

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____ 2026 р.

**РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО ХЕМОСЕНСОРА НА ОСНОВІ
АРГІНІН ЧУТЛИВОГО КАЛІКСАРЕНУ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Луковича Андрія Анатолієвича

Науковий керівник від кафедри

д-р філософії Нікітіна Н.С.

Робота виконана у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом наук. співроб., канд. біол. наук. Марченко Світлани Володимирівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

В даній роботі розроблено кондуктометричний хемосенсор на основі синтетичного макроциклічного рецептора - каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти (КФГФК) для кількісного визначення L-аргініну. В ході роботи було розроблено конструкцію сенсора, створено протокол формування селективного елемента шляхом нанесення розчину КФГФК в ДМСО та проведено оптимізацію параметрів його функціонування. З'ясовано, що оптимальною для формування селективного шару є концентрація 12,5 % КФГФК, що забезпечує у 2,2 рази вищу чутливість порівняно з 10 % розчином. Було встановлено, що мінімальна межа визначення L-аргініну розробленим хемосенсором становить 30 мкМ. Проведено дослідження впливу параметрів робочого розчину на аналітичний сигнал і встановлено, що максимальні відгуки спостерігаються у слабкокислому середовищі (рН 5,8–6,0) та при буферній ємності від 5 мМ. Було виявлено лінійну залежність зменшення сигналу від підвищення іонної сили розчину. Дослідження селективності до 20 протеїногенних амінокислот продемонструвало, що хемосенсор проявляє частковий відгук на лізин, глутамін та аспарагін. Розроблений пристрій характеризується високою відтворюваністю сигналу та стабільністю при зберіганні у сухому стані протягом щонайменше 2 місяців. Запропонована сенсорна система є перспективним інструментом для швидкого контролю вмісту L-аргініну у фармацевтичних препаратах та дієтичних добавках.

Кваліфікаційна робота викладена на 41 сторінці, ілюстрована 9 рисунками, 1 схематичним зображенням та 10 графіками. Список використаних джерел включає 56 робіт.

Ключові слова: L-аргінін, кондуктометричний хемосенсор, каліксарен-фенілгідроксифосфініста кислота, супрамолекулярне розпізнавання, золоті гребінчасті електроди.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія;

BCB - відносне стандартне відхилення;

ГА - глутаровий альдегід;

КЕ - капілярний електрофорез;

КФГФК - каліксарен-фенілгідроксифосфініста кислота;

ФБ - фосфатний буферний розчин;

ADMA - асиметричний диметиларгінін;

ADI – аргініндеіміназа;

ВН4- тетрагідробіоптерин;

CAT - катіонні амінокислотні транспортери;

EIS - електрохімічна імпедансна спектроскопія;

ІОХ - іонообмінна хроматографія;

NO - монооксид нітрогену;

NOS - синтаза монооксиду нітрогену.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біологічна роль та метаболічні шляхи L-аргініну в організмі людини. Значення детекції L-аргініну у фармації та харчовій промисловості	7
1.2. Порівняльний аналіз класичних методів детекції L-аргініну	12
1.3. Хемосенсиори на основі синтетичних рецепторів. Каліксарени як універсальні макроциклічні платформи Механізм взаємодії фосфіністих груп КФГФК з гуанідиноювою групою L-аргініну	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень	23
2.1. Мататеріали та реактиви	23
2.2 Конструкція кондуктометричних перетворювачів на основі золотих гребінчастих електродів.....	23
2.3. Формування селективних елементів сенсорів на основі каліксарен- фенілгідроксифосфіністої кислоти.....	25
2.4. Методика проведення кондуктометричних вимірювань	26
РОЗДІЛ 3. Результати і обговорення	31
3.1. Розроблення та оптимізація кондуктометричних хемосенсора на основі 5,11,17,23-тетракіс(фенілгідроксифосфонілметил)-25,27-ди(3- метилсульфідопропокси)калік-с[4]арену. Вплив умов іммобілізації та складу селективного елемента кондуктометричного хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти на чутливість хемосенсора до L- аргініну	31

3.2. Вивчення впливу параметрів буферного розчину на роботу кондуктометричного хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти.....	33
3.3. Дослідження селективності хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти.....	36
3.4 Дослідження відтворюваності сигналів, операційної стабільності та стабільності при зберіганні хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти.....	37
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42

ВСТУП

Однією з речовин, якій належить особлива роль в у багатьох біохімічних процесах в організмі людини, є умовно незамінна амінокислота L-аргінін (α -аміно- δ -гуанідино-валеріанова кислота). L- аргінн відіграє ключову роль у синтезі білків, функціонуванні серцево-судинної системи та загальному обміні речовин в організмі людини (Dzyadevych, 2022). L- Аргінін є важливим компонентом інтенсивної терапії - при хірургічних травмах, опіках, сепсисі.

Потреба людського організму в L-аргініні може задовільнятись синтезом з L-глутаміну, однак в організмі недоношених дітей, у людей похилого віку та при ряді станів і захворювань він не виробляється або виробляється в недостатній кількості.

L- Аргінін є важливою амінокислотою, оскільки він є попередником для утворення монооксиду нітрогену (NO), який бере участь у найважливіших фізіологічних процесах. Найголовнішим фізіологічним ефектом монооксиду нітрогену є вазодилатація, яка забезпечує регулювання діаметра судин відповідно до потреб тканини (Sokolova, 2019).

Додаткове приймання препаратів з L-аргініном покращує стан людей з серцево-судинними проблемами, порушенням кровообігу тим, хто прагне підвищити фізичну й когнітивну витривалість.

За останніх 10-15 років використання спеціальних харчових продуктів, дієтичних добавок та харчових продуктів для спеціального дієтичного споживання – які мають високий вміст L-аргініну, набуло широкого розповсюдження.

Неправильне вживання L-аргініну (перевищення дозування, тривалий прийом без перерв або вживання при наявності протипоказань) може спричинити низку побічних ефектів та шкоди для здоров'я (Yang, 2013).

Забезпечення безпечного вживання L-аргініну потребує контролю якості продуктів і дієтичних добавок. На сьогодні найбільш часто вживаними методами визначення L- аргініну в лабораторній практиці є інструментальні

методи. Їх застосування в аналізі багатокomпонентних зразків, таких як продукти харчування та дієтичні добавки, часто вимагає тривалої пробопідготовки, наявності висококваліфікованого персоналу, застосування вартісних реактивів і дорогого та великогабаритного обладнання

Розробка хемосенсорів на основі кондуктометричних фізичних перетворювачів дозволить мати інструмент з високою чутливістю виміру, малих розмірів, сумісні зі стандартними мікроелектронними технологіями, придатними для on-line вимірювань та які мають невисоку кінцеву вартість за умови масового виробництва.

Наукова новизна дослідження полягає у створенні та комплексному аналізі нової сенсорної платформи для високочутливого визначення L-аргініну.

Метою роботи є розроблення, оптимізація та дослідження аналітичних характеристик кондуктометричного хемосенсора для кількісного визначення L-аргініну на основі синтетичного макроциклічного рецептора - каліксарен-фенілгидроксифосфінової кислоти (КФГФК).

Завдання роботи:

1. Провести підготовку та діагностику фізичних перетворювачів, а також опрацювати методику іммобілізації КФГФК на поверхні золотих гребінчастих електродів.
2. Оптимізувати склад селективного елемента, вивчивши вплив концентрації КФГФК на аналітичні характеристики хемосенсора до L-аргініну.
3. Визначити вплив фізико-хімічних параметрів робочого буферного розчину (рН, іонна сила, буферна ємність) на специфічний відгук розробленої системи.
4. Дослідити основні аналітичні характеристики сенсора, такі як селективність, відтворюваність сигналу, операційна стабільність та термін зберігання.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна роль та метаболічні шляхи L-аргініну в організмі людини. Значення детекції L-аргініну у фармації та харчовій промисловості

L-аргінін є однією з основних амінокислот які кодуються генетичним кодом. L-аргінін є напівнезамінною або умовно незамінною амінокислотою: він може синтезуватися в організмі здорових людей, проте його ендогенного виробництва часто буває недостатньо у періоди фізіологічного стресу чи патологічних станів (Zhybak, 2017). Ця молекула (рис. 1.1) відіграє фундаментальну біологічну роль, оскільки бере участь у синтезі білків, імунній відповіді, циклі сечовини та, що найважливіше для серцево-судинної системи, є субстратом для утворення монооксиду азоту (NO) (Wu, 2021).

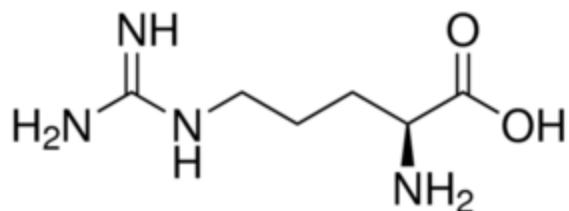


Рис. 1.1. Структурна формула амінокислоти L-аргініну

В організмі людини метаболізм L-аргініну є складною мережею конкуруючих біохімічних реакцій. Основна конкуренція відбувається між двома ферментами: NO-синтазою (NOS) та аргіназою (Rodríguez, 2017). Ізоформи NOS (зокрема, ендотеліальна eNOS) каталізують двоступеневе окислення L-аргініну до L-цитруліну та NO, використовуючи як кофактори нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (NADPH), флавінові нуклеотиди та тетрагідробіоптерин (BH₄) (Rajendran, 2019). Натомість, аргіназа (цитозольна

ізоформа I та мітохондріальна ізоформа II) гідролізує L-аргінін до орнітину та сечовини, що є критичним для виведення токсичного аміаку (Szondi, 2021). Крім того, L-аргінін є попередником у синтезі креатину, агматину та поліамінів (Líndez, 2021).

Раніше була поширена думка про те, що L-глутамін є головним попередником для синтезу цитруліну та, відповідно, L-аргініну. Проте сучасні ізотопні дослідження доводять, що внесок глутаміну є досить скромним. Ключовим механізмом підтримання системного пулу L-аргініну є кишково-ниркова вісь: ентероцити поглинають L-цитрулін, який, на відміну від L-аргініну, практично не піддається екстракції печінкою (ефект першого проходження). Потрапляючи у системний кровообіг, цитрулін поглинається нирками, де ферменти аргініносукцинатсинтетаза та аргініносукцинатліаза перетворюють його на L-аргінін. Саме тому фармакологічний підхід, заснований на пероральному прийомі чистого L-аргініну, є аналітично сумнівним через його масивну деградацію кишковою та печінковою аргіназою, тоді як застосування L-цитруліну є значно ефективнішим для підвищення системної біодоступності L-аргініну (Bahadoran, 2020).

Оксид азоту, що вивільняється ендотелієм, ініціює сигнальний каскад за участю розчинної гуанілатциклази, що призводить до підвищення рівня цГМФ і спричиняє розслаблення гладеньком'язових клітин судин (вазодилатацію). В літературі існує гостра полеміка щодо доцільності екзогенного введення L-аргініну для стимуляції цього процесу (Khalaf, 2019).

Фізіологічна концентрація L-аргініну в плазмі крові становить 45–100 мкмоль/л, тоді як константа Міхаеліса - Ментен ферменту eNOS для L-аргініну дорівнює лише 2,9 мкмоль/л. З огляду на ці цифри, фермент eNOS у фізіологічних умовах має бути повністю насичений субстратом, і додаткове введення L-аргініну не повинно підвищувати синтез NO. Проте клінічні дані свідчать про протилежне: гостре введення екзогенного L-аргініну стимулює утворення NO. Це явище отримало назву «парадокс аргініну».

