

# BIOSENSOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA COLINEI ÎN MEDII BIOLOGICE COMPLEXE

Carmela Negulescu\*, A. Ciucu\*\*, V. Magearu\*\*\*

## REZUMAT

S-a realizat un sensor enzimatic pentru colină, având la bază un sensor amperometric pentru oxigen, pe suprafața căruia s-a fixat o membrană de dializă conținând colin-oxidaza (ChOx) imobilizată covalent. În scopul imobilizării enzimei pe suprafața membranelor de dializă s-a folosit 2,4-diclor-6-metoxi triazina, un nou derivat al clorurii de cianuril, care spre deosebire de alți derivați monosubstituiți ai acesteia prezintă o serie de avantaje. Timpul de măsurare este de numai 15-20 sec. dacă se utilizează metoda cinetică și de circa un minut dacă se utilizează metoda stării staționare. Electrocul răspunde liniar pe domeniul de concentrații cuprins între  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$  moli/l (metoda cinetică) și  $5 \times 10^{-3}$  –  $10^{-4}$  moli/l (metoda stării staționare).

**Cuvinte cheie:** amperometric, biosensor, colină, clinic

## ABSTRACT

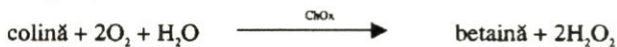
### Amperometric Biosensor for Choline Determination in Complex Biological Matrix

An enzymatic sensor for choline was constructed from an oxygen amperometric sensor on whose surface a dialysis membrane containing covalently immobilized cholin-oxidase was set. Immobilization of enzyme on the dialysis membrane surface was achieved with 2,4-dichloro-6-methoxy-s-triazine, a derivative of cyanuric chloride, which unlike others of its mono-substituted derivatives, ensures some advantages. The time of measurements is about 15-20 sec. for the kinetic method of the initial slope, and about one minute for the steady-state method. The sensor respond linearly to choline in the concentration range  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$  moles/l (kinetic method) and  $5 \times 10^{-3}$  –  $10^{-4}$  moles/l (steady-state method).

**Key words:** amperometric, biosensor, choline, clinical

## INTRODUCERE

Tendința spre simplificarea și automatizarea metodelor de analiză utilizate în laboratoarele chimice, clinice, precum și în cele de monitorizare a mediului a condus la elaborarea unor procedee electrometrice enzimatic de determinare a colinei; dintre acestea metodele bazate pe electrozi enzimatici sunt deseori utilizate în cadrul determinărilor menționate mai sus [5,6,8,9]. Acetilcolina este primul neurotransmițător studiat, iar colina este un metabolit al acestuia. Determinările voltametrice a compușilor oxidabili din lichidele extracelulare precum și determinările in vivo ale unor astfel de compuși (neurotransmițători) este un domeniu de mare interes clinic. În prezenta lucrare se descrie o metodă electrometrică de determinare a colinei, bazată pe un electrod enzimatic, care a fost obținut prin fixarea pe suprafața unui sensor amperometric pentru oxigen a unei membrane de dializă conținând colin-oxidaza (ChOx) imobilizată covalent. Prin introducerea sensorului enzimatic într-o soluție de colină aceasta difuzează spre suprafața electrodului unde are loc reacția catalizată enzimatic:



În urma acestei reacții are loc o scădere a concentrației de oxigen în pelicula de electrolit dintre sensorul de oxigen și membrana de dializă ce conține enzima imobilizată. Scăderea concentrației de oxigen este direct proporțională cu concentrația de colină din soluțiile probelor de analizat.

## EXPERIMENTAL

### Reactivi și soluții

În cadrul determinărilor s-a folosit ChOx (EC 1.1.3.17) din *Alcaligenes* sp. cu o activitate specifică de 225 UI/mg solid obținută de la Sigma Chem. Co., USA. Pentru prepararea soluțiilor diluate standard de colină s-a utilizat clorura de colină (Sigma); acestea au fost preparate în soluție tampon fosfat 50 mM, pH=8,0. În scopul imobilizării enzimei s-au folosit membrane de dializă tip C (Technicon Corp. Nr. 105-1058). Triclor triazina a fost obținută de la firma (Fluka). Reactivii folosiți au fost de puritate analitică.

