

УДК 543.866

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А***Э.П. Медянцева, Х. Май Тхи Тхань, Р.М. Варламова,
Е.Ю. Тарасова, Г.Р. Саханова, Г.К. Будников***Аннотация**

Предложены новые амперометрические биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками (МУНТ), и иммобилизованных ферментов: цистеиндесульфгидразы, щелочной фосфатазы и холинэстеразы для определения охратоксина А. Действие биосенсоров основано на ингибирующей способности охратоксина А. Сопоставлены аналитические возможности биосенсоров на основе модифицированных и немодифицированных электродов. Область концентраций определения охратоксина А составляет $1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-11}$ моль/л. Использование МУНТ для модификация электродов обеспечивает расширение области определяемых концентраций, позволяет наблюдать хорошо выраженный эффект ингибирования и более низкие пределы определения. Показана возможность определения охратоксина А в продуктах питания на уровне значений ПДК и ниже.

Ключевые слова: охратоксин А, микотоксины, амперометрический биосенсор, холинэстераза, цистеиндесульфгидраза, щелочная фосфатаза, углеродные нанотрубки, зерновые культуры.

Введение

Загрязненность продуктов питания и кормов для сельскохозяйственных животных микотоксинами представляет реальную угрозу здоровью населения. Поскольку микотоксины относятся к одной из наиболее опасных групп токсикантов, вполне обоснован интерес исследователей к разработке современных способов их определения.

Охратоксин А (ОТА) рассматривают как наиболее опасный и распространенный токсикант. Жизнедеятельность плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium* чаще всего приводит к загрязнению ОТА зерна и продуктов на его основе, а также кофейных зерен и какао, сушеных фруктов, вина и виноградного сока, пива, специй [1]. При этом ОТА с продуктами растительного и животного происхождения может попадать в организм человека. Поскольку ОТА вызывает целый ряд негативных последствий для здоровья человека (оказывает нефротоксичное, гепатотоксичное, тератогенное, канцерогенное и иммунодепрессивное действие [2]), необходим контроль за его содержанием в продуктах питания и кормах для сельскохозяйственных животных. Все это указывает на необходимость разработки методов количественного определения ОТА.

Для определения ОТА в продуктах питания в последние годы наиболее часто применяют хроматографические методы: высокоэффективную жидкостную

хроматографию, тонкослойную хроматографию, жидкостную хроматографию и их сочетание с масс-спектрометрической или флуоресцентной детекцией [3–5].

Хроматографические методы обладают, как правило, достаточно высокой чувствительностью обнаружения и относительно высокой избирательностью. Тем не менее проведение определений этими методами занимает много времени, зачастую требует операций пробоподготовки, в том числе и процедуры предварительной концентрации.

Признанной альтернативой и дополнением к известным хроматографическим аналитическим методам обнаружения таких микотоксинов, как ОТА, служат иммунохимические методы [6] и использование биосенсоров [7, 8], в том числе и ряд ДНК-сенсоров [9, 10].

Биосенсорные устройства позволяют проводить экспрессное определение загрязнителей в полевых условиях и не требуют высококвалифицированного персонала. Анализ литературы показывает, что использование биосенсорных технологий имеет определенные преимущества по сравнению с другими методами определения широкого круга биологически активных веществ.

Следует отметить и тот момент, что примеры разработок биосенсоров, а именно ферментных сенсоров для определения микотоксинов пока немногочисленны, причем используется ограниченный круг ферментов. В полной мере это относится к определению ОТА.

В частности, предложен амперометрический ферментный сенсор на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на поверхность печатных графитовых электродов в виде полипиррольной пленки [11]. В другой работе те же авторы предложили усовершенствованный вариант пероксидазного биосенсора для определения ОТА, который отличается от предыдущего способом иммобилизации фермента. Использована возможность нанесения раствора пероксидазы хрена путем трафаретной печати совместно с графитосодержащими чернилами [12].

Актуальность проблемы селективного определения отдельного микотоксина привела к разработке иммуносенсоров [13]. Следует отметить, что в качестве метки в работе [14] применяли также пероксидазу хрена. При этом использовали золотые электроды, модифицированные карбоксиметилированным декстраном, а в качестве субстрата пероксидазы – дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций от 0.01 до 100 мкг/л при погрешности определения не более 8%. Предел обнаружения был на уровне 0.05 мкг/л.