Серед причин цього парадоксу виділяються дві ключові гіпотези. По-перше, наявність у плазмі асиметричного диметиларгініну (ADMA) — ендогенного інгібітора NOS, який прямо конкурує з L-аргініном за зв'язування з ферментом та за транспорт у клітину через катіонні амінокислотні транспортери (CAT). При патологічних станах (діабет, гіперхолестеринемія, гіпертонія) рівень ADMA зростає, тому введення L-аргініну є необхідним для відновлення балансу (співвідношення L-Аргінін/ADMA). По-друге, існує гіпотеза внутрішньоклітинної компартменталізації, згідно з якою локальна концентрація L-аргініну в кавеолах ендотеліальних клітин (у безпосередній близькості до eNOS) може бути значно нижчою, ніж загальна концентрація в гомогенаті клітини (Janaszak-Jasiecka, 2023).

Ендотеліальна дисфункція є основним пусковим механізмом розвитку таких серцево-судинних захворювань, як атеросклероз, артеріальна гіпертензія та діабетичні ангіопатії. Вона характеризується зниженою біодоступністю NO та підвищеним рівнем активних форм кисню. Критичним фактором цього процесу є гіперактивність аргінази. За умов старіння чи метаболічних розладів, підвищена активність аргінази "обкрадає" eNOS, позбавляючи її субстрату. Дефіцит L-аргініну або його кофактор BH4 призводить до так званого "роз'єднання" eNOS (NOS uncoupling), коли фермент починає генерувати супероксидний радикал замість NO, тим самим поглиблюючи оксидативний стрес (Gambardella, 2020).

Деякі дослідники стверджують, що при системному запаленні (наприклад, при ендотоксемії) індукцибельна ізоформа NOS (NOS2) бере на себе функцію підтримки кровотоку. Проте, результати новітніх експериментальних досліджень на нокаутних мишах (Wijnand, 2021) спростовують цю думку. Доведено, що мікроциркуляторні переваги (покращення перфузії), які спостерігаються при застосуванні L-цитруліну для поповнення пулу L-аргініну, залежать виключно від функціональної ендотеліальної NOS3, а не від NOS2 (Wijnands, 2021). Більше того, надмірне продукування NO ізоформою NOS2 призводить до шунтування кровотоку

(Wijnands, 2021), тоді як саме NOS3 є критичною для підтримки реальної капілярної перфузії тканин (Wijnands, 2021). Це доводить, що таргетна доставка L-аргініну саме до ендотеліальної NOS3 є ключовим завданням для корекції судинних розладів (Wijnands, 2021).

Метаболізм L-аргініну є складною багаторівневою системою, від якої безпосередньо залежить функціональна компетентність ендотелію. "Аргініновий парадокс", конкуренція між NOS та аргіназою, а також проблема печінкової екстракції при пероральному прийомі доводять, що просте перерахування фізіологічних функцій цієї амінокислоти є недостатнім для розуміння її ролі. Успішне відновлення ендотеліальної функції (запобігання роз'єднанню eNOS та нівелювання впливу ADMA) вимагає комплексних рішень, серед яких застосування L-цитруліну як метаболічного обхідного шляху або використання специфічних інгібіторів аргінази виглядає найбільш обґрунтованим напрямком для подальших власних і клінічних досліджень (Gambardella, 2020).

Останні десятиліття на світовому ринку відбувається стрімке зростання попиту на дієтичні добавки та фармацевтичні препарати, збагачені L-аргініном (Berketa, 2022). Це зумовлено доведеною терапевтичною ефективністю підвищених доз цієї амінокислоти для лікування ендокринних та серцево-судинних захворювань, гіперамоніємії, а також для стимуляції регенерації тканин, клітинного поділу та імунної відповіді (Gambardella, 2020; McNeal, 2018). У спортивній медицині та реабілітації препарати на основі L-аргініну (часто у формі солі аргініну аспартату) застосовуються для подолання втоми та підвищення фізичної витривалості, нерідко в комбінації з іншими метаболічно активними речовинами, такими як аскорбінова кислота (Costa, 2019). Зазвичай вміст L-аргініну в одній капсулі чи таблетці дієтичної добавки варіює від 250 до 1000 мг, що вимагає точного дозування на етапі виробництва (Saiarina, 2024).

З появою великої кількості вітчизняних та імпортованих дієтичних добавок, швидкий і надійний біотехнологічний контроль їхнього складу стає питанням

терапевтичної безпеки. Прецизійна детекція L-аргініну у фармацевтичних зразках дозволяє оцінювати чистоту вихідної сировини та підтверджувати правильність співвідношення заявлених активних фармацевтичних інгредієнтів у готовому продукті (Costa, 2019). В клінічній практиці моніторинг L-аргініну є життєво необхідним для пацієнтів з певними онкологічними патологіями (Zhybak, 2017). Зокрема, ауксотрофні пухлини, такі як меланома та гепатоцелюлярна карцинома, втрачають здатність експресувати фермент аргініносукцинатсинтетазу і, відповідно, не можуть самостійно синтезувати L-аргінін (Verma, 2017). Вони стають повністю залежними від надходження екзогенного L-аргініну з крові для генерації оксиду азоту, який стимулює пухлинний ангиогенез та ріст (Verma, 2017). Тому контроль рівня цієї амінокислоти у біологічних рідинах є критичним біомаркером для діагностики та оцінки ефективності таргетної ензимотерапії, спрямованої на депривацію L-аргініну (Verma, 2017).

L-аргінін є важливою складовою багатьох харчових продуктів та біологічних рідин, що робить його не лише вагомим біомаркером у медичній діагностиці, але й критично важливим індикатором якості та безпеки в харчовій промисловості. Велике значення біотехнологічний моніторинг L-аргініну має у виноробстві та виробництві ферментованих напоїв і соків (Stasyuk, 2023). Аналізуючи біохімічні процеси ферментації виноградного сусла, дослідники відзначають, що L-аргінін метаболізується ферментом аргіназою, яка секретується штамами дріжджів та молочнокислих бактерій, з утворенням орнітину та сечовини. Критичність цього метаболічного шляху полягає в тому, що за умови надмірної початкової концентрації L-аргініну в сировині (понад 1000 мг/л), сечовина не повністю асимілюється мікроорганізмами, накопичується у ферментаційному середовищі та згодом спонтанно реагує з етанолом. Наслідком цієї реакції є утворення етилкарбамату — сполуки з доведеною потужною канцерогенною дією. Тому попередній скринінг рівня L-аргініну в соках є імперативним заходом для уникнення загрози здоров'ю споживачів і дотримання жорстких нормативних

обмежень (наприклад, до 15 мкг/л етилкарбамату у винах згідно з нормативами США). Крім того, кількісне визначення цієї амінокислоти застосовується для оцінки харчової цінності свіжих продуктів, таких як соя, насіння соняшнику, горіхи та м'ясо, а також різноманітних фруктових соків (Saiarina, 2024).

Резюмуючи наведений огляд наукових публікацій, можна стверджувати, що прецизійна детекція L-аргініну є багатовекторною проблемою, яка охоплює як забезпечення безпеки продуктів харчування (контроль утворення канцерогенів), так і верифікацію якості фармакологічних засобів (Stasyuk, 2011; 2023). Враховуючи суттєві обмеження традиційного інструментального аналізу, напрям сучасних досліджень зміщується у бік створення портативних, економічно вигідних та високоселективних моноензимних біосенсорів (Saiarina, 2024). Висока практична значущість таких приладів для фармації та харчової промисловості цілком обґрунтовує необхідність проведення експериментального дослідження, спрямованого на оптимізацію та розширення аналітичних можливостей хемо/біосенсорів.

1.2. Порівняльний аналіз класичних методів детекції L-аргініну

Кількісне та якісне визначення амінокислот, зокрема L-аргініну, у складних біологічних або харчових матрицях залишається однією з ключових проблем сучасної аналітичної хімії (Berketa, 2022). Історично для вирішення цього завдання застосовували три основні групи методів: спектрофотометрію, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) та капілярний електрофорез (Berketa, 2022). Незважаючи на широку поширеність, кожен із цих підходів має фундаментальні недоліки, які часто замовчуються або нівелюються в рутинних лабораторних звітах. Детальний порівняльний аналіз цих методів дозволяє виявити їхні слабкі місця та обґрунтувати необхідність переходу до більш сучасних сенсорних технологій.

Історично першими методами кількісного визначення L-аргініну були колориметричні та спектрофотометричні аналізи, найвідомішим з яких є реакція Sakaguchi (Verma, 2015). Цей метод базується на реакції лужного розчину L-аргініну з нафтолом та гіпохлоритом (або гіпобромітом), що призводить до утворення червоного забарвлення. Деякі автори модифікували цю реакцію додаванням оксину для підвищення чутливості (Verma, 2015).

Спектрофотометричним методам притаманний критичний недолік — вкрай низька специфічність (Verma, 2017). Як зазначають Stasyuk та співавтори, класична колориметрія дає хибнопозитивні результати через перехресні реакції з іншими гуанідиновмісними сполуками (Гайда, 2015). Крім того, утворені кольорові комплекси часто є нестабільними в часі, а сам аналіз потребує ретельного очищення зразка від домішок, що робить його непридатним для прямого моніторингу складних матриць (Carter, 2016; Ceriotti, 1957). Спектрофотометрія, хоч і має низьку вартість та просте обладнання, є аналітично застарілою для прецизійного біотехнологічного контролю.

Метод ВЕРХ часто розглядається як «золотий стандарт» у детекції амінокислот (Sandlers, 2019). ВЕРХ забезпечує високу роздільну здатність і дозволяє одночасно аналізувати багатокомпонентні суміші. Однак, практичне застосування ВЕРХ виявляє його недоліки. Оскільки більшість аліфатичних амінокислот (включно з L-аргініном) не мають виражених хромофорних груп, їхнє пряме виявлення за допомогою УФ-детекторів є неможливим (Violi, 2020). Це змушує дослідників вдаватися до складної та тривалої процедури доколонкової або післяколонкової дериватизації з використанням таких токсичних реагентів, як о-фталевий альдегід або 2-хлорбензоксазол (Gałęzowska, 2021; Huang, 2018).

Користувачі методу відмічають, що ВЕРХ-аналіз є надзвичайно дорогим, повільним, екологічно недружнім (через використання великих об'ємів органічних розчинників) та вимагає висококваліфікованого персоналу (Costa, 2019). Складна пробопідготовка, що включає дегазацію, багатоетапну

фільтрацію та дериватизацію, різко знижує пропускну здатність лабораторій (Gałęzowska, 2021). Використання ВЕРХ є виправданим лише для фундаментальних багатокомпонентних досліджень, тоді як для рутинного скринінгу одного чи двох цільових аналітів (наприклад, L-аргініну в дієтичних добавках) цей метод є складним та економічно недоцільним.

Альтернативою рідинній хроматографії виступає капілярний електрофорез (КЕ), який приваблює коротким часом аналізу, малим споживанням зразків та реагентів, а також високою ефективністю розділення (Costa, 2019). КЕ вигідно відрізняється від ВЕРХ можливістю простої мініатюризації до формату мікрофлюїдних чипів.

Незважаючи на теоретичні переваги, практичне застосування КЕ має серйозні аналітичні обмеження. Головна проблема - детекція. Оскільки, неорганічні іони та амінокислоти погано поглинають УФ-випромінювання, для рутинного аналізу доводиться застосовувати метод непрямого УФ-детектування, який характеризується нижчою чутливістю порівняно з прямими методами (Violi, 2020). Іншою вагомою проблемою є сильний матричний вплив. Прямий аналіз складних зразків методом КЕ ускладнюється інтерференцією матриці, що негативно впливає на чутливість та відтворюваність (повторюваність) результатів. Для подолання цього недоліку дослідники змушені розробляти складні методи on-line концентрування (наприклад, стекінг або ізотахофорез), що зводить нанівець початкову простоту методики. Складніший процес оптимізації фонового електроліту та управління електроосмотичним потоком є головною причиною того, що КЕ досі не витіснив ВЕРХ із рутинних лабораторій.