### Prepararea membranelor enzimatic

În scopul realizării electrodului enzimatic, ChOx a fost imobilizat pe suprafața membranelor de dializă printr-o metodă descrisă anterior [1,2], cu mențiunea că în acest caz s-a utilizat o soluție de ChOx concentrație proteică finală 1 mg/ml.

Imobilizarea covalentă a colin oxidazei pe suprafața membranelor de dializă, având un diametru de 2,5 cm, a avut la bază reactivul de cuplare 2,4-diclor-6-metoxi triazina, care a fost sintetizat în laborator, plecând de la triclor triazina.

Reacția de cuplare a fost lăsată să decurgă timp de 24 de ore la temperatura camerei și pH 7.5. În final membranele enzimatic au fost spălate de 4 ori, timp de 5 minute, cu câte 50 ml apă distilată și apoi de două ori cu câte 50 ml de soluție NaCl de concentrație 1 M.

\* Biochimist drd. Carmela Negulescu, Wyeth Whitehall, București

\*\* Prof. dr. Anton Ciucu, Catedra de Chimie Analitică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

\*\*\* Prof. dr. Vasile Magearu, Catedra de Chimie Analitică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

Membranele enzimatic astfel obținute sunt utilizate la construcția electrodului enzimatic. Ele pot fi păstrate în soluție tampon, sau în stare uscată la 4°C fără să-și piardă din activitate, timp de câteva luni.

Activitatea enzimei imobilizate s-a determinat printr-un procedeu electrometric descris în lucrări anterioare [3]. În acest caz, electrodul de oxigen, fără membrană enzimatică, este introdus în 6,0 ml amestec de reacție termostatat la 25°C, conținând tamponul și colina în concentrație optimă (22,2 mM). În urma echilibrării electrodului, reacția este inițiată prin introducerea în amestecul de reacție a unei porțiuni din membrana activă. În condițiile determinării activității enzimatică a ChOx are loc o scădere a concentrației de oxigen în sistemul de determinare și se înregistrează curentul în funcție de timp, obținându-se o variație liniară. Calibrarea electrodului pentru oxigen s-a realizat prin două puncte, unul corespunzător punctului zero, realizat cu o soluție de sulfat de sodiu 5% și altul corespunzător unei soluții de apă distilată saturată cu aer, la 25°C, care conține 8,18 mgO<sub>2</sub>/l [7].

Înainte de a fi utilizate în construcția biosensurului membranele enzimatic au fost testate repetat timp de 5 minute, la 25°C, în diferite soluții de determinare, până când s-a obținut o activitate enzimatică constantă. Așa cum rezultă din figura 1 după 5-6 spălări nu mai apare nici o scădere a activității enzimatică. Scăderea activității enzimatică s-a datorat desorbției unor cantități de enzimă activă de pe suprafața membranei de dializă. Activitatea enzimatică relativă a ChOx a fost de 82-84%. Între determinări membranele se spală cu soluție tampon.

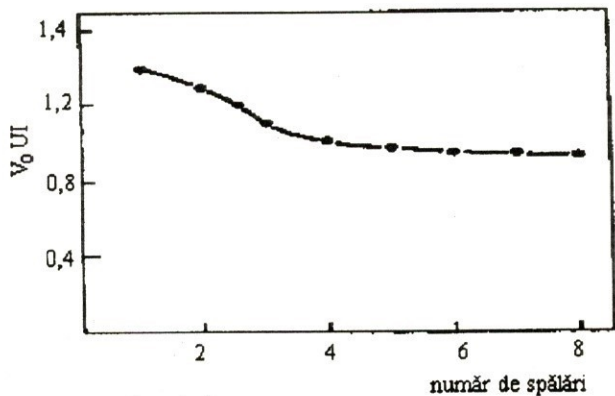


Fig. 1. Efectul spălărilor repetate asupra activității ChOx

**Aparatură**

Schema sensorului enzimatic este prezentată în figura 2. Aceasta constă dintr-un sensor amperometric pentru oxigen (Yellow Springs Instruments Co.) care funcționează pe sistemul Au/Ag, polarizat la -0,8 V, prevăzut cu o membrană de teflon permeabilă pentru oxigen, pe suprafața căruia s-a fixat cu ajutorul unor inele de cauciuc membrana enzimatică.

