

0-732851-|

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи



ИВАНОВ АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА
ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ
ЭЛЕКТРОДОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань - 2002

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета
Казанского государственного университета

- Научный руководитель: доктор химических наук,
доцент Евтюгин Г.А.
- Научный консультант: доктор химических наук,
профессор Будников Г.К.
- Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Евгеньев М.И.
(Казанский государственный технологический
университет)
- доктор биологических наук,
профессор Винтер В.Г.
(Казанский государственный университет)

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт безопасно-
сти жизнедеятельности Республики Башкорто-
стан (г.Уфа)

Защита диссертации состоится 19 декабря 2002 г. в 14 ч. на заседании диссертационного совета К 212.081.04 при Казанском государственном университете по адресу: г.Казань, ул.Кремлевская, 18, химический факультет, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18, КГУ, Научная часть.

Автореферат разослан 15 ноября 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук



А.Г.Зазыбин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Создание высокочувствительных сенсоров, способных быстро и надежно устанавливать присутствие биологически активных соединений в различных объектах, является одним из приоритетных направлений развития современной аналитической химии. Использование биологических компонентов в составе сенсоров – один из эффективных приемов улучшения их аналитических характеристик. Это достигается благодаря специфичности биохимического распознавания, сочетающегося с высокой чувствительностью регистрации сигнала. Углеродные материалы как нельзя лучше подходят для направленного варьирования свойств биосенсоров и улучшения их операционных и аналитических характеристик. Благодаря разнообразию электрохимических и механических свойств, легкости включения дополнительных компонентов, технологичности изготовления электродов различного размера и конфигурации углеродные материалы и композиции на их основе – идеальный материал для создания биосенсоров нового поколения. Однако для реализации этих преимуществ требуются исследования, направленные на поиск оптимальных сочетаний модификаторов и биологических компонентов, на установление механизма влияния тех или иных модификаторов на характеристики биосенсора.

Целью настоящей работы явилось создание и широкая сравнительная характеристика электрохимических холинэстеразных сенсоров на основе модифицированных углеродных электродов с целью установления влияния модификатора на регистрируемый сигнал, операционные и аналитические характеристики биосенсоров и возможности их практического использования для анализа реальных объектов экоаналитического контроля.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- разработаны новые методы модификации графитовых и стеклоуглеродных электродов производными калликс[4]аренов и салицилальдиминметакрилатом для создания холинэстеразных сенсоров с улучшенными аналитическими характеристиками;
- изучено влияние модификаторов (полианилин, тетрацианохинодиметан, берлинская лазурь) на условия регистрации сигнала биосенсоров в потенциометрическом и амперометрическом режимах;
- установлен механизм влияния указанных модификаторов на аналитические характеристики определения субстратов и ингибиторов холинэстераз;

- дана сравнительная характеристика разработанных холинэстеразных сенсоров в определении фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в модельных водных растворах и виноградном соке.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- предложен новый тип модификаторов электродов (производные каликс[4]аренов, салицилальдиминметакрилат), позволяющий улучшить характеристики определения субстратов холинэстераз за счет селективного сорбционного накопления тиохолина – продукта ферментативной реакции;
- показана возможность использования биосенсоров для высокочувствительного обнаружения соединений, образующих комплексы типа "гость-хозяин" с участием 1,3-дизамещенных каликс[4]аренов, иммобилизованных на поверхности преобразователей;
- предложены асимметричные ферментсодержащие мембраны с белковым поверхностным слоем для повышения чувствительности определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов и изучен механизм влияния покровного слоя на характеристики биосенсоров;
- разработаны высокочувствительные потенциометрические сенсоры на основе стеклоуглеродных и графитовых электродов, модифицированных полианилином, отличающиеся супернернстовским наклоном электродной функции и улучшенными аналитическими характеристиками определения субстратов и ингибиторов холинэстераз.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- разработаны методы поверхностной модификации печатных графитовых и стеклоуглеродных электродов для создания холинэстеразных потенциометрических и амперометрических сенсоров с улучшенными характеристиками;
- предложены способы определения органических кислот и следовых количеств ионов металлов с помощью холинэстеразных сенсоров, модифицированных каликсаренами;
- разработаны высокочувствительные способы определения остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в виноградном соке без дополнительного концентрирования или предварительного отделения мешающих компонентов пробы;
- предложены простые и удобные в эксплуатации системы проточно-инжекционного определения субстратов и ингибиторов холинэстераз с планарными графитовыми электродами в качестве преобразователя сигнала.