Підсумовуючи критичний огляд, слід констатувати, що класична аналітична хімія опинилася в стані компромісу між простотою та точністю. Спектрофотометрія страждає від низької селективності (Reid, 2026), ВЕРХ обмежена високою вартістю та надзвичайно складною пробопідготовкою з дериватизацією (Gałęzowska, 2021; Shah, 2025), а капілярний електрофорез

стикається з проблемами відтворюваності через матричні ефекти та складнощі детектування (Cifuentes, 2005; Járvas, 2019).

Розглядаючи еволюцію методів кількісного визначення L-аргініну, можна простежити чіткий перехід від класичної аналітичної хімії до високотехнологічних інструментальних та біосенсорних платформ. Історично першим загальноприйнятим підходом була колориметрична реакція Сакагучі, яка базується на взаємодії лужного розчину L-аргініну з нафтолом та гіпохлоритом з утворенням червоного забарвлення (Verma, 2017). Однак, критичне оцінювання цього методу виявляє його суттєві недоліки: низьку специфічність, високу ймовірність перехресних реакцій з іншими гуанідиновмісними сполуками та нестабільністю забарвлення (Stasyuk, 2023). На зміну хімічним методам прийшли сучасні інструментальні технології, такі як високоефективна рідинна хроматографія (HPLC), мас-спектрометрія, капілярний електрофорез та флуориметрія. Наприклад, Costa та співавтори довели ефективність капілярного електрофорезу з безконтактним кондуктометричним детектуванням для швидкого одночасного визначення L-аргініну, аскорбінової та аспарагінової кислот у фармацевтичних препаратах (Costa, 2019). Тим не менш, незважаючи на високу точність, ці інструментальні методи навряд чи можна вважати ідеальними для потокового скринінгу: вони вимагають громіздкого та дороговартісного обладнання, тривалої пробопідготовки (зокрема, дериватизації зразків), використання токсичних розчинників та залучення висококваліфікованого персоналу (Berketa, 2022).

Найбільш перспективною альтернативою традиційному аналізу є пріоритетний розвиток біосенсорних технологій. Біосенсори поєднують високу селективність ферментативних реакцій із чутливістю сучасних фізичних перетворювачів (амперометричних, кондуктометричних, оптичних). Більш раціональним та аналітично довершеним підходом є розробка моноензимних кондуктометричних біосенсорів на основі аргініндеїмінази (ADI) (Saiarina, 2024). На відміну від біферментної системи уреаза/аргіназа,

фермент ADI каталізує прямий необоротний гідроліз L-аргініну до L-цитруліну та аміаку, демонструючи абсолютну селективність до цільового аналіту і нульову чутливість до сечовини (Saiarina, 2024; Zhybak, 2017). Дослідження кондуктометричних біосенсорів на основі рекомбінантної ADI з *Mycoplasma hominis* доводять їхню здатність виявляти L-аргінін у діапазоні мікромолярних концентрацій (межа детекції 2 мкМ), зберігаючи при цьому стабільність протягом місяців навіть за кімнатної температури (Berketa, 2022; Saiarina, 2024). Такі платформи дозволяють проводити прямий аналіз дієтичних добавок без попереднього очищення чи центрифугування зразків, що робить їх ідеальними для впровадження у рутинний промисловий контроль (Saiarina, 2024). Саме біосенсорні платформи, а не класичні інструментальні методи, здатні відповісти на сучасні виклики фармації та харчової промисловості.

1.3. Хемосенсиори на основі синтетичних рецепторів. Каліксарени як універсальні макроциклічні платформи Механізм взаємодії фосфіністих груп КФГФК з гуанідиноювою групою L-аргініну

Фундаментальний виклик у цій галузі полягає не стільки у синтезі молекули-рецептора з необхідними властивостями, скільки у точному перенесенні події розпізнавання на межі поділу фаз «тверде тіло – рідина» з подальшою її високовірною трансдукцією у вимірюваний аналітичний сигнал. Саме унікальна здатність макроциклів до спрямованої хімічної модифікації (наприклад, незалежна функціоналізація верхнього та нижнього вінців каліксаренів) дозволяє ефективно інтегрувати їх з різноманітними фізичними перетворювачами, вирішуючи проблему трансдукції сигналу набагато витонченіше, ніж це можливо за допомогою громіздких біологічних молекул.

Синтетичні рецептори вже сьогодні значно випереджають природні біомолекули за критерієм відтворюваності, хоча іноді все ще поступаються їм у специфічності (Pinalli, 2018). Штучні системи, такі як каліксарени або синтетичні олігонуклеотидні аптамери, пропонують вирішення цих проблем: вони є стабільнішими, дешевшими у виробництві, легко модифікуються хімічним шляхом і можуть безперешкодно синтезуватися у промислових масштабах (Chong, 2025; Pinalli, 2018). Застосування сенсорних масивів на основі декількох частково селективних синтетичних рецепторів дозволяє нівелювати нижчу індивідуальну селективність за рахунок розпізнавання патернів, що робить штучні системи надзвичайно потужним інструментом для роботи зі складними сумішами (Marcos, 2024; Tian, 2022).

Завдяки тому, що синтетичні рецептори є чітко визначеними хімічними сполуками, які можна очистити до гомогенного стану, варіабельність їхніх властивостей між різними лабораторіями або партіями синтезу практично повністю усувається. Це гарантує абсолютну відтворюваність аналітичних характеристик сенсорів на їхній основі (Doller, 2019; Pinalli, 2018). З огляду на наведені аргументи, власна позиція полягає в тому, що для рутинного скринінгу, клінічної діагностики за місцем надання допомоги (point-of-care) та промислового контролю якості стратегічний пріоритет має надаватися саме штучним хемосенсорним системам. Їхня хімічна стійкість, відтворюваність, тривалий термін експлуатації та легкість мініатюризації об'єктивно доводять свою перевагу над крихкими біологічними розпізнавальними елементами (Chong, 2025; Liu, 2020; Mandenius, 2021).

Каліксарени вважаються «третім поколінням» супрамолекулярних сполук-господарів після краун-етерів та циклодекстринів (Marcos, 2023). За своєю хімічною природою вони є фенольними метациклофанами, які утворюються в результаті реакції конденсації пара-заміщених фенолів з формальдегідом за умов кислотного або основного каталізу (Eddaif, 2019). Унікальність цих сполук полягає у їхній тривимірній структурі, що формує центральну порожнину та нагадує за формою чашу або кошик (Wong, 2022).

Архітектура молекули чітко розподіляється на два домени: гідрофобний верхній вінець, який зазвичай утворений алкільними або арильними замісниками фенолу, та більш гідрофільний нижній вінець, де сконцентровані фенольні гідроксильні групи (Wong, 2022).

Переваги каліксаренів над іншими макроциклічними та біологічними рецепторами, полягають в їх термічній та хімічній стабільності, а також легкості спрямованої хімічної модифікації. На відміну від жорстких кукурбітурилів, які вкрай важко піддаються функціоналізації, або природних антитіл, схильних до незворотної денатурації, каліксарени є надзвичайно гнучким матеріалом для дизайну. Вони дозволяють незалежно і прецизійно модифікувати як верхній, так і нижній вінці широким спектром функціональних груп (Uttam, 2023). Це робить їх ідеальними будівельними блоками для конструювання високочутливих аналітичних систем та наноматеріалів.

Головною характеристикою каліксаренів є їхня конформаційна динаміка, яка зумовлена можливістю обмеженого обертання фенольних кілець навколо метиленових містків (Sardjono, 2017). Для найдослідженішої платформи — каліксаренів — існують чотири основні конформаційні ізомери: конус (cone), частковий конус (partial cone), 1,2-альтернат (1,2-alternate) та 1,3-альтернат (1,3-alternate) (Sardjono, 2017) (рис. 1.2).

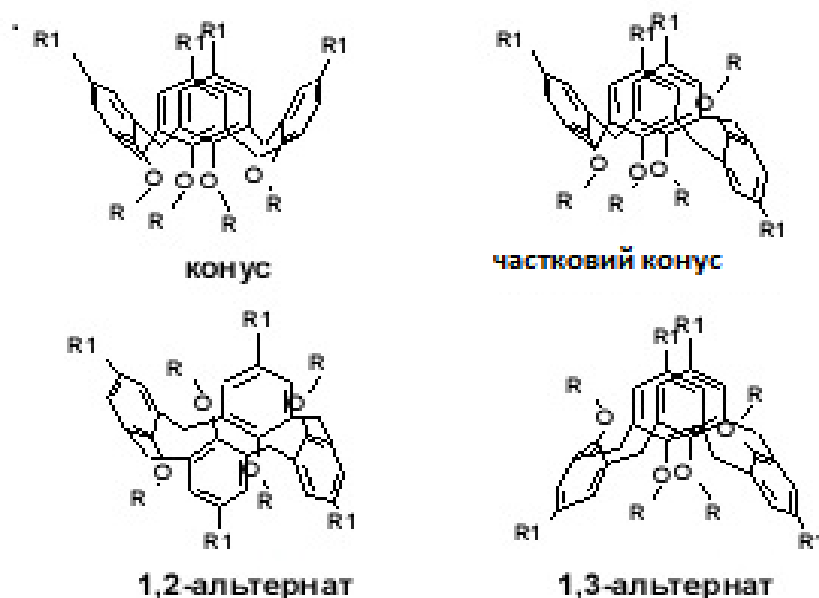


Рис. 1.2. Чотири основні конформаційні ізомери каліксарнів

Немодифіковані каліксарени у твердому стані здатні самостійно стабілізувати конформацію конуса виключно за рахунок утворення міцної мережі внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між гідроксилами нижнього вінця (Zhao, 2017).

Головною функціональною властивістю каліксаренових платформ є їхня здатність виступати в ролі молекулярних контейнерів, утворюючи стабільні комплекси включення («гість-господар») з різноманітними іонами та нейтральними органічними молекулами (Quaglio, 2021). Це молекулярне розпізнавання реалізується не за рахунок ковалентних зв'язків, а через складну синергію слабких нековалентних взаємодій: водневих зв'язків, іон-дипольних сил, електростатичного притягання, стекінгу, а також катіон- та взаємодій безпосередньо з ароматичними кільцями порожнини (Escobar, 2021).

Порівнюючи здатність різних макроциклів до молекулярного розпізнавання, варто виділити водорозчинні пара-сульфонатокаліксарени. Завдяки наявності негативно заряджених сульфонатних груп на верхньому вінці, вони демонструють виняткову ефективність в інкапсуляції позитивно заряджених біомолекул (зокрема, амінокислот, нейромедіаторів та

флуоресцентних барвників), що робить їх незамінними у біомедичному моніторингу (Nikolova, 2019).

Більшість дослідників (Lhoták, 2024) зосереджуються переважно на модифікації верхнього (широкого) вінця. Однак структурний потенціал нижнього вінця залишається суттєво недооціненим. Модифікація нижнього вінця не лише забезпечує конформаційну жорсткість, але й дозволяє створювати високоселективні бітопні рецептори. Наприклад, інтеграція краун-етерних фрагментів формує молекули (такі як каліксарен-краун-6), що здатні до синергічного розпізнавання: вони одночасно захоплюють катіони своєю краун-етерною частиною та стабілізують органічні фрагменти гостя в гідрофобній ароматичній порожнині за рахунок просторової комплементарності.

Здатність каліксаренів до тонкого налаштування геометричних та електронних параметрів порожнини, підкріплена їхньою високою хімічною стабільністю, дозволяє створювати унікальні супрамолекулярні комплекси, і використовувати каліксарени як універсальні платформи для розробки новітніх діагностичних біосенсорів, систем для клінічного аналізу та векторних носіїв лікарських засобів (Casas-Hinestroza, 2019; Quaglio, 2021).

