biosensor

A. Guerrieri^{b,*}, V. Lattanzio^a, F. Palmisano^a, P.G. Zambonin^a

^a Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari, Via Orabona, 4-70126 Bari, Italy

^b Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, Via N. Sauro, 85-85100 Potenza, Italy

CONCLUSIONI

- ✿ Sviluppo e studio di un originale biosensore a doppio elettrodo per la determinazione simultanea di Ch e PCh in campioni biologici.
- ✿ Il biosensore è stato preparato immobilizzando, mediante la tecnica del co-crosslinking, ChO e una opportuna miscela di ChO e ALP sulla superficie degli elettrodi di Pt.
- ✿ Il comportamento del biosensore all'analisi di miscele di Ch e PCh ha evidenziato la specificità del sensore monoenzimatico alla sola colina. Per il biosensore bienzimatico, il responso globale è risultato additivo permettendo la contemporanea determinazione degli analiti.
- ✿ Il biosensore ha evidenziato buone prestazioni in termini di tempo di risposta, linearità e limiti di rivelabilità per entrambi gli analiti
- ✿ L'impiego dello strato permselectivo di PPy ha consentito la realizzazione di un biosensore "realmente" specifico per Ch e PCh, esente da problemi di interferenza elettrodica.