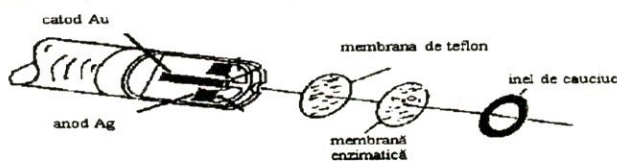


Fig. 2. Reprezentarea schematică a biosensurului pentru colină

Sensurul amperometric este prevăzut cu doi termistori care permit compensarea efectelor temperaturii asupra membranei și în același timp urmărirea continuă a temperaturii în interiorul celei de reacție. Ca electrolit intern s-a folosit KCl 0,5 M.

În figura 3, este redat montajul folosit pentru înregistrarea semnalului analitic al sensorului.

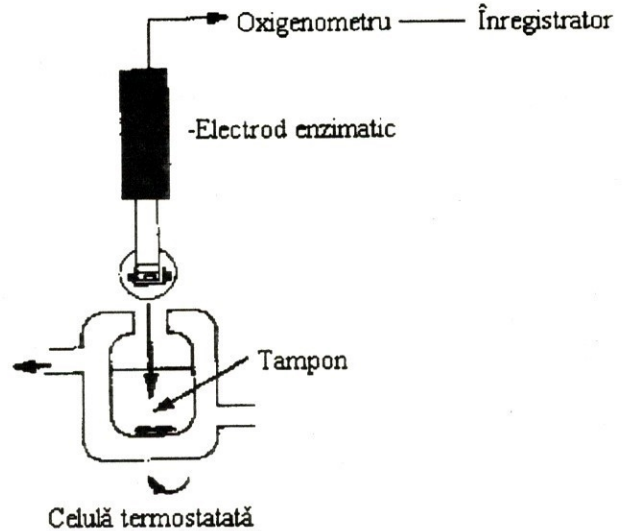


Fig. 3. Schema montajului folosit pentru înregistrarea semnalului biosensurului

El constă din celula de reacție termostată, electrodul enzimatic, oxigenometru (Yellow Springs Instruments Co), care permite citirea directă a temperaturii și a concentrației de oxigen dizolvat în mg/l și un înregistrator (Tacussel Type EPL 1B), a cărui scală a fost calibrată în mg O<sub>2</sub>/l. Concentrația oxigenului din soluțiile probelor utilizată în calcul a fost exprimată în mmoli O<sub>2</sub>/l.

**Procedeu de determinare**

Determinările s-au efectuat la o temperatură de 25°C ± 0,1°C realizată cu ajutorul unui ultratermostat și la un pH = 8,0 menținut constant cu ajutorul tamponului fosfat 50 mM. De asemenea toate măsurătorile s-au efectuat sub agitare continuă și constantă, realizată cu ajutorul unui agitator magnetic. După fiecare măsurare, electrodul a fost spălat prin introducerea lui în soluția tampon, iar între determinări el a fost păstrat în aceeași soluție tampon la 4°C.

Soluțiile probelor aduse la volum constant de 10 ml, sunt saturate cu oxigen, prin barbotare de oxigen timp de 2 minute. Electrodul a fost echilibrat inițial în soluția tampon, timp de 2 minute. În aceste condiții oxigenul la saturație a fost responsabil pentru curentul obținut la timp t = 0; acest curent constant a fost utilizat drept linie de bază.

Prin introducerea electrodului în soluțiile probelor, are loc oxidarea colinei prin intermediul ChOx din membrană, ceea ce a condus la o scădere a concentrației de oxigen din jurul membranei de teflon, care s-a tradus printr-o scădere a semnalului analitic, care a fost înregistrat grafic. După aproximativ 1 minut de la introducerea electrodului în soluțiile probelor s-a obținut curentul stării staționare.