Розпізнавання основних амінокислот, зокрема L-аргініну, у водному чи фізіологічному середовищі залишається одним із найскладніших викликів для супрамолекулярної хімії через високу енергію гідратації гуанідинової групи (Johns, 2020). Хоча сульфonatoкаліксарени традиційно використовувалися для зв'язування катіонних субстратів за рахунок електростатичної взаємодії (Escobar, 2021), їхня селективність часто виявляється недостатньою. Суто кулонівські сили не здатні забезпечити високоспецифічне розпізнавання складних молекулярних патернів. Тому основним напрямком стало використання каліксаренів із фосфорними функціональними групами (фосфоновими, фосфіністими, фосфатними), які утворюють клас рецепторів, здатних до спрямованої муьтиточкової взаємодії з аналітом.

Фосфоровмісні групи відрізняються надзвичайно високою поляризацією зв'язку $P=O$, що робить атом кисню потужним акцептором водневого зв'язку та центром для катіон-дипольних взаємодій (Puyo-Fourtine, 2022). Дослідження продемонстрували, що каліксарени, функціоналізовані фосфоновими кислотами на верхньому вінці, здатні ефективно зв'язувати ефіри амінокислот у воді (Escobar, 2021). Водночас дослідники пішли далі, використавши тетрафосфонатний каліксарен для селективного розпізнавання похідних L-аргініну та лізину на межі поділу фаз (Pinalli, 2018). Вбудований у ліпідний моношар, цей фосфоровмісний рецептор продемонстрував здатність динамічно реорганізовуватися для мультиточкового захоплення пептидів, збагачених L-аргініном, що підтверджується значним розширенням ізотерм тиску-площі (Pinalli, 2018).

Механізм розпізнавання L-аргініну, побудований на фізико-хімічній природі його бічного ланцюга, частиною якого є гуанідинієва група.

Завдяки позитивному заряду, бічний ланцюг бере участь в іонних взаємодіях та зв'язуванні з негативно зарядженими молекулами Гуанідинієвий катіон є планарною, π -спряженою квазіароматичною структурою, де позитивний заряд делокалізований між трьома атомами азоту (Vazdar, 2018). Завдяки такій геометрії, гідратація гуанідинію є вкрай асиметричною: він діє як донор водневих зв'язків виключно у своїй молекулярній площині, тоді як простори над і під цією площиною є гідрофобними. Саме ця "орієнтаційна амфіфільність" робить просту електростатичну взаємодію недостатньою для надійного зв'язування (Vazdar, 2018).

Механізм взаємодії між фосфіністими/фосфонатними групами КФГФК та гуанідиноювою групою L-аргініну базується на взаємодоповненні трьох фундаментальних сил, що діють одночасно: катіон-дипольні взаємодії, водневі зв'язки, катіон - та CN - взаємодії.

Отже, механізм взаємодії КФГФК з L-аргініном не зводиться до банального притягання протилежних зарядів. Це складний супрамолекулярний процес, де просторова комплементарність рецептора

дозволяє "зафіксувати" гуанідинову групу через утворення одночасних, міцних водневих зв'язків з фосфіністими групами в екваторіальній площині, тоді як ароматична порожнина екранує гідрофобні грані аналіту від молекул розчинника. Саме ця структурна відповідність робить фосфоровмісні каліксаренові системи неперевершеними кандидатами для створення високоселективних хемосенсорів на L-аргінін (Pinalli, 2016; Quaglio, 2021).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

У роботі були використані наступні реактиви: 5,11,17,23-тетракіс (фенілгидроксифосфонілметил)-25,27-ди (3 метилсульфідо-пропокси) калікс[4]арен (скорочено каліксарен-фосфініста кислота), синтезована в Інституті органічної хімії НАН України (м. Київ) та надана для дослідження; L-аргініну-моногодихлорид та інші амінокислоти, необхідні для дослідження селективності, виробництва «Sigma-Aldrich»; гліцерин виробництва «Макрохім» (Україна).

В якості середовищ для вимірювань були використані наступні буферні розчини: а) двокомпонентний фосфатний буферний розчин складу KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (скорочено ФБ); б) Трис- HCl буферний розчин. Для приготування розчинів використовували бідистильовану або ультрачисту воду.

2.2 Конструкція кондуктометричних перетворювачів на основі золотих гребінчастих електродів

В якості фізичних перетворювачів використовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені відповідно до рекомендацій Інституту молекулярної біології і генетики в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). Кожний з перетворювачів складався з двох пар тонкошарових планарних гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на непровідну підкладинку з ситалу (геометричні розміри підкладинки – 5×30 мм) (рис. 2.1). З метою

покращення адгезії шару золота до ситалу наносили допоміжний шар хрому товщиною 50 нм.



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд кондуктометричного перетворювача на основі золотих гребінчастих електродів

Електроди перетворювача мали зустрічно-штирьову геометрію з товщиною шару золота близько 150 нм. Площа чутливої поверхні пари електродів становила близько 3 мм², відстань між пальцями гребінок і ширина самих пальців – близько 20 мкм. Перетворювачі використовувалися як в диференційному режимі вимірювання, так і в одноканальному для реєстрування зміни провідності або адмітансу шару розчину та молекулярних структур, які знаходилися в приелектродній області.

Перед нанесенням селективних елементів сенсорів поверхню перетворювачів очищали свіжим розчином складу «Піран'я» (1 частина H₂O₂ (конц. 35 % об/об) та 3 частини NH₃ (конц. 10 % об/об)). Для цього електроди занурювали у розчин наведеного вище складу при 60–80 °C на 10–15 хвилин, після чого ретельно промивали у свіжих порціях бідистильованої води та обробляли етанолом до повного висихання (рис. 2.2).

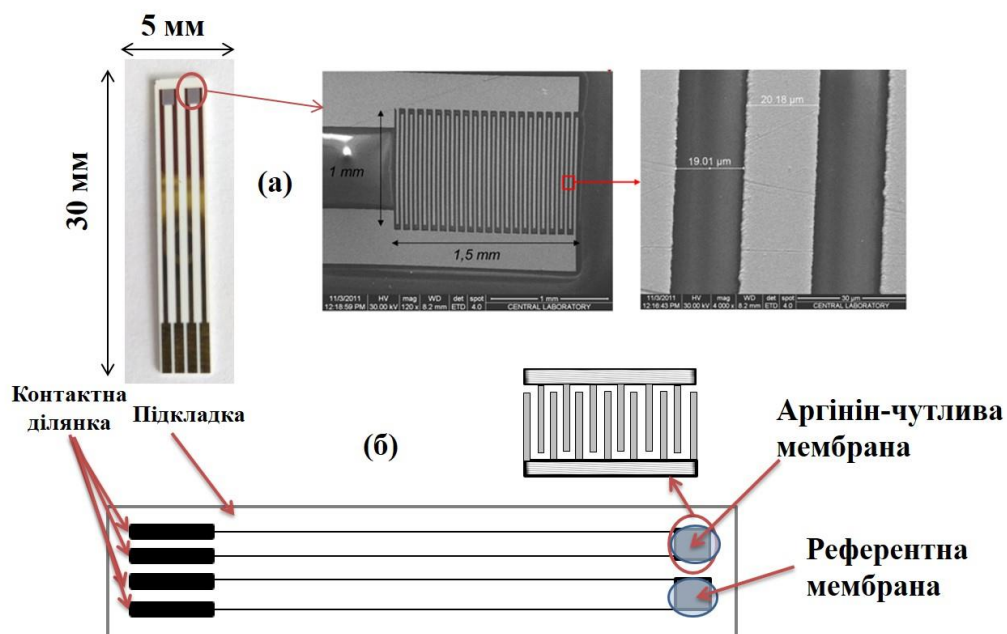


Рис. 2.2. Зовнішній (а) та схематичний (б) вигляд планарного диференційного гребінчастого перетворювача з нанесеними (біо)селективними елементами

Під час вимірювань перетворювачі закріплювали в тримачі електродів вимірювальної установки та розміщували в комірці для вимірювань, заповненій робочим розчином об'ємом 3,5–4 мл.

2.3. Формування селективних елементів сенсорів на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти

Для виготовлення селективного елемента хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти на чутливу поверхню пари електродів наносили КФГФК у концентрації 10 % і 12,5 %. Для приготування відповідних робочих розчинів КФГФК наважку каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти розчиняли в ДМСО. Приготовлені розчини наносили на чутливу поверхню однієї пари електродів (іншу пари залишали некритою). В усіх випадках на поверхню пари електродів наносили робочий розчин КФГФК в ДМСО (0,15–0,2 мкл), після чого перетворювач залишали

для іммобілізації в темному місці (при кімнатній температурі) на 20 хвилин і потім при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 30 хвилин. Після цього наносили ще один шар КФГФК шляхом нанесення 0,15–0,2 мкл робочого розчину КФГФК тієї ж концентрації КФГФК, що й попереднього разу. Проводили інкубацію перетворювача аналогічно першому разу (в цілому ще 50 хв.) Після іммобілізації чутливу поверхню електродів промивали протягом 15–20 хв. у свіжих порціях фосфатного буферного розчину для видалення неіммобілізованих молекул каліксарену та ДМСО.

2.4. Методика проведення кондуктометричних вимірювань

Роботу сенсорів досліджували за допомогою експериментальних кондуктометричних установок та ЕІС в двох-електродній схемі підключення. В роботі були використані експериментальні кондуктометричні установки двох типів: 1) стаціонарні установки для кондуктометричних вимірювань та портативні установки для кондуктометричних вимірювань (рис. 2.3).

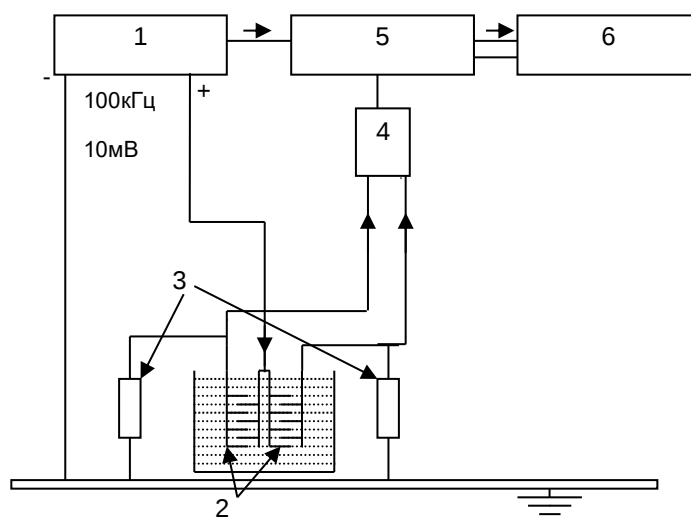


Рис. 2.3. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань: 1 – генератор сигналів, 2 – електроди, 3 – опори навантаження, 4 – диференційний підсилювач, 5 – фазочутливий нановольтметр, 6 – реєструючий пристрій

З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-112/1 (Україна) (рис. 2.4) змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подавалася на пару гребінчастих електродів, розміщених в комірці з досліджуваним розчином (рис. 2.5).