Современный подход к совершенствованию и разработке новых амперометрических биосенсоров связан с различными способами модификации поверхности первичных преобразователей с целью придания им заданных свойств. Наноматериалы являются наиболее перспективными материалами для огромного множества приложений в композитных материалах, химических источниках тока, в электронике и т. д. [15]. В частности, углеродные нанотрубки (УНТ) благодаря своим уникальным электронным и оптоэлектронным свойствам весьма перспективны для использования в качестве основы для создания миниатюрных биосенсорных устройств, что связано, наряду с их размерами, также с улучшением аналитических характеристик, главной из которых является высокая чувствительность к присутствию на модифицированной поверхности молекул

различного типа. Такой подход оказался весьма перспективным для совершенствования поверхности используемых первичных преобразователей [16], что открывает новые возможности в плане разработки биосенсоров, предназначенных для определения микотоксинов разных классов.

Цель исследования состояла в разработке новых амперометрических биосенсоров на основе немодифицированных и модифицированных углеродными нанотрубками электродов и иммобилизованных ферментов: цистеиндесульфгидразы (ЦДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и холинэстеразы (ХЭ) для определения ОТА и оценки их характеристик при анализе зерновых культур.

1. Экспериментальная часть

1.1. Аппаратура и оборудование. Основой биосенсоров служила система планарных электродов, состоящая из рабочего и вспомогательного электродов, а также электрода сравнения (фирма BVT Technologies, Брно, Чехия). Материалом поверхности рабочего электрода, на который иммобилизовали фермент, являлась платиносодержащая паста. Из платины изготовлен и вспомогательный электрод, электрод сравнения – из серебра. Объем рабочей ячейки системы составлял 200 мкл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора МЕВ (Чехия) с компьютеризированным управлением.

1.2. Реактивы. В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин хлорид (БТХХ) (ICN Biomedicals Inc., США), L-цистеин (Sigma) и 1-нафтил фосфата моносодержащую соль марки «ч.д.а.» («Диа», Россия), растворы которых готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более трех часов. Применяли бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади с активностью 30 АЕ/мг, изготовленную НПО «Биомед» (Россия, г. Пермь) и щелочную фосфатазу с активностью 1000 АЕ/мг (Sigma, Германия). Как источник L-цистеиндесульфгидразы использовали гомогенат из проростков зерновых культур и листьев огурца. Зерновую культуру и огурцы выращивали из семени в почве для рассады. Высаживали на глубине 1.5–2 см. Выращивание растительного материала проводили в стандартных условиях [17]. Для приготовления гомогената растительный материал мелко нарезали и растирали пестиком в замороженной ступке, заливали 0.1 М фосфатным буферным раствором с pH 7.6 в соотношении 1 : 3, процеживали суспензию через двойной марлевый слой и добавляли 0.5 М раствор сахарозы.

Применяли 1%-ный раствор глутарового альдегида фирмы ICN и бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы Reanal (Венгрия).

В работе использовали МУНТ с линейными размерами от 2–6 до 10–15 нм производства Sigma-Aldrich.

Использовали хроматографически чистый препарат охратоксин А (раствор ОТА в смеси бензола и уксусной кислоты в соотношении 99 : 1.) из государственных стандартных образцов (изготовитель: ГНУ ВНИИВСГЭ, г. Москва) (см. рис. 1).

Для получения рабочего раствора из стандартного образца ОТА проводили вакуумную отгонку бензола и уксусной кислоты при комнатной температуре.

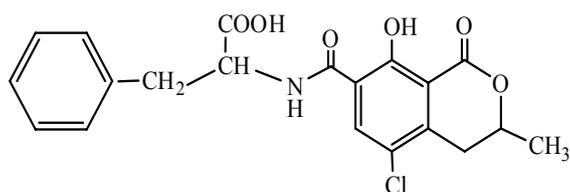


Рис. 1. Структурная формула ОТА (7-карбоксо-5-хлоро-8-гидрокси-3,4-дигидро-3R-метилизокумарин-7-L-β-фенилаланина)

Полученный препарат ОТА взвешивали и использовали для приготовления рабочих растворов путем их растворения в 1 мл ацетонитрила, а затем в бидистиллированной воде.