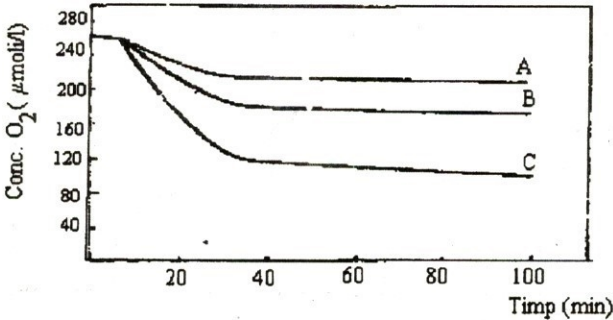
Graficul de calibrare s-a obținut prin două metode și anume: (i) prin metoda stării staționare, în care s-a măsurat curentul corespunzător acestei stări, obținut după 1 minut, a cărei valoare a fost exprimată în mmoli O<sub>2</sub> consumați/l și (ii)

prin metoda pantei inițiale, în care s-a calculat viteza inițială a reacției ca fiind panta dreptei la graficul  $i = f(t)$ , la timpul  $t = 0$ ; toate vitezele inițiale au fost exprimate ca mmoli  $O_2$  consumați/ minut.

În cazul determinării colinei din probe biologice (sânge), electrodul a fost introdus în 9,0 ml soluție tampon fosfat 50 mM, pH=9,0, la care s-a adăugat 1,0 ml din probele de sânge. Metoda amperometrică de determinare a colinei din sânge având la bază electrodul enzimatic, a fost comparată în mod direct cu procedeul spectrometric cel mai des folosit în laboratoarele clinice [10]. În condițiile determinării colinei din sânge a fost necesară deproteinizarea prealabilă a probelor care s-a realizat prin precipitare cu acid tricloracetic. În cazul plasmei sau a serului metoda se poate aplica și fără deproteinizarea prealabilă a probelor.

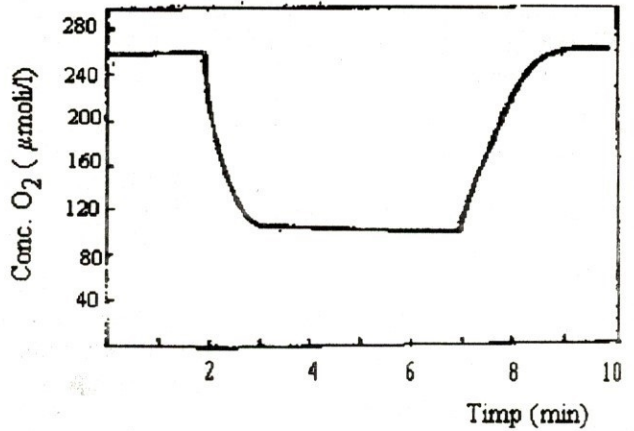
### Rezultate și discuții

În figura 4 sunt redată curbele tipice de răspuns ale electrodului pentru colină. După cum se observă din figură, semnalul obținut scade cu timpul până în momentul obținerii unei stării staționare. Viteza inițială este liniară și atinge o valoare maximă în primele 15-20 sec., iar curentul stării staționare se obține după aproximativ un minut. Timpul de răspuns al sensorului depinde, după cum bine se știe [4], de grosimea membranei, concentrația de enzimă și de substrat de temperatură.



**Fig. 4. Curbele de răspuns ale electrodului pentru colină. Concentrațiile soluțiilor de colină sunt:  $10^{-3}$  M (A),  $2,5 \times 10^{-3}$  M (B) și  $5 \times 10^{-3}$  M (C).**

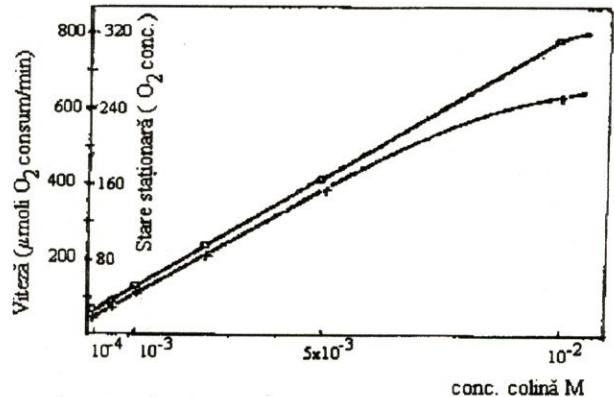
Timpul de revenire al sensorului pentru o soluție de colină de concentrație de  $5 \times 10^{-3}$  moli/l este redat în figura 5. Pentru determinarea acestui parametru, sensorul a fost introdus inițial timp de 2 minute în soluția tampon fosfat saturată cu oxigen, după care în soluția probei timp de 5 minute, în final el fiind reintrodus în soluția inițială. După cum se observă din figură, au fost necesare circa 2 minute pentru a se ajunge la valoarea inițială a semnalului generat de sensor. În cazul soluțiilor mai diluate de colină, atât timpul de răspuns cât și cel de revenire sunt mai mici, fapt demonstrat și de alți autori [8,9].