Рис. 2.4. Низькочастотний генератор сигналів

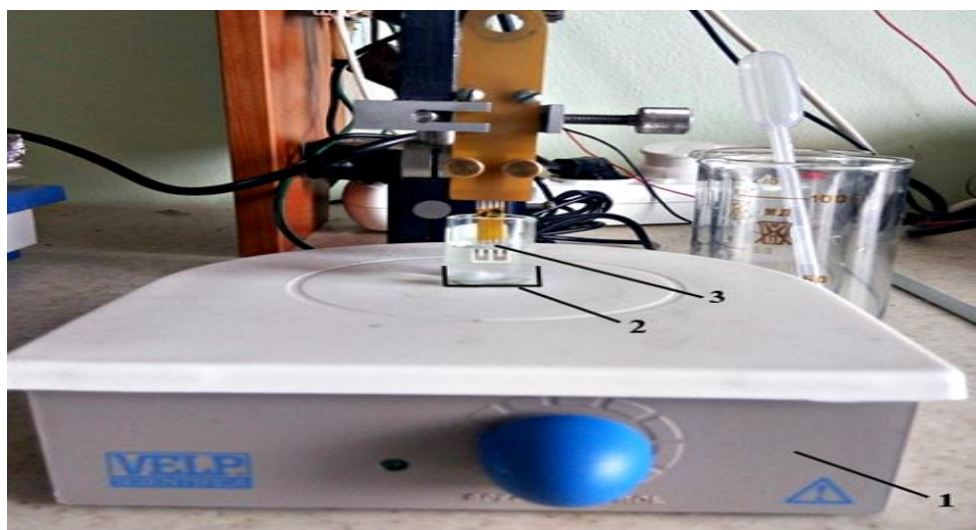


Рис. 2.5. Комірка для вимірювань: 1 – магнітна мішалка, 2 – комірка, 3 – кондуктометричний перетворювач

Під час вимірювання отриманий на електродах сенсора сигнал знімався з опорів навантаження $R_n = 1 \text{ кОм}$ та надходив через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) на селективний нановольтметр Unipan-233

(Польща) (рис. 2.6). Після нановольтметра даний сигнал подавався на реєструючий пристрій, самописець (рис. 2.7). В ході експериментів вимірювали залежність амплітуди вихідного сигналу від концентрації аналіту в розчині.



Рис. 2.6. Селективний нановольтметр

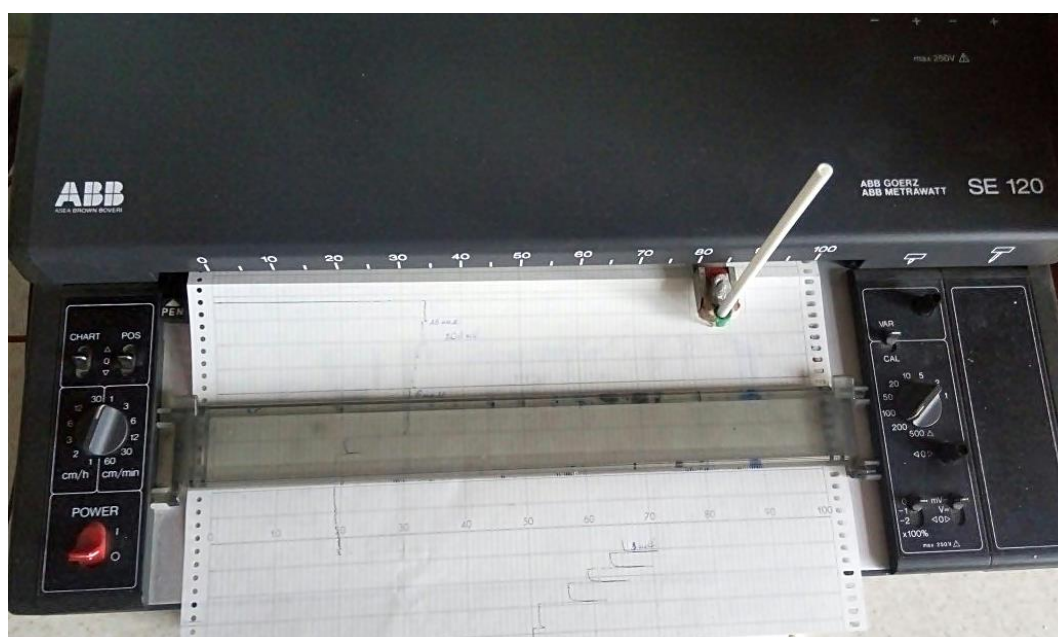


Рис. 2.7. Реєструючий пристрій (самописець)

Портативна установка для вимірювань складалася з диференційного кондуктометра, розробленого Інститутом молекулярної біології і генетики в співпраці з Інститутом електродинаміки НАН України (м. Київ), тримача

електродів, з'єднувальних елементів для підключення всіх компонентів системи, комп'ютера та програмного забезпечення. У такій системі кондуктометричні перетворювачі під'єднували до компенсаційно-мостового ланцюга змінного струму з напругою 10–14 мВ та частотою 30–36,5 та 66 кГц. Блок-схема компенсаційно-мостового ланцюга диференційного кондуктометра та детальний опис приладу приведені в (Melnyk, 2021). Зовнішній вигляд кондуктометричної установки представлено (рис. 2.8).

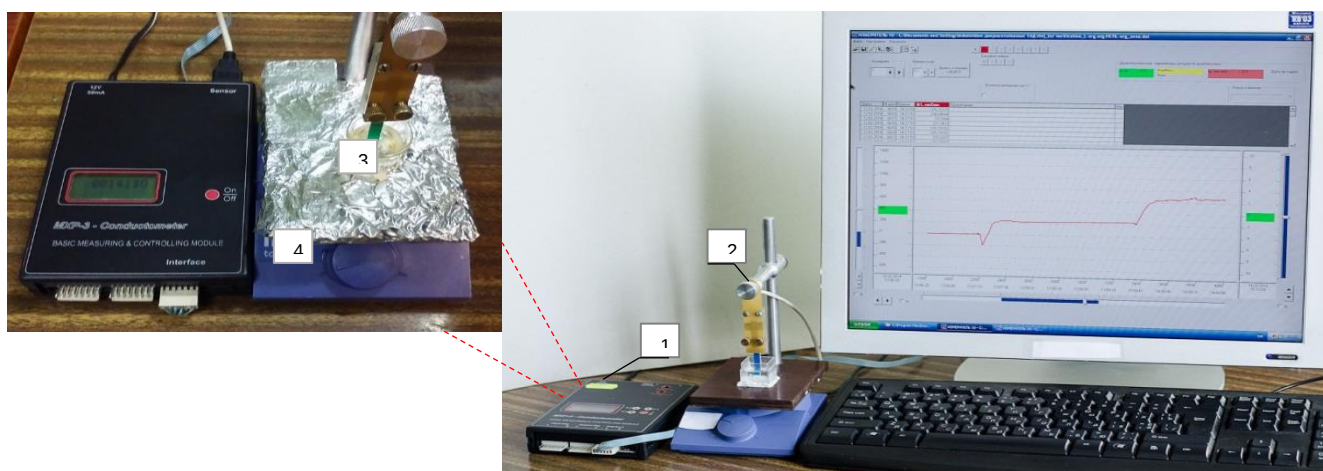


Рис. 2.8. Портативний диференційний кондуктометр, який використовували для дослідження роботи хемосенсорів (компоненти установки:

1 – електронно-вимірювальний модуль; 2 – тримач електродів з закріпленим перетворювачем; 3 – комірка для вимірювань, заповнена робочим розчином; 4 – магнітна мішалка)

Усі сенсорні вимірювання проводили при кімнатній температурі у відповідному буферному розчині об'ємом 3,5–4 мл у відкритій робочій комірці при постійному перемішуванні. Необхідну концентрацію аналіту в комірці задавали шляхом внесення його стокового розчину до робочого буферу з його наступним самовільним розведенням. Неспецифічні зміни сигналу сенсорів, пов'язані з локальними коливаннями температури та рН середовища під час вимірювань, компенсувалися завдяки використанню диференційного режиму

вимірювань. Обробку експериментальних даних і графічне їх представлення проводили за допомогою програми OriginPro 8.5. При цьому використовували загальноприйняті методи статистичного аналізу на основі обчислення середньоквадратичного відхилення або коефіцієнтів варіації.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Розроблення та оптимізація кондуктометричних хемосенсора на основі 5,11,17,23-тетракіс(фенілгідроксифосфонілметил)-25,27-ди(3-метилсульфідопропокси)калік-с[4]арену. Вплив умов іммобілізації та складу селективного елемента кондуктометричного хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти на чутливість хемосенсора до L- аргініну

При розробленні хемосенсора на основі 5,11,17,23-тетракіс(фенілгідроксифосфонілметил)-25,27-ди(3-метилсульфідопропокси)калік-с[4]арену вивчали його основні аналітичні характеристики та залежність відгуків від параметрів робочого буферного розчину. На початковому етапі даного дослідження вивчали вплив умов іммобілізації та концентрації каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти у складі селективного елемента сенсора на його чутливість до L-аргініну. Під час виготовлення селективного елемента сенсора використовували 10%-ий і 12,5%-ий розчин даного каліксарену для нанесення на чутливу поверхню перетворювача. В обох випадках було встановлено, що стабілізація чутливості хемосенсорів на основі 10 % і 12,5 % каліксарен-фосфіністої кислоти відбувається з 5–8-го дня після іммобілізації каліксарену (рис.3.1).

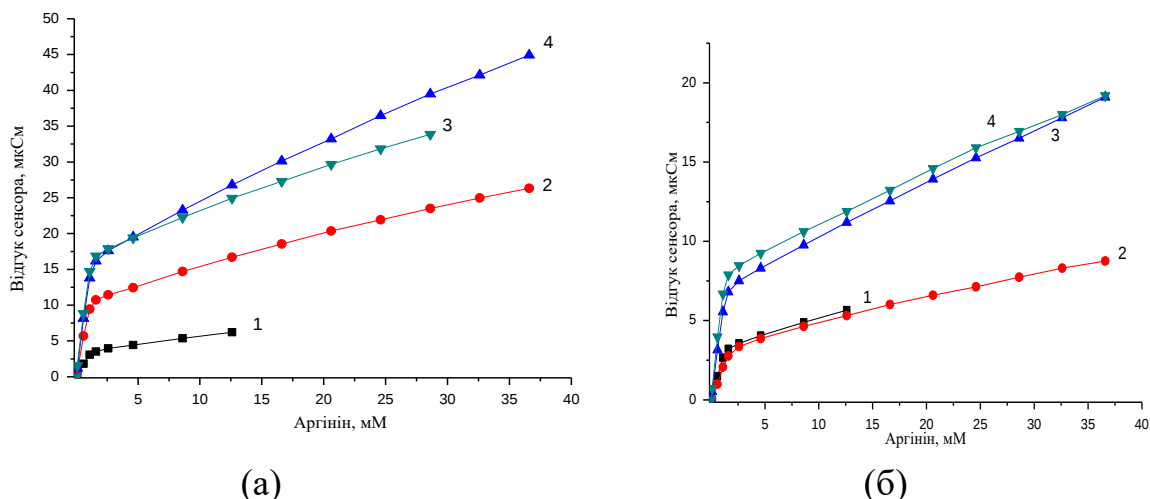


Рис. 3.1. Калібрувальні криві для визначення L-аргініну за допомогою хемосенсора на основі КФГФК при концентрації каліксарену в селективному елементі сенсора 12,5 % (а) і 10 % (б): перетворювач, який не містив шару КФГФК (а1, б1) та хемосенсор в 1-й (а2, б2), 5-ий (а3, б3) і 8-ий (а4, б4) день після іммобілізації

З калібрувальних графіків видно, що чутливість хемосенсора, селективна мембрана якого містила 12,5 % каліксарен-фосфіністої кислоти, була в 2,2 рази вищою в порівнянні з хемосенсором на основі 10 % розчину каліксарену. При цьому мінімальна межа визначення L-аргініну у хемосенсорів на основі 12,5 % каліксарену становила 30 мкМ L-аргініну, в той час як для хемосенсора на основі 10 % каліксарен-фосфіністої кислоти ця величина складала 100 мкМ L-аргініну. На основі цього дослідження можна зробити висновок, що застосування вищої концентрації каліксарену при створенні селективного елемента сенсора надає перевагу сенсорам при визначенні низьких концентрацій L-аргініну.