1.3. Подготовка углеродных нанотрубок. Для модификации рабочей поверхности биосенсоров использовали МУНТ, которые предварительно очищали от остаточных количеств оксидов переходных металлов, а также аморфного углерода, обработкой растворами кислот (1 М HNO₃ : 3 М H₂SO₄), а затем ультразвуком, используя ультразвуковую ванну (WiseClean модель WUC-A03H, DAIHAN Scientific Co. Ltd, Korea), с частотой 40 КГц в течение 2–4 ч до получения гомогенного раствора. Затем отделяли УНТ от маточного раствора с помощью центрифуги, многократно (5–6 раз) обрабатывали водой до нейтральной реакции (до pH 7.0) [18]. Обработанные УНТ высушивали до постоянной массы и взвешивали. Затем солюбилизировали МУНТ в N,N-диметилформамиде с помощью ультразвука до получения гомогенного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Полученные растворы УНТ использовали для модификации поверхности электродов.

1.4. Получение ферментных сенсоров. А) Для получения биочувствительной части ХЭ-, ЦДГ- и ЩФ-биосенсоров на поверхность рабочего электрода наносили раствор, содержащий ферментные препараты. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента с концентрацией 20 нкат/мкл, раствор БСА, фосфатный буфер (50 мМ, pH 7.0), 1%-ный раствор глутарового альдегида и дистиллированную воду. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси.

Б) Для получения нового варианта биосенсоров использовали электроды с модифицированной УНТ поверхностью рабочего электрода. Для этого наносили по 0.5 мкл 1 мг/мл раствора МУНТ на поверхность электродов. Затем электроды высушивали в течение 1–2 ч при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером (pH 7.0) 5 мин. После этого на поверхность рабочего электрода наносили 1 мкл смеси, содержащей фермент и остальные компоненты, то есть смеси, приготовленной аналогично варианту А.

Полученные таким образом биосенсоры оставлялись на ночь в закрытой чашке Петри при +4°C. На следующий день биосенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

При модификации поверхности рабочего электрода варьировали количество раствора УНТ (то есть количество УНТ на единицу поверхности электрода

от 1 до 0.2 мкл), наносимого на поверхность планарного электрода. Экспериментально было установлено, что 0.5 мкл раствора УНТ позволяет получить более воспроизводимую однородную рабочую поверхность электрода, обеспечивающую получение достаточного по величине аналитического сигнала, поэтому в дальнейшем использовали именно такое количество раствора УНТ для модификации поверхности.

Биосенсоры, хранящиеся в холодильнике, сохраняют каталитическую активность фермента в течение месяца с погрешностью не более 5–6%.

2. Результаты и их обсуждение

Как следует из литературных данных, примеры практического использования биосенсоров для определения ОТА на сегодняшний день немногочисленны и основаны на использовании ограниченного круга ферментов [11, 12]. Разработка новых амперометрических биосенсоров неразрывно связана с поиском новых источников ферментов. Поэтому представляет интерес применение для этих целей других ферментов или их содержащих препаратов.

Перспективным является использование в биосенсорах гомогенатов растительных и животных тканей в качестве ферментных препаратов. Гомогенаты растительных и животных тканей содержат достаточное количество ферментов и могут служить доступным источником ферментных препаратов, а их использование возможно без сложной предварительной обработки. Кроме того, ферменты в тканях находятся в естественном для них окружении и поэтому часто более устойчивы во времени, срок эксплуатации биосенсоров на основе гомогенатов тканей может быть больше, ткани более дешевы, чем очищенные ферменты, ферменты в гомогенатах меньше подвержены инактивации под действием pH, температуры или ингибиторов фермента благодаря естественному окружению, за счет чего и наблюдается большая стабильность тканевых материалов. Согласно литературным данным, гомогенат из листьев огурца [19] и проростков пшеницы [17] содержит достаточное количество цистеиндесульфгидразы – фермента, относящегося к классу лиаз (К. 4.4.1.1), а процесс его получения не требует сложных аналитических операций. Предварительные исследования показали, что ОТА может проявлять в определенных условиях свойства ингибитора этого фермента [20].