**Fig. 5. Timpul de revenire al electrodului pentru o soluție de colină de concentrație  $5 \times 10^{-3}$  M**

Figura 6, prezintă curba de calibrare pentru electrodul de colină, bazată pe viteza inițială care rezultă în perioada primelor 15 secunde. Se prezintă de asemenea și curba de calibrare bazată pe curentul stării staționare. Fiecare punct din grafic reprezintă o medie a trei determinări. Reproducibilitatea determinărilor a fost aproximativ 2% în cazul măsurătorilor de viteză și mai mică decât 1% pentru măsurările curentului stării staționare.

În cazul în care în sistemul de determinare sunt prezente impurități care interferă și care generează un curent de fond mare, se preferă metoda vitezei inițiale, deoarece curentul de bază are un efect minim asupra măsurării vitezei. Metoda stării staționare poate fi de asemenea utilizată cu succes, în cazul în care, în paralel cu sensorul enzimatic se utilizează un alt electrod, similar cu electrodul enzimatic, dar fără membrană enzimatică, răspunsul acestuia din urmă fiind scăzut din cel al electrodului pentru colină, prin intermediul unui amplificator diferențial, sau al oricărei alte tehnici de scădere.



**Fig. 6. Curba de calibrare pentru colină. (x) metoda curentului stării staționare (axa curentului mmoli  $O_2$  consumați/l); (o) metoda vitezei inițiale de reacție (axa vitezei mmoli  $O_2$  consumați/minut)**

După cum se observă din figură, sensorul enzimatic prezintă un răspuns liniar pe domeniul de concentrații de colină cuprins între  $10^{-4}$  -  $7,5 \times 10^{-3}$  moli/l (curba stării

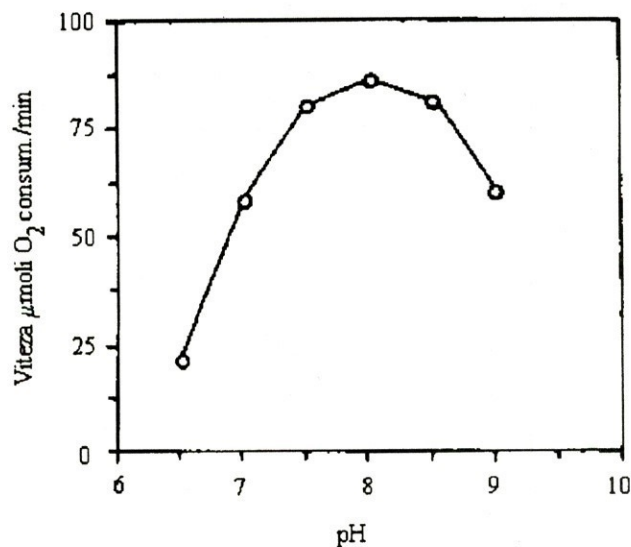
staționare) și respectiv  $10^{-1} - 10^{-2}$  moli/l (curba vitezei inițiale). Pentru concentrațiile de colină mai mari de  $10^{-2}$  M, răspunsul electrodului a fost neliniar, fapt demonstrat și de alți autori [8,9].

În tabelul 1, se prezintă comparativ valorile cantităților de colină obținute din graficul de calibrare al electrodului enzimatic (metoda vitezei inițiale) cu cele adăugate în sistemul de determinare dintr-o soluție standard de colină de concentrație 1 M. Eroarea medie procentuală a valorilor obținute din graficul de calibrare a fost de 2%.