На защиту выносятся:

- результаты исследования влияния 1,3-дизамещенных каликс[4]аренов и N-алкоксифенилсалицилальдиминметакрилата на сигнал амперометрического холинэстеразного сенсора и вывод о сорбционном механизме формирования сигнала, связанном с накоплением тиохолина на поверхности электрода;
- сравнительное изучение поведения биосенсоров, отличающихся условиями иммобилизации фермента и регистрации сигнала, и вывод о превалирующем влиянии распределения компонентов в системе электрод-мембрана-раствор на аналитические характеристики определения субстратов и ингибиторов фермента;
- создание высокочувствительного потенциометрического сенсора на основе планарного графитового или стеклоуглеродного электрода, модифицированного полианилином, и холинэстеразы, иммобилизованной в парах глутарового альдегида;
- определение рабочих условий пробоподготовки и количественная оценка влияния макрокомпонентов виноградного сока на сигнал амперометрических и потенциометрических холинэстеразных сенсоров и вывод о возможности прямого определения остаточных количеств пестицидов в виноградном соке на уровне установленных международных норм ЕС.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (2002 г.), Всероссийских конференциях "Экоаналитика-98. Анализ объектов окружающей среды" (Краснодар, 1998), "Актуальные проблемы аналитической химии" (Москва, 2002 г.), Международном конгрессе по аналитической химии (Москва, 1997), 7 Международной конференции по электроанализу ESEAC'98 (Коимбра, Португалия, 1998), 3 Семинаре INCO-Corpernicus "Биосенсоры для прямого определения загрязнения окружающей среды в полевых условиях" (Коимбра, Португалия, 1998), 11 Российско-японском симпозиуме по аналитической химии (Москва, 2000 г.), 16 Международном симпозиуме по биоэлектрохимии (Братислава, Словакия, 2000), 7 Международном симпозиуме по кинетическим методам анализа (Бухарест, Румыния, 2001), 6 Азиатской конференции по аналитической химии ASIANALYSIS 6 (Токио, Япония, 2001), 12 Международной конференции по аналитической химии EUROANALYSIS 12 (Дортмунд, Германия, 2002), Международной конференции по электрохимическим сенсорам (Матрафьюред, Венгрия, 2002).

Основные результаты изложены в 7 статьях и 11 тезисах докладов.

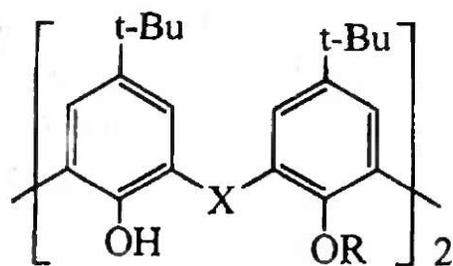
Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 43 рисунка и 9 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 185 ссылок на отечественные и зарубежные работы.

Исследования проводились при поддержке РФФИ (грант № 97-03-33210 "Разработка тестовых методов определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров" и № 00-03-32605 "Разработка электрохимических биосенсоров на основе планарных модифицированных электродов для диагностики загрязнения окружающей среды"), Санкт-Петербургского конкурсного центра по фундаментальному образованию (грант № 97-0-9.5-238 "Методы групповой оценки загрязнителей окружающей среды на основе биохимических тестов и биосенсоров"), CRDF (Научно-образовательный центр КГУ "Материалы и технологии XXI века" REC-007), INCO-Copernicus (грант № IC-15-CT-96-0804 "Биосенсоры для прямого определения загрязнения окружающей среды в полевых условиях") и ИНТАС (грант № 00-273 "Создание химических и биосенсоров для контроля качества продуктов виноделия").

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

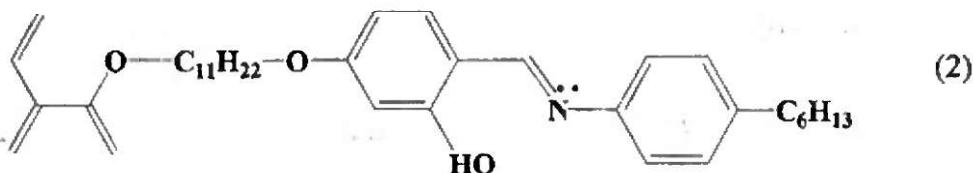
Использовали препараты ацетилхолинэстеразы из электрического угря (АХЭ, "Sigma", КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади производства АО "Биомед" и "Sigma" (БуХЭ, КФ 3.1.1.8) и холиноксидазу из *Alcaligenes sp.* ("Fluka", КФ 1.1.3.17). Имобилизацию ферментов проводили путем кросс-сшивки парами или раствором глутарового альдегида на поверхности электродов. Модификаторами амперометрических сенсоров служили 1,3-дизамещенные каликс[4]арены (1), салицилальдиминмстакрилат (2), тетрациано-



(1)

4	CH ₂	-CH ₂ C(O)C ₂ H ₅
6	CH ₂	-CH ₂ CH ₂ NH ₂

Шифр	X	R
1	CH ₂	
2	CH ₂	
3	CH ₂	
5	S	



хинодиметан и берлинская лазурь (биферментный сенсор), потенциометрических сенсоров – полианилин, допированный камфорсульфоновой кислотой*. В качестве преобразователей сигнала использовали стеклоуглеродный электрод, планарные графитовые и эпоксиграфитовые электроды производства НПВП "ИВА" (г.Екатеринбург), университетов г. Перпиньян (Франция) и Флоренции (Италия), а также сурьмяный электрод. Субстратами служили эфиры холина (потенциометрические сенсоры) и тиохолина (амперометрические сенсоры), гидролизующиеся в приэлектродном слое в присутствии холинэстеразы с образованием кислоты RCOOH (X = O, R = CH₃, C₃H₇) и холина (3).