Биосенсоры на основе иммобилизованной ХЭ или ЩФ достаточно активно используются для определения различных эффекторов [21, 22]. В то же время сведения о действии ОТА на каталитическую активность этих достаточно доступных ферментов практически отсутствуют. Поэтому представляло интерес исследовать влияние ОТА на каталитическую активность перечисленных ферментов в составе амперометрических биосенсоров.

2.1. Природа формирования аналитического сигнала биосенсоров.

Цистеиндесульфгидразный биосенсор. Цистеиндесульфгидраза обладает определенной каталитической активностью по отношению к цистеину. Фермент катализирует распад L-цистеина с образованием пировиноградной кислоты, аммиака и сероводорода [19]:



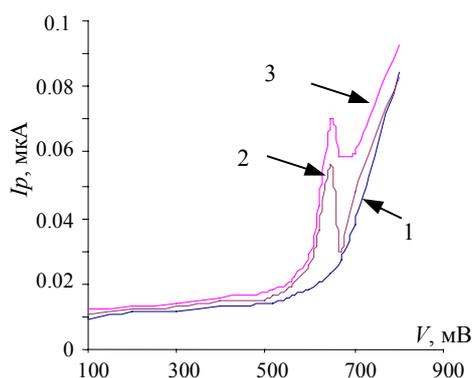


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления раствора $1 \cdot 10^{-3}$ М цистеина на фоне фосфатного буферного раствора с рН 7.6 (1) в присутствии ЦДГ (2) и в отсутствие ЦДГ (3) из проростков пшеницы

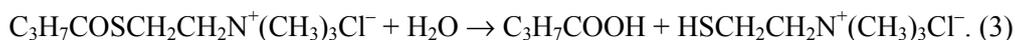
Наблюдается изменение высоты анодного пика электроокисления цистеина при потенциале +0.70 В на фоне фосфатного буферного раствора с рН 7.6 в присутствии фермента. В условиях эксперимента (рН 7.6) цистеин, субстрат ЦДГ, окисляется до цистина по электрохимической реакции



На вольтамперограммах электроокисления раствора цистеина в отсутствие цистеиндисульфидразного биосенсора наблюдается большее значение тока при потенциале 0.7 В по сравнению со значением тока окисления цистеина в присутствии иммобилизованного фермента (рис. 2, кривая 3 и 2). Это явление может быть использовано для оценки содержания в растворе эффекторов этого фермента.

Установлено, что удобный для измерения аналитический сигнал наблюдается при концентрации субстрата, равной $1 \cdot 10^{-3}$ М.

Холинэстеразный биосенсор. Известно, что ХЭ катализирует реакцию гидролиза тиохолиновых эфиров [23, 24]:

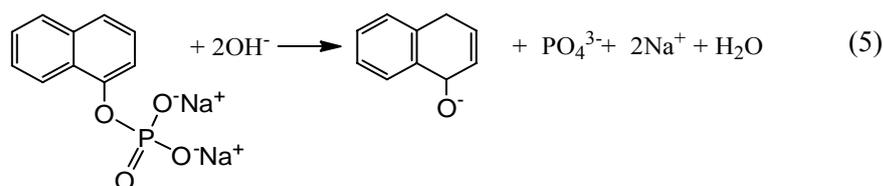


Продукт реакции (3) – тиол – электрохимически активен. На печатном платиносодержащем электроде тиол подвергается окислению:

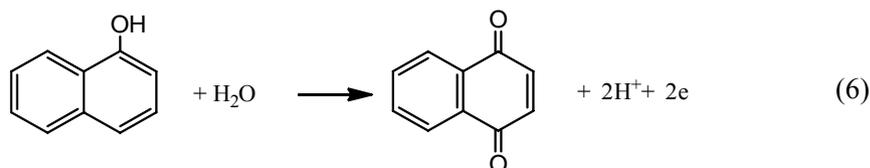


Наибольшее значение тока наблюдается при потенциале +0.55 В и рН 7.6. Ток окисления, регистрируемый в потенциостатическом режиме, достигает постоянного значения через 10 мин. Величину этого стабилизировавшегося отклика биосенсора использовали в качестве аналитического сигнала.

Биосенсор на основе щелочной фосфатазы. Известно, что под действием щелочной фосфатазы 1-нафтил фосфат натрия подвергается биокаталитическому гидролизу с образованием продукта 1-нафтола по следующей схеме:



Продукт ферментативной реакции (5) электрохимически активен, подвергается процессу окисления на платиносодержащих электродах [25]:



Концентрация субстрата 1-нафтил фосфата составила $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Ток окисления 1-нафтола регистрировали при потенциале $E +0.6$ В.