**Tab.1** Comparație între valorile cantităților de colină adăugate și cele obținute din curba de calibrare

Nr.	Colină adăugată mg/100 ml	Colină găsită mg/100 ml	Eroare (%)	Eroare medie (%)
1.	36	35,4	-1,6	
2.	72	71,0	-1,4	
3.	108	105,8	-2,0	
4.	144	140,6	-2,4	
5.	162	157,4	-2,8	-2,0

S-a studiat efectul pH-ului asupra răspunsului electrodului pe domeniul cuprins între 6,5 și 9,0. Curba vitezei inițială - pH pentru o soluție de colină de concentrație  $5 \times 10^{-3}$  moli/l, este redată în figura 7. Din graficul respectiv se constată că ChOx imobilizate prezintă o activitate maximă în jurul valorii de 8,0 (pentru metoda vitezei inițiale), valoare identică cu cea a enzimei solubile. În general profilul curbei pe domeniul de pH utilizat este similar cu cel al curbei activitate-pH pentru ChOx solubilă. Se poate afirma deci, că prin imobilizare, enzima nu-și modifică stabilitatea față de pH și nici valoarea pH-ului optim, datele fiind comparabile cu cele existente în literatura de specialitate [8,9,4].

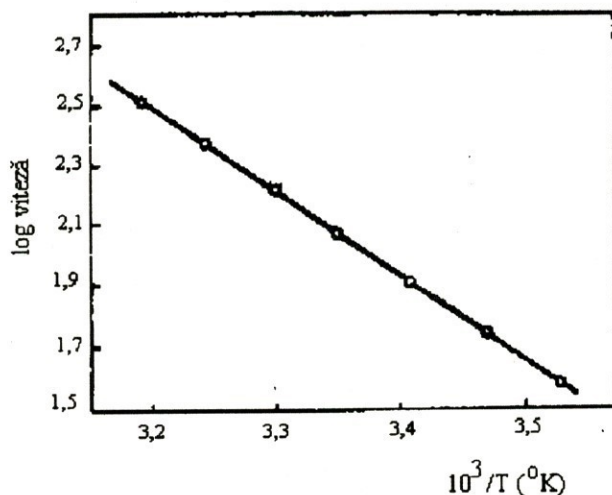


**Fig. 7.** Efectul pH-ului asupra răspunsului electrodului pentru colină. (o) metoda cinetică.

S-a studiat influența temperaturii asupra răspunsului electrodului pe domeniul cuprins între 10-40°C, folosindu-se în acest caz o soluție de colină de concentrație  $5 \times 10^{-4}$  moli/l. Rezultatele obținute sunt redată grafic în figura 8 din care rezultă că pe domeniul menționat între logaritmul răspunsului electrodului (obținut prin metoda cinetică) și  $1/T$  ( $^{\circ}\text{K}$ ) există

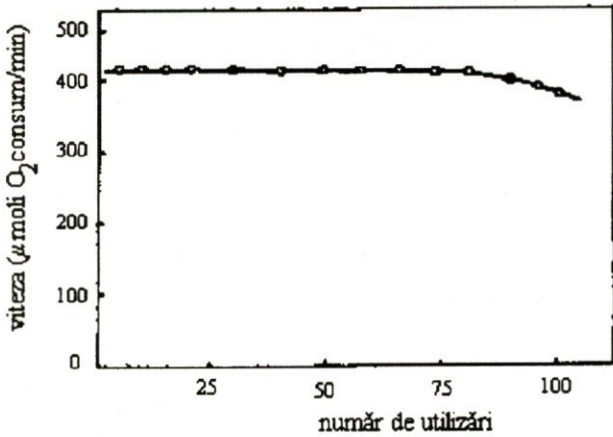
o dependență liniară.

Din cinetica enzimatică, se cunoaște că temperatura are 2 efecte asupra vitezei de reacție. Astfel, inițial are loc o creștere a vitezei de reacție cu temperatura, care este în acord cu legea lui Arrhenius, până în momentul atingerii unei viteze maxime, iar ulterior, peste temperatura corespunzătoare acestei viteze, are loc o scădere a vitezei de reacție datorată trecerii enzimei din forma nativă în forma denaturată. Graficul linear din figura 8, indică faptul că pe domeniul îngust de temperatură folosit nu a avut loc o denaturare a ChOx și de asemenea că sensibilitatea metodei poate fi mărită dacă este necesar, prin folosirea unor temperaturi mai mari decât 25°C. Utilizarea unor temperaturi mai mari sau mai mici decât 25°C, conduce însă la modificarea concentrației unuia dintre reactanți și anume oxigenul. În cadrul determinărilor, s-au făcut corecțiile necesare pentru concentrația oxigenului din soluțiile probelor la diferite temperaturi. Prin folosirea unor temperaturi mai mari decât 25°C scade atât solubilitatea oxigenului cât și stabilitatea în timp a ChOx și prin aceasta se micșorează efectul generat de creșterea temperaturii.