Сигналом потенциометрических биосенсоров служил стационарный сдвиг потенциала, регистрируемый через 2-5 мин. после введения субстрата с помощью иономеров И-130 (ПО "Измеритель", Белоруссия) и ОР 208/01 (Radelkis, Венгрия). В амперометрическом режиме регистрировали ток окисления тиохолина (X = S) с помощью вольтамперографов "ИВА-3м", "ИВА-5" (Екатеринбург) и VA 641 (Metrohm, Herisau, Швейцария). При использовании медиаторов электронного переноса сигналом служил ток окисления восстановленной формы тетрацианохинодиметана и ток электрокаталитического восстановления пероксида водорода, выделяющегося в реакции окисления холина, катализируемого холиноксидазой (4). В последнем случае в качестве преобразователя сигнала использовали печатный графитовый электрод, модифицированный берлинской лазурью.



Измерения проводили в хроноамперометрическом режиме при постоянном потенциале и при линейной развертке потенциала в трехэлектродном режиме. В качестве противоиэлектрода использовали никелевую фольгу, электрода сравнения – хлорсеребряный электрод.

Модельными ингибиторами служили пестициды антихолинэстеразного действия – хлорофос, кумафос, хлорпирифос-метил, метиокарб, алдикарб, кар-

*). Предоставлен для исследований зав.лабораторией биосенсоров и биоэлектроники Московского государственного университета д.х.н. А.А.Карякиным

бофуран производства "Polyscience Corp.", Niles, США, Riedel-de-Haen, Seelze, Германия. Тионовые пестициды перед измерением окисляли электрохимически в присутствии хлорида натрия, хлорофос переводили в ДДВФ нагреванием в щелочном растворе. Мерой ингибирующего действия служило относительное изменение сигнала биосенсора после его инкубирования в растворе пестицида в течение 10 мин.

Влияние модификатора на операционные характеристики электрохимических холинэстеразных сенсоров

Потенциометрические сенсоры. Измеряемой величиной служил сдвиг pH, обусловленный выделением в ферментсодержащем слое кислоты при гидролизе субстрата (3). Как показали сравнительные эксперименты с биосенсорами на основе сурьмяного электрода и стеклоуглеродного электрода, модифицированного полианилином, сигнал биосенсора при добавлении субстрата определяется не только удельной активностью фермента, но и характеристиками диффузионного переноса субстрата и продукта ферментативной реакции в системе электрод-ферментсодержащий слой-раствор. Присутствие инертного белка в малоактивных препаратах БуХЭ производства АО "Биомед", а также покрытие мембран из высокоактивных препаратов БуХЭ и АХЭ покровной пленкой альбумина приводит к торможению выноса образующейся в реакции кислоты из мембраны в раствор. В результате, несмотря на различие в концентрации активных центров фермента, полученные биосенсоры отличаются близостью абсолютных значений сигнала и насыщающих концентраций субстрата (рис.1).

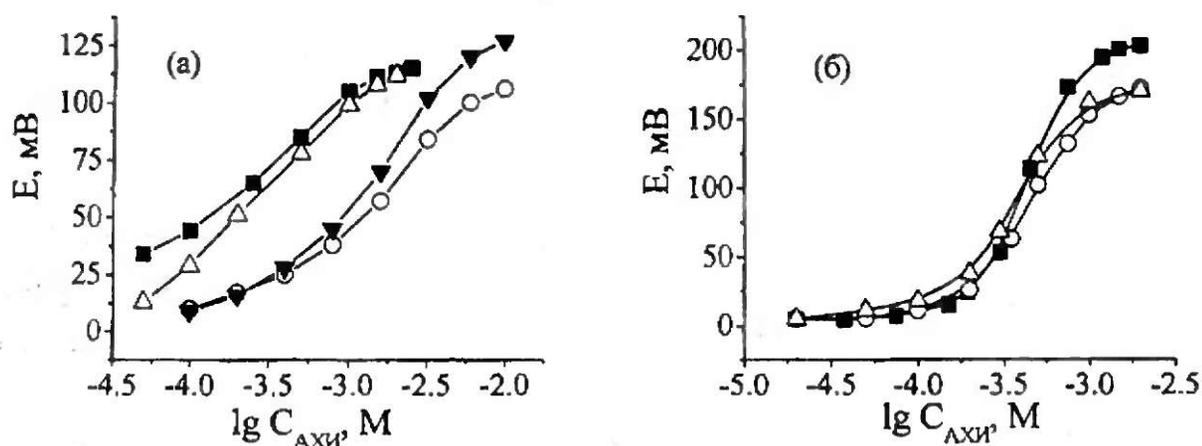
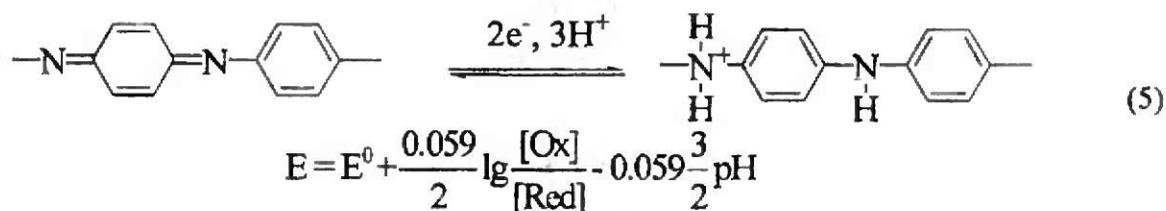