2.2. Изучение влияния охратоксина А на каталитическую активность иммобилизованных ферментов. Изучение действия ОТА на иммобилизованные ХЭ и ЩФ, входящие в состав биочувствительной части амперометрических биосенсоров, показало, что в присутствии микотоксина наблюдается уменьшение величины аналитического сигнала по сравнению с сигналом, полученным в его отсутствие. В случае ЦДГ наблюдается ток, больший по величине тока окисления цистеина в присутствии иммобилизованного фермента, но меньший тока окисления цистеина в отсутствие фермента, то есть ОТА оказывает ингибирующее действие на иммобилизованные ферменты в составе биосенсоров. Этот эффект был использован для разработки способа определения ОТА с помощью биосенсоров.

Исходя из свойств углеродных наноматериалов, можно ожидать, что использование МУНТ в электрохимических сенсорах может приводить к смещению потенциалов электроокисления некоторых соединений в менее положительную область, то есть может наблюдаться каталитический эффект [26]. Было установлено, что в данном случае модификация поверхности электродов МУНТ не приводит к изменению их электрохимических характеристик, то есть пики и волны окисления субстратов наблюдаются практически при тех же потенциалах, что и на немодифицированных электродах. В то же время величина тока при потенциалах соответствующих процессов больше, чем при использовании немодифицированных электродов (табл. 1). Таким образом, за счет более развитой поверхности электродов в результате модификации МУНТ появляются дополнительные возможности для улучшения аналитических характеристик предлагаемых биосенсоров.

Аналитические характеристики предлагаемых биосенсоров приведены в табл. 2.

Как показывают приведенные результаты, использование модифицированных МУНТ электродов как основы биосенсоров позволяет расширить область рабочих концентраций ОТА. Особенно это явно проявляется для ЦДГ- и ХЭ-

Табл. 1

Сопоставление величины токов, наблюдающихся при потенциале аналитического сигнала в присутствии и в отсутствие МУНТ ($n = 4, P = 0.95$)

Ферментный сенсор	Потенциал электро-окисления, мВ	Величина тока, мкА	
		$I_{\text{без МУНТ}}$	$I_{\text{МУНТ}}$
ЦДГ	700	0.1568 ± 0.0007	0.2354 ± 0.0008
ХЭ	550	0.0874 ± 0.0004	0.1722 ± 0.0005
ЩФ	600	0.0985 ± 0.0007	0.1377 ± 0.0006

Табл. 2

Аналитические возможности амперометрических биосенсоров в определении ОТА ($n = 5, P = 0.95$)

Интервал рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочного графика $I = (a \pm \delta) + (b \pm \delta) \cdot (-\lg c), r$			$c_{\text{н}}$, моль/л	Степень ингибирования, %
	$a \pm \delta$	$b \pm \delta$	r		
ЦДГ-биосенсор					
$1 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-9}$	29 ± 2	-3.0 ± 0.2	0.9775	$7 \cdot 10^{-11}$	от 95 до 74
ЦДГ-биосенсор – МУНТ					
$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-11}$	89.1 ± 2.4	-7.7 ± 0.3	0.9935	$5 \cdot 10^{-12}$	от 97 до 54
ХЭ-биосенсор					
$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-9}$	65.4 ± 1.3	-1.7 ± 0.2	0.9888	$5 \cdot 10^{-10}$	от 89 до 60
ХЭ биосенсор – МУНТ					
$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-10}$	29 ± 1.6	-2.7 ± 0.2	0.9874	$7 \cdot 10^{-11}$	от 96 до 64
ЩФ-биосенсор					
$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-11}$	80.5 ± 3.6	-7.9 ± 0.4	0.9928	$8 \cdot 10^{-12}$	от 94 до 54
ЩФ-биосенсор – МУНТ					
$1 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-11}$	81.8 ± 3.2	-6.8 ± 0.4	0.9938	$1 \cdot 10^{-11}$	от 92 до 72

% ингибирования = $[(I_0 - I_p) / I_0] \cdot 100$, где I_0 и I_p – значения тока в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

биосенсоров. Если для ЦДГ-биосенсора область концентраций расширяется как в сторону больших, так и малых концентраций, то для ХЭ-биосенсора лишь в сторону более низких концентраций. В результате модификации уменьшается и нижняя граница определяемых содержаний, достигая в случае ЦДГ-биосенсора величины $5 \cdot 10^{-12}$ моль/л. Эффект ингибирования также становится более ярко выраженным. Практически в два раза улучшается и коэффициент чувствительности у ЦДГ-биосенсора. Менее выражены все эти эффекты для биосенсора на основе ЩФ.