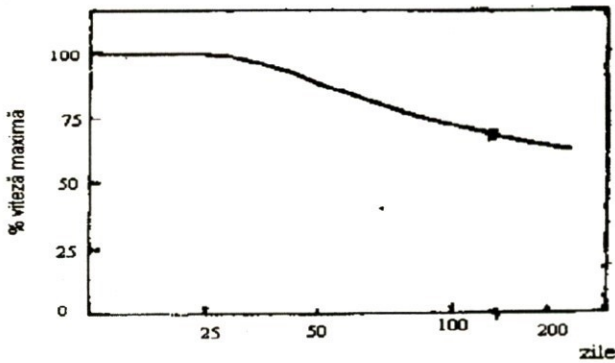
**Fig.8.** Efectul temperaturii asupra răspunsului electrodului pentru colină. Metoda cinetică.

S-a studiat deasemenea, stabilitatea electrodului enzimatic atât pe parcursul folosirii lui repetate cât și în timp. În primul caz, electrodul a fost introdus într-o soluție de colină de concentrație  $5 \times 10^{-3}$  moli/l saturată cu oxigen, timp de 3 minute, după care el a fost introdus în soluția tampon fosfat saturată cu oxigen, timp de alte 3 minute. După cum se observă din figura 9, în urma repetării acestei operații de 75 de ori, nu s-a constatat nici o scădere a valorii semnalului analitic al sensorului, după care răspunsul acestuia începe să scadă lent.



**Fig.9. Semnalul electrodului enzimatic în condițiile folosirii repetate**

În al doilea caz, s-a studiat răspunsul electrodului față de soluția de colină menționată mai sus, cel puțin o dată pe săptămână timp de mai multe luni, rezultatele obținute fiind redată grafic în figura 10. Din aceasta se observă că electrodul a prezentat un răspuns maxim și aproximativ constant timp de 20-25 de zile, după care acesta începe să se modifice datorită scăderii activității ChOx imobilizate, ca rezultat al denaturării lente, în timp a enzimei.



**Fig.10. Stabilitatea în timp a electrodului pentru colină**

Totodată, în urma acestor studii s-a constatat că electrodul pentru colină a prezentat o scădere de aproximativ 6% din răspunsul maxim (metoda cinetică) prin păstrare mai mult de 6 săptămâni la 4°C. În această perioadă s-au efectuat peste 30 de măsurători pe diferite probe de colină.

### Interferențe și specificitate

Colinoxidaza prezintă o mare specificitate de substrat și de aceea numărul interferențelor posibile în cadrul metodei amperometrice prezentate este mult mai redus comparativ cu cele care pot apărea în cadrul altor metode chimice. Colinoxidaza este inhibată de următorii cationi:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , care pot interfera deci în răspunsul electrodului.

### Analize pe probe reale

Conținutul de colină din 6 probe diferite de sânge deproteinizat în prealabil a fost determinat comparativ prin cele 2 metode, amperometrică și spectrometrică. Rezultate obținute sunt trecute în tabelul 2. Din examinarea datelor se

poate afirma că între cele 2 metode există o bună corelație.

**Tab.2**

**Rezultatele obținute prin analiza a 6 probe diferite de sânge din punctul de vedere al concentrației în colină**

Nr crt.	Colină (mg/100 ml)	
	Spectrometric	Electrometric
1	101	102
2	130	132
3	150	151
4	160	160
5	167	167
6	174	175

În continuare s-au studiat interferențele posibile în cadrul metodei amperometrice în condițiile măsurării concentrației de colină din probele de sânge. În acest sens, dintr-o soluție standard de colină de concentrație 1M, s-au adăugat în amestecul de reacție menționat anterior volume cuprinse între 10-90 ml. În tabelul 3 sunt prezentate comparativ valorile cantităților de colină obținute în aceste condiții din graficul de calibrare al electrodului enzimatic cu cele adăugate din soluțiile standard în sistemul de determinare. Eroarea medie procentuală obținută din graficul de calibrare în condițiile menționate este aproximativ egală cu cea obținută în cazul folosirii numai a soluțiilor apoase de colină, ceea ce indică lipsa interferențelor în cadrul metodei elaborate.