Рисунок 1. Градуировочные зависимости определения ацетилхолина с помощью холинэстеразных сенсоров на основе а) – сурьмяных электродов, б) – стеклоуглеродных электродов модифицированных полианилином (■ АХЭ ("Sigma"), ○ БуХЭ ("Sigma"), △ - БуХЭ ("Биомед"), ▼ БуХЭ ("Sigma" + альбумин)

Использование в качестве модификатора электрода полианилина, допированного камфорсульфоновой кислотой, улучшило операционные и аналитические характеристики разработанных биосенсоров. Модификатор повышает чувствительность регистрации изменений рН в ферментсодержащем слое за счет большего значения электродной функции, отвечающей сверхэквивалентному переносу иона водорода в обратимом окислительно-восстановительном процессе (5).



В результате модификации стеклоуглерода полианилином достигнут рекордный сигнал потенциометрического ферментного сенсора, составляющий 180-200 мВ при насыщающей концентрации субстрата $n \times 10^{-3}$ М (табл. 1).

Таблица 1

Определение ацетилхолина с помощью холинэстеразных сенсоров на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных полианилином

Фермент	Диапазон определ. концентраций, М	C_{lim}, M	Чувствительность, мВ/ lg C_s	Максимальный сигнал, мВ
АХЭ ("Sigma") + альбумин	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$	7×10^{-5}	121 ± 17	180
То же на печатном электроде	$1 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-3}$	5×10^{-5}	82 ± 6	100
БуХЭ ("Sigma")	$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	99 ± 13	160
БуХЭ ("Биомед")	$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	96 ± 13	160

Наклон линейной части градуировочного графика определения субстратов и в случае сурьмяного, и в случае полианилинового сенсора превышает соответствующее значение наклона рН-зависимости потенциала электрода. Это повышает точность регистрации малых изменений активности иммобилизованного фермента, что важно при использовании биосенсора для оценки ингибирующего действия.

Супернернстовский наклон градуировочной зависимости определения субстратов объясняется неравновесным распределением продукта ферментативной реакции в белковом слое. При кондиционировании биосенсоров в растворе

субстрата в течение 1.5-2 часов значение отклика снижается, приближаясь к теоретическому. Биосенсоры на основе электродов, модифицированных полианилином, отличаются также пониженной чувствительностью к изменениям pH и буферной емкости раствора, особенно в области ее малых значений.

Амперометрические сенсоры. В отсутствие модификаторов измерения проводили в проточно-инжекционных условиях, преобразователем служили толстоленочные эпюксиграфитовые электроды, на поверхности которых иммобилизовали АХЭ и БуХЭ, высокоактивные препараты покрывали слоем альбумина для повышения механической устойчивости в потоке. Как показали электрохимические измерения, использование эпюксиграфитовых композиций позволяет разделить процессы окисления тиохолина и иодида (противоион субстрата). В непрерывном проточном режиме биосенсоры позволяют проводить до 6 определений в час в течение 10 часов при сохранении до 80 % исходной активности фермента. Область линейности графиков определения бутирилтиохолин иодида составила 0.2-5 мМ, пределы обнаружения – 0.08-0.1 мМ в зависимости от источника и удельной активности фермента. Физическая сорбция 1,3-дизамещенных каликс[4]аренов (1), наносимых на электрод из органических растворителей, повышает сигнал за счет сорбционного накопления компонентов ферментативной реакции (рис.2).

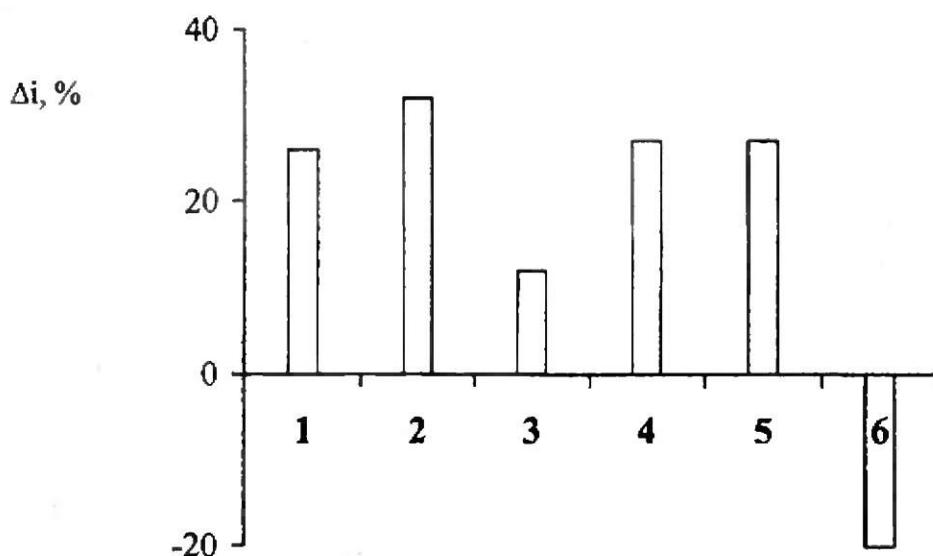


Рисунок 2. Относительное изменение тока окисления тиохолина в присутствии 0.15 мг/см² каликс[4]аренов 1-6 по сравнению с сигналом немодифицированного биосенсора. БуХЭ, фосфатный буферный раствор, pH 7.8