Изучение кинетики ферментативного превращения L-цистеина, где в качестве регистрируемого параметра использовали изменение тока во времени, в отсутствие ОТА показало, что значения кажущейся константы Михаэлиса ($K_{M(\text{каж})}$) и максимальной скорости реакции (V_{max}) составляют: $K_{M(\text{каж})} = (44 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ моль/л, $V_{\text{max}} = (6.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$ моль/л·с. В присутствии ОТА при концентрации 10^{-7} моль/л значения кинетических параметров следующие: $K_{M(\text{каж})} = (122 \pm 6) \cdot 10^{-6}$ моль/л, $V_{\text{max}} = (5.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$ моль/л·с, то есть наблюдается увеличение величины $K_{M(\text{каж})}$, в то же время значение V_{max} практически не меняется. Такое соотношение параметров характерно для конкурентного ингибирования [27]. Константа ингибирования (K_I) составляет в используемых условиях $(5.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ моль $^{-1}$.

Табл. 3

Результаты определения ОТА в модельных растворах с помощью разработанных амперометрических ферментных сенсоров ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r	Процент открытия, %
ХЭ-биосенсор			
$5 \cdot 10^{-6}$	$(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$	0.061	92–104
$8 \cdot 10^{-7}$	$(7.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	0.038	94–101
ХЭ-биосенсор, МУНТ			
$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$	0.039	102–110
$5 \cdot 10^{-9}$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$	0.041	94–102
ЦДГ-биосенсор			
$5 \cdot 10^{-7}$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.041	94–102
$7 \cdot 10^{-8}$	$(6.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$	0.043	94–103
ЦДГ-биосенсор, МУНТ			
$7 \cdot 10^{-6}$	$(6.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$	0.039	93–101
$8 \cdot 10^{-7}$	$(8.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	0.037	98–105
ЩФ-биосенсор			
$5 \cdot 10^{-7}$	$(5.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.039	98–106
$5 \cdot 10^{-9}$	$(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$	0.061	92–104
ЩФ-биосенсор, МУНТ			
$5 \cdot 10^{-7}$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.041	94–102
$8 \cdot 10^{-9}$	$(7.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$	0.038	95–103

Правильность определения ОТА в области линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации с помощью ферментных сенсоров оценена способом «введено – найдено» (табл. 3). Кроме того, процент открытия как характеристика разработанного варианта определения ОТА колеблется в интервале от 92% до 110%. Это показывает, что предлагаемые биосенсоры могут быть использованы для определения ОТА в пищевых продуктах.

2.3. Определение ОТА в пищевых продуктах. Полученные результаты показывают, что предлагаемые ферментные сенсоры могут быть использованы для определения содержания ОТА в пищевых продуктах. Была предпринята попытка разработать методику определения микотоксина в зерновых культурах, поскольку согласно литературным данным ОТА чаще всего обнаруживается именно в зерновых культурах, и среди них в первую очередь кукурузе, гречневой и ячменной крупах [28].

Методика определения содержания микотоксинов в образцах зерновых культур

Навеску гречневой крупы и арахиса (1 г) растирали в порошок, который суспензировали в смеси этанола и воды (4 : 1). Согласно литературным данным, в этом случае достигается достаточно полное извлечение определяемых компонентов в результате однократной экстракции [28]. После центрифугирования в течение 10 мин при скорости 10 тыс. об/мин, надосадочную жидкость использовали для приготовления рабочих водных растворов путем последовательного разбавления. Далее эти растворы использовали для определения ОТА с помощью как модифицированного, так и немодифицированного ферментных сенсоров.