3.2. Вивчення впливу параметрів буферного розчину на роботу кондуктометричного хемосенсора на основі каліксарен-фенілгидроксифосфіністої кислоти

Виходячи з результатів попереднього дослідження, вивчення впливу параметрів робочого буферного розчину на чутливість хемосенсорів на основі КФГФК проводили для хемосенсора, селективний елемент якого містив 12,5 % каліксарену. Оптимізацію складу робочого буферного розчину проводили на основі дослідження впливу рН, іонної сили та буферної ємності фосфатного буферного розчину на чутливість хемосенсора.

На рис. 3.2 представлено залежність відгуків хемосенсора від рН робочого буферного розчину. Як видно з залежності, при підвищенні величини рН фосфатного буферного розчину з рН 5,8 до рН 8,0 відгуки розробленого хемосенсора поступово зменшуються.

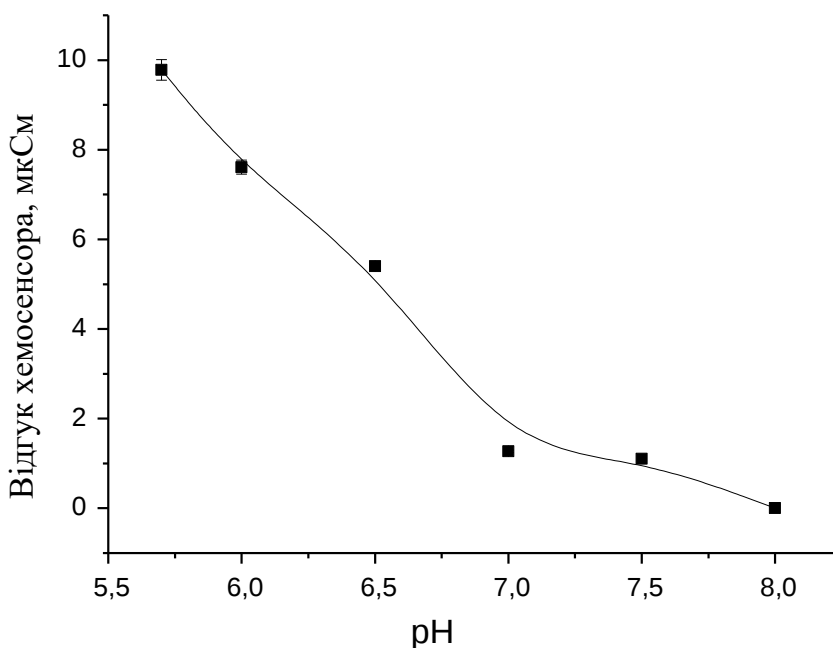


Рис. 3.2. Залежність відгуків хемосенсора на основі 12,5 % каліксарен-фосфіністої кислоти від рН буферного розчину. Відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну в 5 мМ фосфатному буферному розчині

Якщо вважати, що взаємодія між каліксареном і L-аргініном призводить до зміни провідності в приелектродному шарі розчину, то така взаємодія залежить від рН середовища і для досягнення максимальної чутливості визначення всі вимірювання потрібно проводити в більш кислому середовищі (рН 5,8-6,0).

При вивченні залежності відгуків хемосенсора від іонної сили робочого розчину отримували відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну в 5 мМ фосфатному буферному розчині, який містив NaCl в концентрації від 0 мМ до 20 мМ (рис. 3.3). Одержана залежність мала типову закономірність для кондуктометричного методу аналізу, а саме при підвищенні іонної сили середовища специфічний відгук сенсора на L-аргінін зменшувався, що пояснюється впливом катафоретичного та релаксаційного ефектів при русі іонів. Для даної залежності (рис.3.3) простежувалася лінійність, яка описувалася рівнянням: $y = 5,107 - 0,228 \cdot x$ ($R^2 = 0,998$).

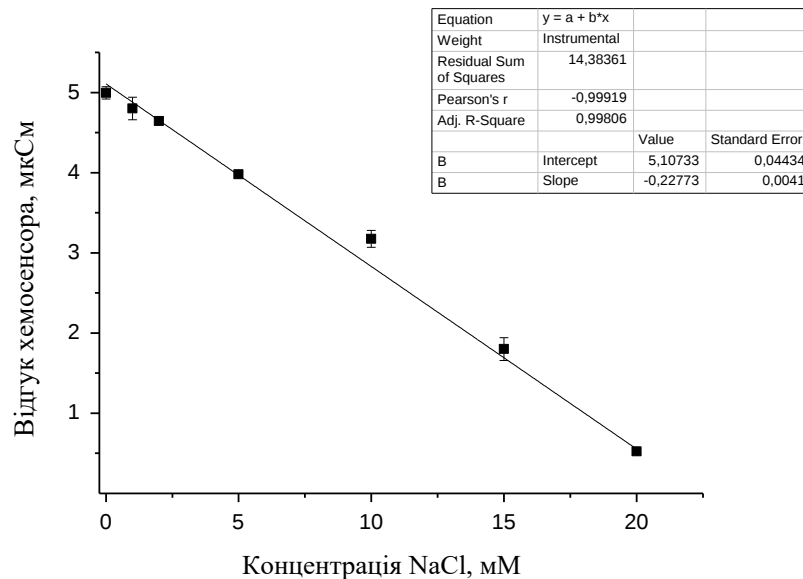


Рис. 3.3. Залежність відгуків хемосенсора на основі 12,5 % КФГФК від іонної сили буферного розчину. Відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0 (максимальне ВСВ – 7,86 %)

В ході дослідження залежності відгуків хемосенсора від буферної ємності фосфатного буферного розчину отримували відгуки на 1 мМ L-аргініну в фосфатному буферному розчині з концентрацією від 1 мМ до 20 мМ (рис.3.4) Як видно з одержаної залежності, в діапазоні концентрацій фосфатного буферного розчину від 1 до 5 мМ спостерігається динамічне зростання чутливості хемосенсора, величина якої при більш високих концентраціях буферного розчину залишається практично без змін (вихід «на плато»). Це може свідчити про те, що комплексоутворення між каліксарен-фосфіністою кислотою і L-аргініном потребує високої буферної ємності середовища (застосування фосфатного буферного розчину з концентрацією 5 мМ і вище).

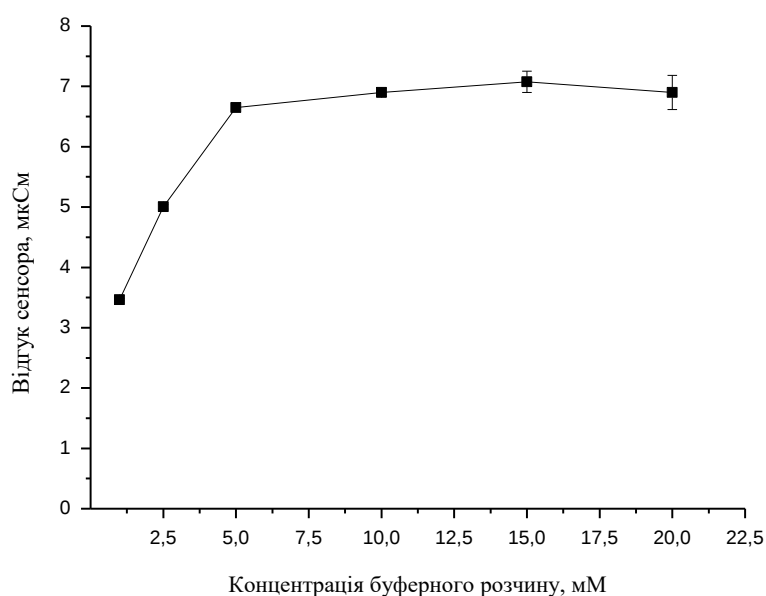
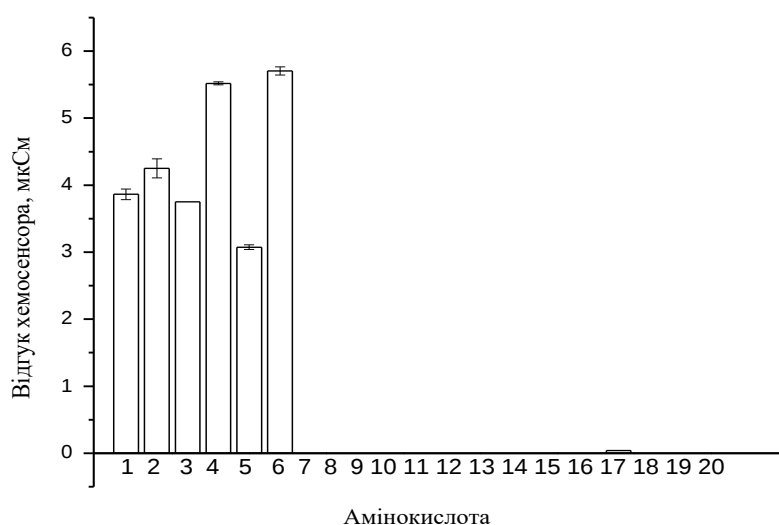


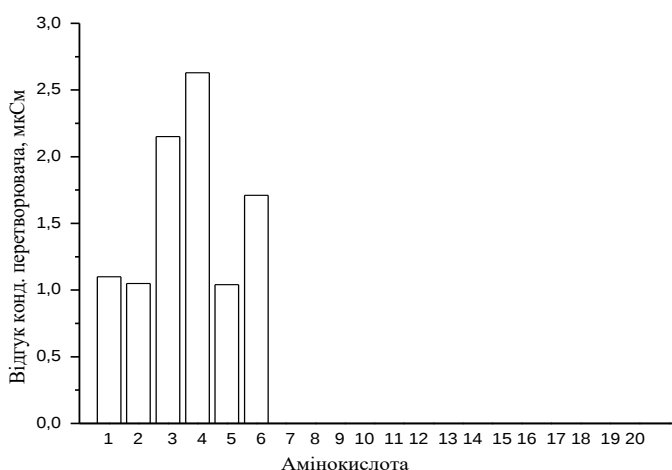
Рис. 3.4. Залежність відгуків хемосенсора на основі 12,5 % КФГФК від концентрації фосфатного буферного розчину. Відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну (максимальне ВСВ – 4,1 %)

3.3. Дослідження селективності хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти

Дослідження селективності хемосенсора на основі 12,5 % каліксарен-феніл-гідроксифосфіністої кислоти проводили шляхом вимірювання його чутливості до 20 протеїногенних амінокислот у фосфатному буферному розчині. Отримані дані представлені на рисунку (рис.3.5 (а)).



(а)



(б)

Рис. 3.5. Дослідження селективності хемосенсора на основі 12,5 % КФГФК (а) та чутливості немодифікованого кондуктометричного

перетворювача (б) до деяких амінокислот. Відгуки сенсора/перетворювача на 1 мМ наступних амінокислот: 1 – L-аргінін, 2 – L-лізин, 3 – L-глутамін, 4 – L-глутамінова кислота 5 – L-аспарагін, 6 – L-аспарагінова кислота, 7 – L-аланін, 8 – L-серин, 9 – L-ізолейцин, 10 – гліцин, 11 – L-лейцин, 12 – L-валін, 13 – L-метионін, 14 – L-гістидин, 15 – L-фенілаланін, 16 – L-цистеїн, 17 – L-тирозин, 18 – L-пролін, 19 – L-треонін, 20 – L-триптофан. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Крім того досліджували чутливість до тих же амінокислот у немодифікованого кондуктометричного перетворювача у фосфатному буферному розчині (рис.3.5 (б)).