Аминопроизводное 6 снижает сигнал биосенсора в силу обратимого ингибирующего действия на фермент. Оксалат-ионы, образующие комплекс типа

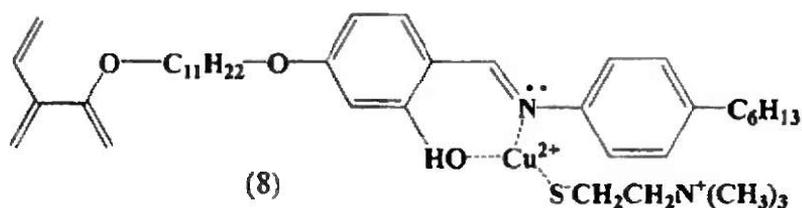
"гость-хозяин", в диапазоне концентраций 0.5-20 мМ усиливают ингибирующее действие соединения 6. Градуировочная зависимость линеаризуется в координатах C_1 , мМ – i , мкА (6):

$$i = (18.6 \pm 1.0) - (0.18 \pm 0.03) \times C_1, n = 5, r = 0.9714 \quad (6)$$

В присутствии солей Cu(II) влияние каликс[4]аренов на регистрируемый сигнал биосенсора возрастает: снижается потенциал и увеличивается ток окисления тиохолина, при этом полностью исчезает ингибирующее действие самой меди (II). Так, при использовании соединения 6 активирующее действие Cu(II) наблюдается в диапазоне концентраций 0.05-4.0 мМ (*трис*-буферный раствор, pH 6.5) в соответствии с ур.(7).

$$i = (16.5 \pm 2.7) + (31.4 \pm 4.0) \times C_{Cu}, n = 6, r = 0.9792 \quad (7)$$

Влияние Cu(II) на сигнал биосенсора, модифицированного каликсаренами, может быть связано с образованием на поверхности электрода меркаптида меди, сорбции которого способствует присутствие каликс[4]аренов. Сходное влияние обнаружено при включении в состав электродного вещества салицилальдимин-метакрилата (2), способного образовывать с ионами переходных металлов тройные комплексы (8). Введение этого модификатора на 20 % повышает чувстви-



тельность определения субстрата, расширяет диапазон его определяемых концентраций и в 1.3 раза уменьшает предел

обнаружения ацетилтиохолина. Помимо расширения круга определяемых соединений, модификация электрода каликс[4]аренами и салицилальдимин-метакрилатом позволяет снизить влияние матрицы за счет уменьшения потенциала измерения сигнала биосенсора.

Сравнительная характеристика определения остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов с помощью биосенсоров

Изученные пестициды оказывают строго необратимое действие на холинэстеразу, нативную и иммобилизованную на поверхности сенсоров. Чувствительность определения пестицидов с помощью разработанных биосенсоров определяется как источником фермента, так и составом ферментсодержащего слоя. Присутствие инертного белка в самой мембране или использование дополни-

тельного покровного слоя альбумина повышают абсолютные значения степени ингибирования, измеряемые после 10 минутного инкубирования биосенсора в модельном растворе пестицида. Для гидрофобного кумафоса повышение ингибирования не меняет чувствительности определения ингибитора (наклона градуировочной зависимости). Для более гидрофильного хлорофоса при переходе от однородных к асимметричным мембранам происходит уменьшение наклона графика в координатах $I, \%$ (относительное уменьшение сигнала после контакта биосенсора с ингибитором) – $\lg C_1$ (концентрация ингибитора, М). Различие в поведении пестицидов, возможно, связано с гидрофильно-гидрофобным балансом на границе мембрана-раствор, а также с повышением чувствительности сигнала к малым изменениям рН ферментсодержащего слоя вследствие торможения выноса ионов водорода в раствор в асимметричных мембранах.