Табл. 4

Определение ОТА в образцах гречневой крупы с помощью ЦДГ-биосенсоров ($n = 5$; $P = 0.95$)

Образцы	Содержание ОТА, моль/л (ПДК, мкг/кг)	S_r
Гречневая крупа	$(3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ (0.0184)	0.063
Гречневая крупа «Мистраль» г. Москва	Не обнаружено*	–
Ядра арахиса	$(2.4 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ (0.039)	0.083

* Содержание ОТА меньше s_{II} .

Предварительными исследованиями было установлено, что раствор, оставшийся после однократного экстрагирования микотоксинов, уже не вызывал изменения аналитического сигнала, то есть не содержал компонентов, оказывающих ингибирующее действие на иммобилизованные ферменты.

В ячейку на 200 мкл вносили определенный объем раствора субстрата (20 мкл), буферный раствор (160 мкл), раствор аналита (20 мкл) и ферментный биосенсор. Через 10 мин измеряли значение тока при соответствующих потенциалах. Результаты определения содержания ОТА в ядрах арахиса и образцах гречневой крупы представлены в табл. 4.

Полученные результаты показывают, что предлагаемые амперометрические биосенсоры позволяют оценивать содержание ОТА в пищевых продуктах на уровне и ниже ПДК (ПДК ОТА для России 0.005 мг/кг [29]).

Заключение

Поскольку аналитические характеристики ЦДГ-биосенсора заметно превосходят аналитические характеристики ХЭ- и ЩФ-биосенсоров, на практике более целесообразно использовать именно ЦДГ-биосенсор. Такой биосенсор отличается еще и доступностью и дешевизной ферментсодержащего препарата и большей стабильностью отклика.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-03-97031-р_поволжье_а).

Summary

E.P. Medyantseva, H. Mai Thi Thanh, R.M. Varlamova, G.R. Sakhapova, E.Yu. Tarasova, H.C. Budnikov. Amperometric Biosensors for Determination of Ochratoxin A.

Novel amperometric biosensors based on platinum screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), and immobilized enzymes (cysteine desulphhydrase, alkaline phosphatase, and cholinesterase) are developed for the determination of ochratoxin A. The action of the biosensors is based on the inhibiting ability of ochratoxin A. The analytical properties of biosensors based on pristine electrodes and electrodes modified with MWCNTs are compared. The working concentration range is $1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-11}$ mol/l. Modification of electrodes with MWCNTs allows achieving a wider range of detectable concentrations, lower detection limits, and more pronounced effect of inhibition. The possibility of determination of ochratoxin A in food products at maximum permissible and lower concentrations is shown.

Key words: ochratoxin A, mycotoxins, amperometric biosensor, cholinesterase, cysteine desulphhydrase, alkaline phosphatase, carbon nanotubes, cereal crops.

Литература

1. Amézqueta S., González-Peñas E., Murillo-Arbizu E., de Cerain A.L. Ochratoxin A decontamination: A review // *Food Control*. – 2009. – V. 20, No 4. – P. 326–333.
2. Varga J., Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products // *Trends Food Sci. Technol.* – 2006. – V. 17, No 2. – P. 72–81.
3. Shephard G.S., Berthiller F., Dorner J., Krska R., Lombaert G.A., Malone B., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Trucksess M.W., van Egmond H.P., Whitaker T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007–2008 // *World Mycotoxin J.* – 2009. – V. 2, No 1. – P. 3–21.
4. Shephard G.S., Berthiller F., Dorner J., Krska R., Lombaert G.A., Malone B., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Trucksess M.W., van Egmond H.P., Whitaker T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008–2009 // *World Mycotoxin J.* – 2010. – V. 3, No 1. – P. 3–23.
5. Shephard G.S., Berthiller F., Burdaspal P.A., Crews C., Jonker M.A., Krska R., MacDonald S., Malone R.J., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Van Egmond H.P., Whitaker T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010–2011 // *World Mycotoxin J.* – 2012. – V. 5, No 1. – P. 3–30.
6. Meulenbergh E.P. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review // *Toxins*. – 2012. – V. 4, No 4. – P. 244–266.
7. Li Y., Liu X., Lin Zh. Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs // *Food Chem.* – 2012. – V. 132, No 1. – P. 1549–1554.
8. Zhang J., Chen J., Zhang X., Zeng Z., Chen M., Wang S. An electrochemical biosensor based on hairpin-DNA aptamer probe and restriction endonuclease for ochratoxin A detection // *Electrochem. Commun.* – 2012. – V. 25. – P. 5–7.
9. Bonel L., Vidal J.C., Duato P., Castillo J.R. An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26, No 7. – P. 3254–3259.
10. Barthelmebs L., Hayat A., Limiadi A.W., Marty J.-L., Noguier T. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2011. – V. 156, No 2. – P. 932–937.
11. Alonso-Lomillo M.A., Domínguez-Renedo O., Ferreira-Gonçalves L., Arcos-Martínez M.J. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – V. 25, No 6. – P. 1333–1337.
12. Alonso-Lomillo M.A., Domínguez-Renedo O., Román L. del T., Arcos-Martínez M.J. Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 688, No 1. – P. 49–53.
13. Hayat A., Paniel N., Rhouati A., Marty J.-L., Barthelmebs L. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices // *Food Control*. – 2012. – V. 26, No 2. – P. 401–415.
14. Heurich M., Kadir M.K.A., Tothill I.E. An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2011. – V. 156, No 1. – P. 162–168.
15. Zamfir L.G., Geana I., Bourigua S., Rotariu L., Bala C., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2011. – V. 159, No 1. – P. 178–184.