При порівнянні даних видно, що сенсор з шаром каліксарен-фосфіністої кислоти і немодифікований перетворювач проявляли чутливість до одних і тих же амінокислот, а саме до L-аргініну, лізину, глутаміну, аспарагіну, глутамінової та аспарагінової кислот, з тією різницею, що амплітуда сигналів до цих амінокислот була вищою у хемосенсора. Одним з можливих пояснень даного спостереження є те, що деяка неселективність відгуків хемосенсора є виявом недиференційності сигналу кондуктометричного перетворювача при аналізі заряджених амінокислот і потребує пошуку підходів для її подолання.

3.4 Дослідження відтворюваності сигналів, операційної стабільності та стабільності при зберіганні хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти

В ході розроблення нового сенсора важливо контролювати ефективність іммобілізації; це можна здійснити шляхом перевірки відтворюваності відгуків сенсора після нанесення селективного елемента сенсора. Так, після іммобілізації шару каліксарен- фенілгідроксифосфіністої кислоти на поверхні гребінчастих електродів проводили дослідження відтворюваності відгуків

сенсора на одну і ту ж концентрацію цільового аналіту (1 мМ L-аргініну) в фосфатному буферному розчині протягом дня (рис.3.6). На основі визначеного коефіцієнту варіації сигналу сенсора ($KBC=1,6\%$) було зроблено висновок, що застосована процедура іммобілізації дозволяла отримувати стабільні селективні елементи сенсора.

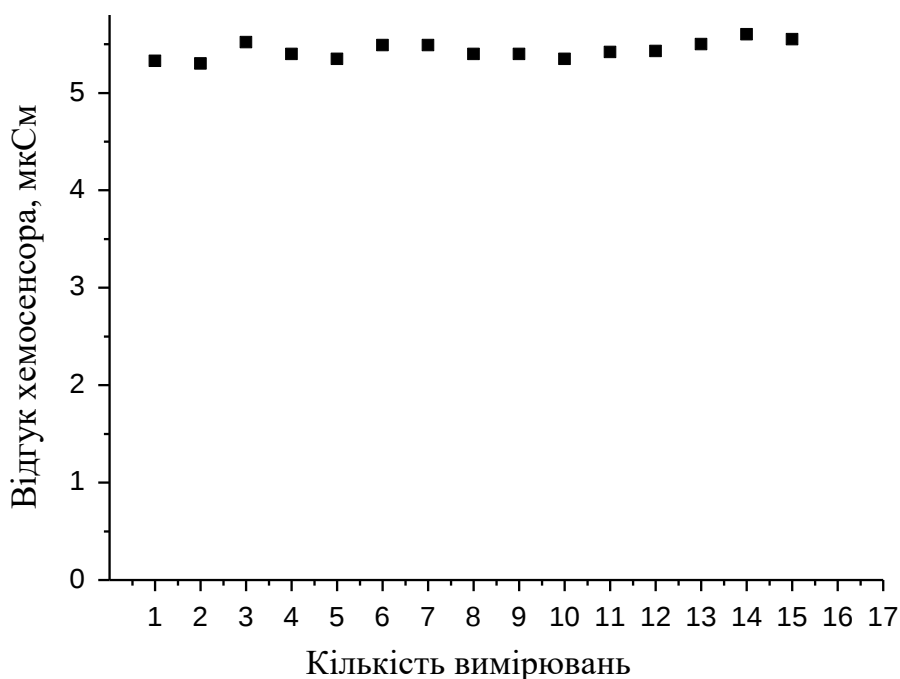


Рис. 3.6. Дослідження відтворюваності сигналу кондуктометричного хемосенсора на основі 12,5 % КФГФК. Відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Операційну стабільність хемосенсора на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти вивчали, проводячи моніторинг відгуків сенсора на одну і ту ж концентрацію L-аргініну протягом трьох послідовних днів роботи (між досліджуваними періодами роботи сенсори зберігали в сухому стані при температурі $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Одержану залежність представлено на рисунку (рис.3.7). Коефіцієнти варіації сигналу для кожного дня роботи сенсора становили 0,964%, 1,15 % і 1,548 % відповідно. Це дозволяє вважати, що розроблений хемосенсор мав також високу операційну стабільність.

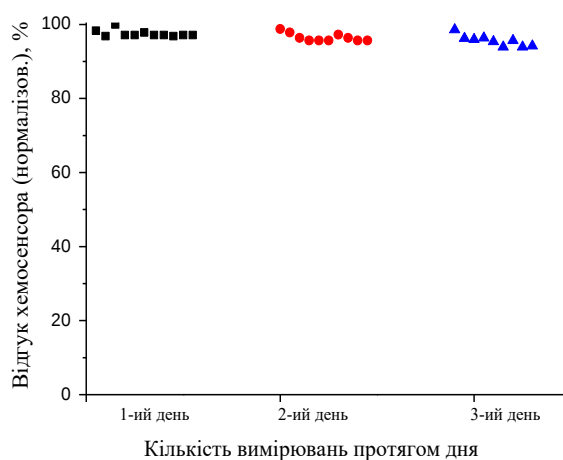


Рис. 3.7. Операційна стабільність хемосенсора на основі 12,5 % КФГФК. Відгуки сенсора на 1 мМ L-аргініну протягом трьох послідовних днів роботи, одержані в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Вивчення стабільності при зберіганні сенсорів на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти проводили шляхом моніторингу відгуків сенсора на одну і ту ж концентрацію L-аргініну протягом періоду його роботи, починаючи з першого дня після створення.

Як видно з одержаної залежності (рис.3.8), протягом першого дня після іммобілізації спостерігалось зниження чутливості сенсора до L-аргініну з подальшим зростанням на 4-й день після іммобілізації. Після 7-ого дня зберігання спостерігалось зниження чутливості сенсора до L-аргініну, а з 20-ого дня відгуки залишалися практично стабільними більше ніж 30 днів. На 57-ий день зберігання величина ВСВ сигналу сенсора становила 5,34 %. Початкову нестабільність відгуків сенсора, яка спостерігалася протягом перших 7 днів після виготовлення селективного шару, можна пояснити можливою стабілізацією конформації каліксареного шару на поверхні золота.

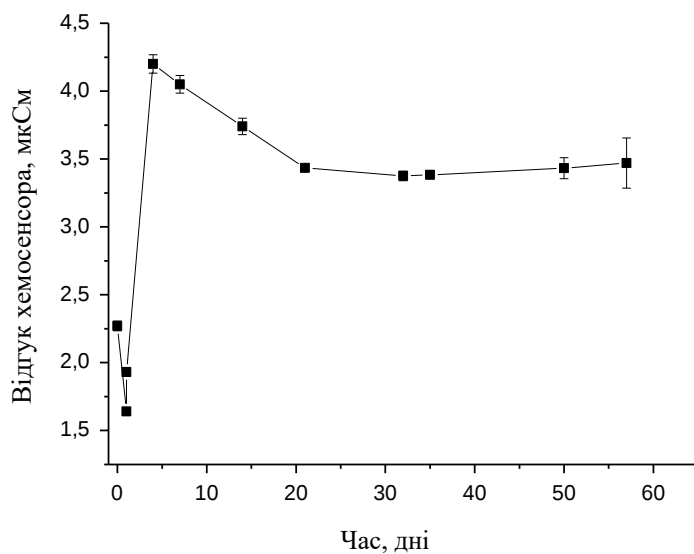


Рис. 3.8. Стабільність при зберіганні хемосенсора на основі 12,5 % каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти. Відгуки сенсора на 1,1 мМ L-L-аргініну в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

В цілому, можна стверджувати, що розроблений хемосенсор характеризувався високою стабільністю при зберіганні (щонайменше 2 місяці).

ВИСНОВКИ

Розроблено кондуктометричний хемосенсор на основі каліксарен-фенілгідроксифосфіністої кислоти (КФГФК), проведено оптимізацію умов вимірювання та досліджено основні аналітичні характеристики пристрою для кількісного визначення L-аргініну.

1. Оптимальною концентрацією для формування селективного елемента є 12,5% розчин КФГФК у ДМСО; такий сенсор демонструє у 2,2 рази вищу чутливість порівняно з 10 %-им розчином, забезпечуючи мінімальну межу визначення L-аргініну на рівні 30.

2. Чутливість сенсора суттєво залежить від параметрів середовища: максимальні відгуки спостерігаються у слабкокислому середовищі (рН 5,8–6,0) та при буферній ємності від 5 мМ. Встановлено, що підвищення іонної сили розчину призводить до лінійного зменшення сигналу ($y = 5,107 - 0,228x$; $R^2 = 0,998$), що зумовлено електрофоретичним та релаксаційним ефектами.

3. Хемосенсор проявляє часткову селективність: крім L-аргініну, система реагує на інші заряджені амінокислоти (лізин, глутамін, аспарагін), що пояснюється недиференційністю сигналу перетворювача при взаємодії з зарядженими молекулами.

4. Розроблена система характеризується високою стабільністю: коефіцієнт варіації сигналу протягом дня становить 1,6%, а термін зберігання селективного шару у сухому стані складає щонайменше 2 місяці зі збереженням робочих характеристик.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Kashfi, K. and Ghasemi, A. (2020). Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine. *Acta Physiologica*, [online] Volume 231(3), p. e13572. Available at: <https://doi.org/10.1111/apha.13572> [Accessed 22 October 2020].
2. Berketa, K., Saiapina, O., Fayura, L., Sibirny, A.A., Dzyadevych, S.V. and Soldatkin, O.O. (2022). Novel highly sensitive conductometric biosensor based on arginine deiminase from *Mycoplasma hominis* for determination of arginine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [online] Volume 367, p. 132023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132023> [Accessed 15 September 2022].
3. Carter, Z.A. and Kataky, R. (2016). A G-quadruplex aptamer based impedimetric sensor for free lysine and arginine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [online] Volume 243, pp. 904–911. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.010> [Accessed 2 December 2016].
4. Casas-Hinestroza, J.L., Bueno, M., Ibáñez, E. and Cifuentes, A. (2019). Recent advances in mass spectrometry studies of non-covalent complexes of macrocycles - A review. *Analytica Chimica Acta*, [online] Volume 1081, pp. 32–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.029> [Accessed 14 June 2019].
5. Ceriotti, G. and Spandrio, L. (1957). An improved method for the microdetermination of arginine by use of 8-hydroxyquinoline. *Biochemical Journal*, Volume 66(4), pp. 603–610. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj0660603> [Accessed 18 January 1957].
6. Chong, J.Y., Lin, Y.H. and Pang, M.S. (2025). Insulin Quantification Through Electrochemical and Optical Aptasensors: A Review. *Annals of Biomedical Engineering*, [online] Volume 53(2), pp. 412–427. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10439-025-03881-1> [Accessed 17 October 2025].
7. Cifuentes, A. (2005). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *Electrophoresis*, [online] Volume

- 27(1), pp. 283–303. Available at: <https://doi.org/10.1002/elps.200500474> [Accessed 18 January 2006].
8. Costa, B., et al. (2019). Fast methods for simultaneous determination of arginine, ascorbic acid and aspartic acid by capillary electrophoresis. *Talanta*, [online] Volume 204, pp. 353–359. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.017> [Accessed 1 November 2019].
 9. Doller, D. and Wes, P.D. (2019). Quality of Research Tools. *Handbook of Experimental Pharmacology*, [online] pp. 119–134. Available at: https://doi.org/10.1007/164_2019_281 [Accessed 17 October 2019].
 10. Dzyadevych, S. V., Soldatkin, O. O., Arkhypova, V. M., Shkotova, L. V., Pyeshkova, V. M., Saiapina, O. Ya., Jaffrezic-Renault, N., Soldatkin, A. P. and El'skaya, A. V. (2022). Electrochemical biosensors based on enzymes: the state-of-the-art and future perspectives. *Biopolymers and Cell*, [online] Volume 38(2), pp. 81–125. Available at: <https://doi.org/10.7124/bc.38.2> [Accessed 28 August 2023].
 11. Eddaif, L., Shaban, A. and Telegdi, J. (2019). Sensitive detection of heavy metals ions based on the calixarene derivatives. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry*, [online] Volume 99(9), pp. 824–839. Available at: <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1616708> [Accessed 16 May 2019].
 12. Escobar, L. and Ballester, P. (2021). Molecular Recognition in Water Using Macrocyclic Synthetic Receptors. *Chemical Reviews*, [online] Volume 121(4), pp. 2445–2514. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00522> [Accessed 20 January 2021].
 13. Gałęzowska, G., Ratajczyk, J. and Wolska, L. (2021). Determination of amino acids in human biological fluids by HPLC: critical review. *Amino Acids*, [online] Volume 53(7), pp. 993–1011. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03002-x> [Accessed 2021 May 24].
 14. Gambardella, J., Khondkar, W., Morelli, M. B., Wang, X., Santulli, G. and Trimarco, V. (2020). Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*, [online]