**Tab.3**

**Comparație între valorile cantităților de colină standard adăugate și cele obținute din curba de calibrare în condițiile unei probe de sânge**

Nr. Crt.	Colină (mg/100 ml) adăugată	Colină (mg/100 ml) găsită	Colină regăsită (%)
1	0	70,0	
2	18	87,6	97,7
3	36	105,1	97,5
4	54	122,7	97,6
5	90	157,5	97,2
6	108	175,4	97,6

Pentru studierea prezenței sau absenței inhibitorilor și/sau a activatorilor ChOx în soluțiile probelor analizate la sfârșitul fiecărei determinări cu electrodul enzimatic, s-a verificat calibrarea acestuia într-un singur punct. În urma acestor studii nu s-a constatat prezența vreunui inhibitor sau activator natural al enzimei.

### CONCLUZII

Electrodul enzimatic realizat este selectiv pentru colină, el putând fi utilizat în cadrul unei metode simple și directe de măsurare a colinei, selectivitatea lui permițând dozarea acesteia în medii complexe. Timpul de măsurare este de numai 15 secunde (metoda cinetică) și de circa 1 minut (metoda stării staționare). Electrodul permite utilizarea repetată a colinoxidazei, precum și a soluțiilor probelor, deoarece în cadrul unei determinări numai o porțiune mică din probă, și anume cea din jurul membranei este descompusă. Pe parcursul testării și păstrării electrodului pentru colină s-a constatat că membranele enzimatic prezintă o stabilitate mecanică bună ele fiind rezistente la acțiunea

bacteriană. Electrofulul a prezentat o scădere de aproximativ 6% din răspunsul maxim prin păstrare mai mult de 6 săptămâni la 4°C. Comparativ cu alți electrozi similari acesta prezintă avantajele: stabilitate și un timp de viață mai mare, posibilitatea regenerării lui rapide la un preț de cost redus prin simpla înlocuire a membranei enzimatică. El poate fi utilizat atât în cadrul analizelor unor probe discrete cât și în flux continuu.

---

#### BIBLIOGRAFIE

1. Ciucu A., Magearu V., Luca C., "Enzyme electrode for hydrogen peroxide", *Anal. Lett.*, **18** (1985) 299-313.
2. Ciucu A., "A new method for covalent binding of proteins to dialysis membrane activated with 2,4-dichloro-6-methoxy-s-triazine", *Rev. roum. Biochim.*, **26**(3) (1989) 193-200.
3. Ciucu A., "An amperometric study of physico-chemical properties of glucose-oxidase and catalase covalently immobilized on dialysis membrane", *Rev. roum. Biochim.*, **26**(3) (1989) 187-192.
4. Curulli A., Drăgulescu S., Cremisini C., Palleschi G., *Electroanalysis*, "Bionzyme amperometric probes for choline and choline esters assembled with nonconducting

*electrosynthesized polymers*" **13**(3) (2001) 236-242.

5. Ghindilis A.L., Morzunova T.G., Barmin A.V., Kurochkin I.N., "Potentiometric biosensor for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis", *Biosens. Bioelectron.*, **11** (1996) 873-880.

6. Katsu T., Kayamoto T., "Determination of cholinesterase in blood serum with a bezoate sensitive membrane electrode", *Anal. Chim. Acta*, **254** (1991) 95-97.

7. Karlsson R., Torstensson I.G., "Calibration of the oxygen electrode", *Talanta*, **21** (1974) 975-980.

8. Mascini M., Moscone D., "Amperometric acetylcholine and choline sensors with immobilized enzymes", *Anal. Chim. Acta*, **179** (1986) 439-444.

9. Palleschi G., Lavagnini M.G., Moscone D., Pilloton R., D'Ottavio D., Evangelisti M.E., "Determination of serum cholinesterase activity and dibucaine numbers by an amperometric choline sensor", *Biosens. Bioelectron.*, **5** (1990) 27-35.

10. Whittaken M., Britten J.J., Dawson P.J.G., "Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants", *Clin. Chem.*, **29** (1983) 76-81.