16. *Май Тхи Тхань Х., Медянцева Э.П., Варламова Р.М., Саханова Г.Р., Николаева О.В.* Определение зеараленона амперометрическими биосенсорами на основе модифицированных углеродными нанотрубками электродов // *Вестн. Казан. технол. ун-та.* – 2012. – № 15. – С. 149–153.
17. *Медянцева Э.П., Кремлева Н.В., Будников Г.К., Бормотова Ю.И.* Амперометрический биосенсор для определения свинца и кадмия // *Журн. аналит. химии.* – 1999. – Т. 54, № 2. – С. 166–170.
18. *Ajeet K., Pratima R.S., Pandey M.K., Kaneto K., Ahmad S., Bansil Malhotra D.* Carbon nanotubes – chitosan nanobiocomposite for immunosensor // *Thin Solid Films.* – 2010. – V. 519, No 3. – P. 1160–1166.
19. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. – 614 с.
20. *Медянцева Э.П., Варламов Р.М., Тарасова Е.Ю., Май Тхи Тхань Х., Саханова Г.Р., Будников Г.К.* Определение некоторых микотоксинов амперометрическими биосенсорами // III Всерос. симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с междунар. участием. – Краснодар, 2011. – С. 256.
21. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Paleschi G.* Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) // *Microchim. Acta.* – 2010. – V. 170, No 3–4. – P. 193–214.
22. *Akyilmaz E., Turemis M.* An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine // *Electrochim. Acta.* – 2010. – V. 55, No 18. – P. 5195–5199.
23. *Pohanka M., Kuca K., Jun D.* Aflatoxin assay using an amperometric sensor strip and acetylcholinesterase as recognition element // *Sens. Lett.* – 2008. – V. 6, No 3. – P. 450–453.
24. *Медянцева Э.П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р.М., Саханова Г.Р., Тарасова Е.Ю., Будников Г.К.* Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2012. – Т. 154, кн. 1. – С. 101–111.
25. *Ёсида К.* Электроокисление в органической химии. Роль катионрадикалов как интермедиатов в синтезе. – М.: Мир, 1987. – 366 с.
26. *Кривенко А.Г., Комарова Н.С.* Электрохимия наноструктурированного углерода // *Усп. химии.* – 2008. – Т. 77, № 11. – С. 995–1012.
27. *Крупяно В.И.* Векторный метод представления ферментативных реакций. – М.: Наука, 1990. – 144 с.
28. *Стародуб Н.Ф., Пилипенко Л.Н., Егорова А.В., Пилипенко И.В., Гойстер О.С., Хмельницкий Г.А.* Анализ микотоксинов: подготовка проб // *Биотехнология.* – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 106–115.
29. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – 2001. – URL: <http://sentech-medical.ru/files/sanpin-2-3-2-1078-01.pdf>, свободный.

Поступила в редакцию
08.10.12

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Май Тхи Тхань Хуен – аспирант кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *maihtuyen_dhv@yahoo.com.vn*

Варламова Регина Марковна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Regina.Varlamova@ksu.ru*

Тарасова Екатерина Юрьевна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Сахапова Гулина Ришатовна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*