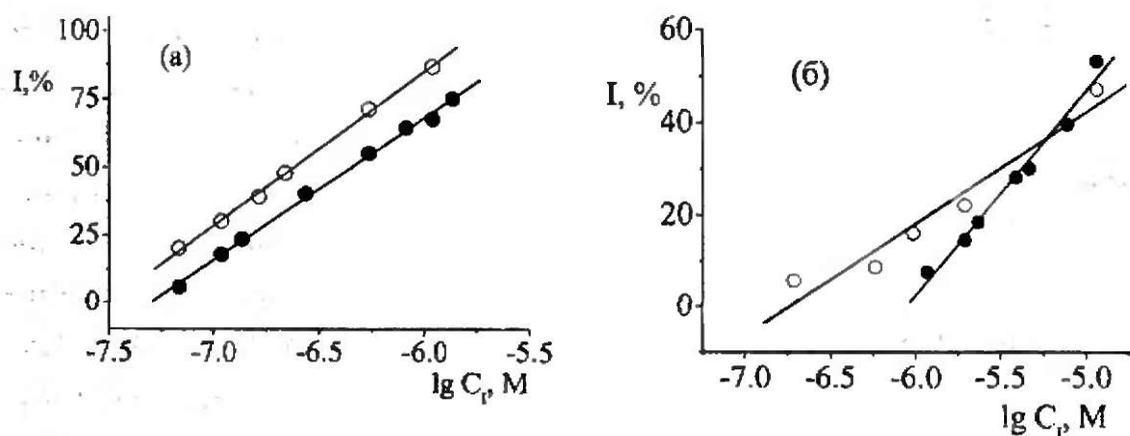


Рисунок 3. Влияние поверхностной пленки альбумина на характеристики определения кумафоса (а) и хлорофоса (б) с помощью потенциометрического холинэстеразного сенсора на основе сурьмяного электрода. Фосфатный буферный раствор, рН 7.8, инкубирование 10 мин. Ацетилхолин 2×10^{-3} М (○ - однородная мембрана, ● - асимметричная мембрана (альбумин))

Аналогичное изменение градуировочных кривых наблюдается и для других биосенсоров независимо от способа регистрации сигнала (рис.4). Более того, параллельное смещение графиков определения пестицидов наблюдается и в том случае, если они не линеаризуются.

Для гидрофильных карбаминатных пестицидов, так же, как и для фторидов, оказывающих конкурентное ингибирующее действие, превалирующее влияние на характеристики определения оказывает источник фермента, поскольку

ку распределение субстрата и ингибитора в мембране и растворе различается незначительно.

Результаты определения пестицидов антихолинэстеразного действия приведены в табл.2. Как видно, чувствительность определения кумафоса и хлорофоса для всей совокупности биосенсоров увеличивается в соответствии с содержанием инертного белка в мембране: АХЭ ("Sigma") < БуХЭ ("Sigma") < БуХЭ ("Биомед") < БуХЭ + альбумин (асимметричные мембраны). Измерения в потоке снижают влияние диффузионного фактора, ограничивая время контакта субстрата и биосенсора, поэтому соответствующие данные выпадают из общего ряда (рис.5).

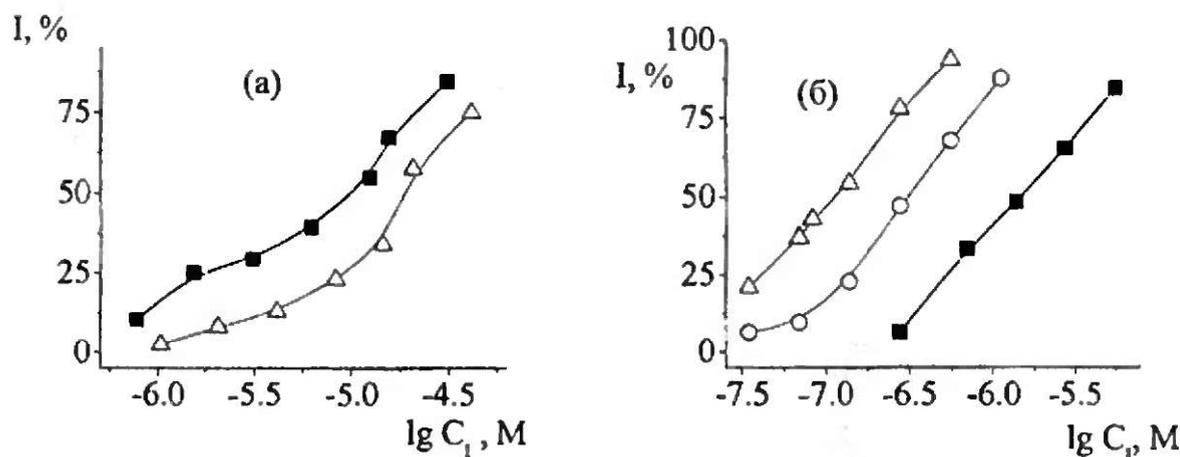


Рисунок 4. Определение метиокарба (а) и кумафоса (2) с помощью холинэстеразного сенсора на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного полианилином. (■ АХЭ ("Sigma"), ○ БуХЭ ("Sigma"), Δ - БуХЭ ("Биомед"), ▼ БуХЭ ("Sigma" + альбумин)

Таблица 2
Сравнительная характеристика определения пестицидов с помощью холинэстеразных сенсоров с различными принципами регистрации сигнала

1. Метиокарб

Фермент	$I, \% = a + b \times (\lg C_1, M)$			$C_{lim} M$	Диапазон опр. конц-й, M
	a	b	r^2		
➤ Стеклоуглеродные электроды, модифицированные полианилином					
АХЭ("Sigma")	269±22	44±4	0.975	1.5×10^{-6}	$2 \times 10^{-6} - 7 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma")	217±18	34±4	0.981	8×10^{-7}	$1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Биомед")	346±44	65±10	0.970	7×10^{-6}	$8 \times 10^{-6} - 9 \times 10^{-5}$