- Volume 8(8), p. 277. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080277> [Accessed 6 August 2020].
15. Haida, H.Z., Stasyuk, N.Y., Sybirna, N.O. and Gonchar, M. (2015). Assay of L-Arginine in rat blood by enzymatic method. *ScienceRise*, [online] Volume 11, p. 33. Available at: <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2015.54486> [Accessed 27 November 2015].
 16. Huang, X., et al. (2018). Development and validation of a HPLC/FLD method combined with online derivatization for trace amino acids. *PLoS ONE*, [online] Volume 13(11), p. e0206488. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206488> [Accessed 12 November 2018].
 17. Járvas, G., et al. (2019). Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, [online] Volume 122, p. 115702. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115702> [Accessed 17 October 2019].
 18. Janaszak-Jasiecka, A., Płoska, A., Wierońska, J. M., Dobrucki, L. W. and Kalinowski, L. (2023). Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cellular & Molecular Biology Letters*, [online] Volume 28(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11658-023-00423-2> [Accessed 09 March 2023].
 19. Johns, H.P.F., et al. (2020). Mimicking Biological Recognition: Lessons in Binding Hydrophilic Guests in Water. *Chemistry - A European Journal*, [online] Volume 27(22), pp. 6620–6641. Available at: <https://doi.org/10.1002/chem.202003759> [Accessed 13 October 2020].
 20. Khalaf, D., Krüger, M., Wehland, M., Infanger, M. and Grimm, D. (2019). The Effects of Oral l-Arginine and l-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients*, [online] Volume 11(7), p. 1679. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11071679> [Accessed 22 July 2019].
 21. Líndez, A.-A.M.i. and Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [online] Volume 78(13), pp. 5303–5322.

Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>

[Accessed 26 May 2021].

22. Liu, L., et al. (2020). Top-down and bottom-up strategies for wafer-scaled miniaturized gas sensors. *Microsystems & Nanoengineering*, [online] Volume 6(1), p. 35. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41378-020-0144-4> [Accessed 04 May 2020].
23. Lhoták, P. (2024). Upper rim-bridged calixarenes. *RSC Advances*, [online] Volume 14(32), p. 23303. Royal Society of Chemistry. Available at: <https://doi.org/10.1039/d4ra04663c> [Accessed 24 July 2024].
24. McNeal, C. J., Meininger, C. J., Wilborn, C., Tekwe, C. D. and Wu, G. (2018). Safety of dietary supplementation with arginine in adult humans. *Amino Acids*, [online] Volume 50(9), p. 1215. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2594-7> [Accessed 01 June 2018].
25. Mandenius, C. (2021). Realization of user-friendly bioanalytical tools to quantify and monitor critical components. *Engineering in Life Sciences*, [online] Volume 22(3-4), pp. 217–231. Available at: <https://doi.org/10.1002/elsc.202100116> [Accessed 29 November 2021].
26. Marcos, P.M. and Berberan-Santos, M.N. (2023). Fluorescent homooxacalixarenes: recent applications in supramolecular systems. *Frontiers in Chemistry*, [online] Volume 11, p. 1258026. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1258026> [Accessed 06 October 2023].
27. Marcos, P.M. and Berberan-Santos, M.N. (2024). Recent Advances in Calixarene-Based Fluorescent sensors for Biological Applications. *Sensors*, [online] Volume 24(22), p. 7181. Available at: <https://doi.org/10.3390/s24227181> [Accessed 08 November 2024].
28. Melnyk, V. G., Vasylenko, A. D., Semenycheva, L. N., Slitskiy, O. V., Saiapina, O. and Dzyadevych, S. V. (2021). Solutions for enhancement of sensitivity and metrological reliability of conductometric biosensor systems. *Engineering Research Express*, [online] Volume 3(4), p. 045008. Available at: <https://doi.org/10.1088/2631-8695/ac2a0d> [Accessed 14 October 2021].

29. Nikolova, V., et al. (2019). Host–guest interactions between p-sulfonatocalix[4]arene and group IA, IIA metal cations. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, [online] Volume 15, pp. 1321–1332. Available at: <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.131> [Accessed 17 June 2019].
30. Pinalli, R., et al. (2016). The Origin of Selectivity in the Complexation of N-Methyl Amino Acids by Tetraphonation Cavitands. *Journal of the American Chemical Society*, [online] Volume 138(27), pp. 8569–8580. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04372> [Accessed 16 June 2016].
31. Pinalli, R., Pedrini, A. and Dalcanale, E. (2018). Biochemical sensing with macrocyclic receptors. *Chemical Society Reviews*, [online] Volume 47(18), pp. 7006–7027. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8cs00271a> [Accessed 21 September 2018].
32. Puyo-Fourtime, J., et al. (2022). Consistent Picture of Phosphate–Divalent Cation Binding. *The Journal of Physical Chemistry B*, [online] Volume 126(22), pp. 4022–4031. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c01158> [Accessed 24 May 2022].
33. Quaglio, D., et al. (2021). Calixarene: a versatile scaffold for the development of highly sensitive biosensors. *Supramolecular Chemistry*, [online] Volume 33(7), pp. 345–363. Available at: <https://doi.org/10.1080/10610278.2021.2011283> [Accessed 27 December 2021].
34. Rajendran, S., et al. (2019). Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Growth and Remodeling. *Comprehensive Physiology*, [online] Volume 9(3), pp. 1213–1247. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c180026> [Accessed 12 June 2019].
35. Reid, I.O.A. (2026). UV-Vis Spectrophotometric Determination of Multicomponent Pharmaceuticals: Limitations and Strategies. *Journal of Spectroscopy*, [online] Volume 2026, p. 1129092. Available at: <https://doi.org/10.1155/jspe/1129092> [Accessed 13 March 2026].
36. Rodríguez, P.C., et al. (2017). Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, [online] Volume 8, p.

93. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093>
[Accessed 07 February 2017].
37. Saiapina, O., Berketa, K., et al. (2024). Adaptation of Conductometric Monoenzyme Biosensor for Rapid Quantitative Analysis of L-arginine in Dietary Supplements. *Sensors*, [online] Volume 24(14), p. 4672. Available at: <https://doi.org/10.3390/s24144672> [Accessed 18 July 2024].
38. Sandler, Y. (2019). Amino Acids Profiling for the Diagnosis of Metabolic Disorders. *IntechOpen eBooks*, [online] p. e84672. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.84672> [Accessed 08 March 2019].
39. Sardjono, R.E. and Rachmawati, R. (2017). Green Synthesis of Oligomer Calixarenes. *InTech eBooks*, [online] p. e67804. Available at: <https://doi.org/10.5772/67804> [Accessed 05 July 2017].
40. Shah, S.H., et al. (2025). A Comprehensive Review on HPLC: Introduction, Theory, and Applications. *Zenodo*, [online] p. 17951615. Available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.17951615> [Accessed 16 December 2025].
41. Sokolova, L., Pushkarev, V., & Tronko, M. (2019). L-аргінін у нормі та патології. *Ендокринологія*, 24(4), pp. 373–385. Available at: <https://doi.org/10.31793/1680-1466.2019.24-4.373> [Accessed 20 December 2019].
42. Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G., Gonchar, M. and Koval'chuk, Y. (2011). A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. *Journal of Materials Science and Engineering A*, Volume 1(6), pp. 819–827. Available at: https://www.researchgate.net/publication/221937745_A_New_Bi-enzyme_Potentiometric_Sensor_for_Arginine_Analysis_Based_on_Recombinant_Human_Arginase_I_and_Commercial_Urease [Accessed 10 November 2011.].
43. Stasyuk, N., Gayda, G., et al. (2023). Ammonium nanochelators in conjunction with arginine-specific enzymes in amperometric biosensors. *Microchimica Acta*, [online] Volume 191(1), p. 47. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00604-023-06114-1> [Accessed 22 december 2023].

44. Szondi, D., et al. (2021). Arginase Signalling as a Key Player in Chronic Wound Pathophysiology and Healing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, [online] Volume 8, p. 773866. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.773866> [Accessed 29 October 2021].
45. Tian, J., et al. (2022). A facile way to construct sensor array library via supramolecular chemistry. *Nature Communications*, [online] Volume 13(1), p. 3965. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31986-x> [Accessed 25 July 2022].
46. Uttam, B., et al. (2023). Synthetic strategies for the functionalization of upper or lower rim of calix[4]arene. *ARKIVOC*, [online] Volume 2022(6), pp. 254–280. Available at: <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p011.939> [Accessed 31 March 2023].
47. Vazdar, M., et al. (2018). Arginine Magic: Guanidinium Like-Charge Ion Pairing. *Accounts of Chemical Research*, [online] Volume 51(6), pp. 1455–1464. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00098> [Accessed 25 May 2018].
48. Verma, N., Singh, A.K. and Kaur, P. (2015). Biosensor based on ion selective electrode for detection of L-arginine in fruit juices. *Journal of Analytical Chemistry*, [online] Volume 70(9), pp. 1111–1117. Available at: <https://doi.org/10.1134/s1061934815090129> [Accessed 13 August 2015].
49. Verma, N., Singh, A.K. and Singh, M. (2017). L-arginine biosensors: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, [online] Volume 12, pp. 228–239. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.006> [Accessed 06 November 2017].
50. Violi, J.P., et al. (2020). Considerations for amino acid analysis by LC-MS/MS: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, [online] Volume 131, p. 116018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116018> [Accessed 24 August 2020].
51. Wijnands, K.A.P., et al. (2021). Microcirculatory Function during Endotoxemia—A Functional Citrulline-Arginine-NO Pathway. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, [online] Volume 22(21), p. 11940. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222111940> [Accessed 3 November 2021].
52. Wong, Y.Y., et al. (2022). Calixarenes as Host molecules for drug carriers in the cosmetic and medical field. *Macromolecular Research*, [online] Volume 30(12), pp. 853–866. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13233-022-0094-9> [Accessed 06 october 2022].
53. Wu, G., et al. (2021). Role of L-Arginine in Nitric Oxide Synthesis and Health in Humans. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [online] Volume 1332, pp. 167–187. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-74180-8_10 [Accessed 13 July 2021].
54. Yang, Z. and Ming, X. (2013). Arginase: The Emerging Therapeutic Target for Vascular Oxidative Stress and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, [online] Volume 4, p. 149. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00149> [Accessed 12 June 2013].
55. Zhao, M., Lv, J. and Guo, D. (2017). Promising advances of thiacalix[4]arene in crystal structures. *RSC Advances*, [online] Volume 7(17), pp. 10021–10039. Available at: <https://doi.org/10.1039/c6ra25616c> [Accessed 03 February 2017].
56. Zhybak, M., Fayura, L., Boretsky, Y. R., Gonchar, M., Sibirny, A. A., Dempsey, E., Turner, A. and Korpan, Y. I. (2017). Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase. *Microchimica Acta*, [online] Volume 184(8), p. 2679. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2290-4> [Accessed 02 May 2017].