2. Алдикарб

АХЭ("Sigma")	255±12	40±2	0.991	8×10^{-7}	$9 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma")	196±13	30±3	0.989	6×10^{-7}	$8 \times 10^{-7} - 9 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Биомед")	188±11	33±2	0.993	4×10^{-6}	$5 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-4}$

3. Хлорофос

➤ Сурьмяные электроды

АХЭ("Sigma")	116±12	13±2	0.995	9×10^{-8}	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma")	274±15	44±3	0.991	1×10^{-6}	$1.5 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Биомед")	247±6	38±1	0.998	4×10^{-7}	$4 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma") + BSA	175±20	24±3	0.972	2×10^{-7}	$2.5 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$

➤ Толсто пленочные эпоксиграфитовые электроды (немодифицированные)

АХЭ("Sigma")	217±8	32±3	0.976	5×10^{-7}	$7 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma")	295±10	47±3	0.983	7×10^{-7}	$1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Биомед")	262±11	44±2	0.993	1.5×10^{-6}	$2 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$

➤ Стеклоуглеродные электроды, модифицированные полианилином

АХЭ("Sigma")	316±11	51±3	0.984	1×10^{-6}	$2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Sigma")	430±20	69±5	0.981	8×10^{-7}	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$
БуХЭ ("Биомед")	433±17	65±4	0.982	3×10^{-7}	$4 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-6}$

4. Хлорпирифос-метил

➤ Толсто пленочные эпоксиграфитовые электроды (немодифицированные)

АХЭ("Sigma")	333±21	42±3	0.977	2×10^{-8}	$3 \times 10^{-8} - 7 \times 10^{-7}$
БуХЭ ("Sigma")	283±17	33±3	0.985	6×10^{-9}	$7 \times 10^{-9} - 6 \times 10^{-7}$
БуХЭ ("Биомед")	462±16	52±3	0.993	2×10^{-9}	$3 \times 10^{-9} - 6 \times 10^{-8}$

➤ Печатные электроды, модифицированные полианилином

АХЭ("Sigma")	512±19	71±3	0.995	9×10^{-8}	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$
--------------	--------	------	-------	--------------------	---------------------------------------

➤ Печатные электроды, модифицированные берлинской лазурью

АХЭ ("Sigma")	527±24	69±3	0.993	3×10^{-8}	$4 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-7}$
---------------	--------	------	-------	--------------------	---------------------------------------

➤ Печатные электроды, модифицированные TCNQ

АХЭ ("Sigma")	469±31	64±5	0.987	7×10^{-8}	$8 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-6}$
БуХЭ ("Sigma")	542±21	69±3	0.996	2×10^{-8}	$3 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-7}$

Аналогичным образом меняется чувствительность определения хлорофоса, но для него при переходе к асимметричным мембранам наклон градуировочного графика уменьшается.

Пределы обнаружения пестицидов меняются не столь регулярно, поскольку помимо кинетики ингибирования зависят от точности измерения сигнала биосенсора до и после его контакта с пестицидом.

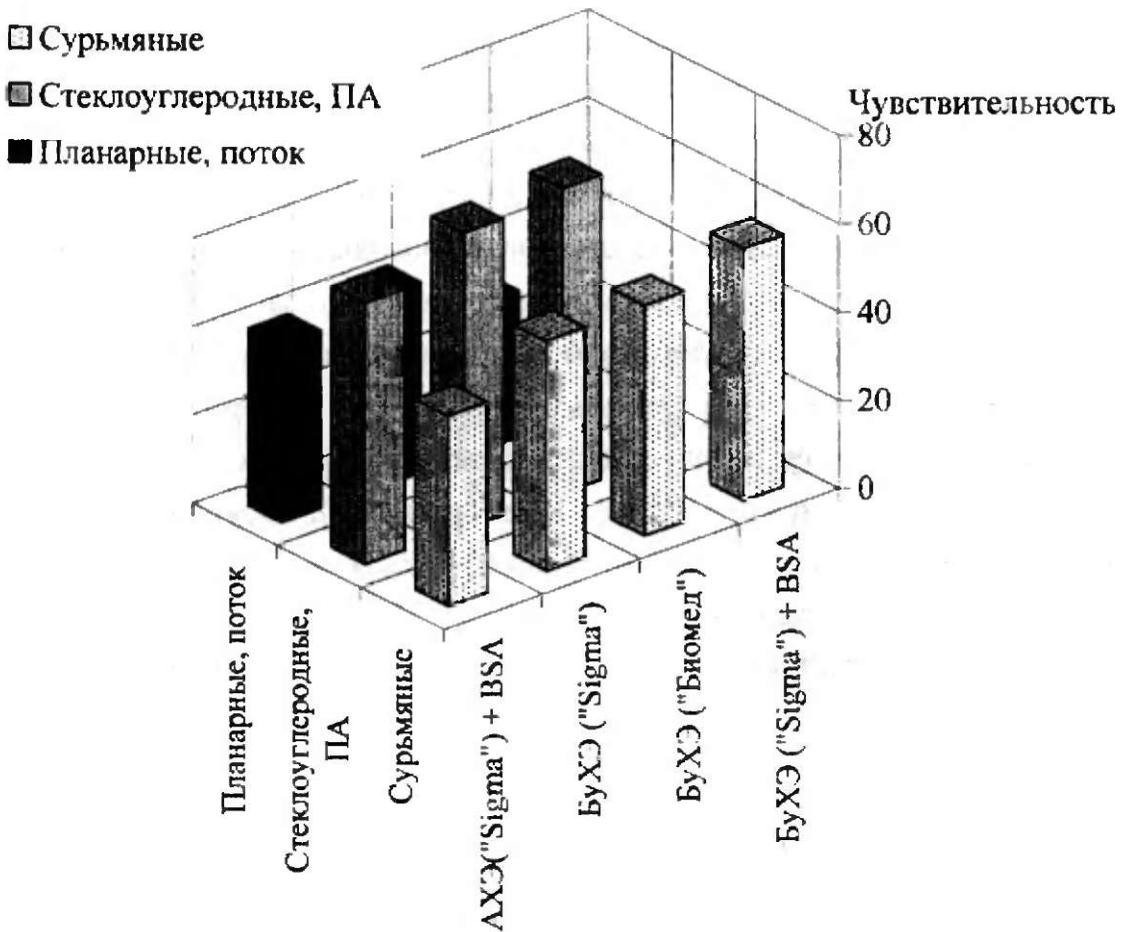


Рисунок 5. Чувствительность определения кумафоса в зависимости от способа регистрации ферментативной реакции и активности фермента. Фосфатный буферный раствор, рН 7.8. Инкубирование 10 мин. ПА – полианилин, BSA – бычий сывороточный альбумин

Определение остаточных количеств пестицидов в виноградном соке.
 Для определения остаточных количеств тионовых пестицидов (кумафос, хлорпирифос-метил) в винограде предложена процедура электрохимического окисления сока для получения фосфорильных аналогов пестицидов с антихолинэсте-

разным действием в 100-1000 раз выше ингибирующей способности исходных тиофосфонатов. В отсутствие пестицидов после электролиза степень ингибирования сока из белого винограда не превышала 7% исходной величины сигнала биосенсора. При внесении известных количеств пестицидов в сок было установлено, что компоненты сока снижают ингибирующее действие пестицидов на нативную холинэстеразу на 20 % по сравнению с модельными водными растворами. Имобилизация фермента снижает влияние матрицы, для этого достаточно разбавить сок в соотношении 1:4 буферным раствором. Сок из красного винограда проявляет более сильное ингибирующее действие на нативную холинэстеразу, чем из белого, вследствие более высокого содержания фенольных соединений. По той же причине увеличивается время электрохимической обработки пробы: до 3 минуты электролиза в реакции участвуют в основном легко окисляющиеся компоненты сока. Эксперименты проводили с потенциометрическим сенсором на основе электрода, модифицированного полианилином, и с помощью биферментного сенсора с холинэстеразой и холиноксидазой, иммобилизованной на печатном графитовом электроде, модифицированном берлинской лазурью. В последнем случае регистрацию сигнала электрокаталитического восстановления пероксида водорода, образующегося в реакциях (3,4), проводили при 0 В отн. Ag/AgCl. При более анодных потенциалах окисления тиохолина измерениям мешала значительная величина фонового тока.

На рис.6 представлены сравнительные результаты определения пестицидов в виноградном соке.

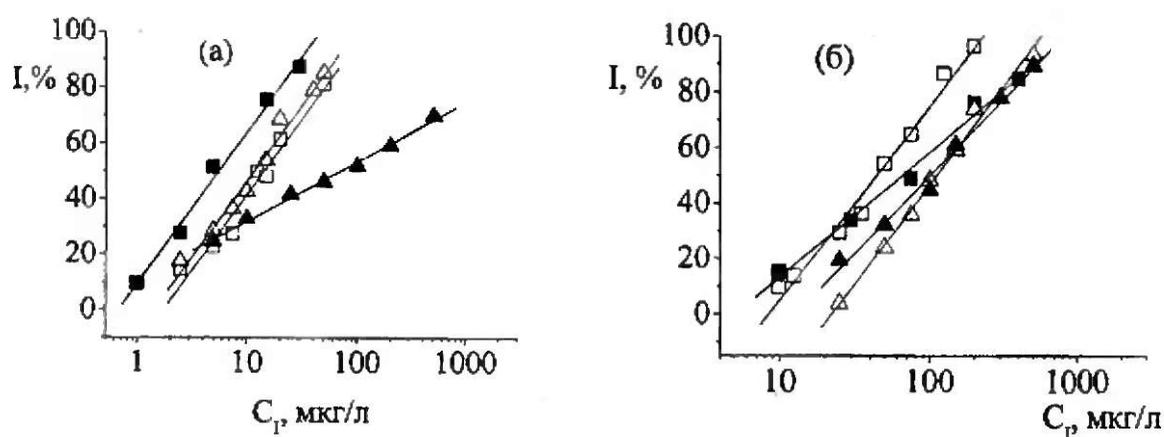


Рисунок 6. Сравнительная характеристика чувствительности определения карбофурана (а) и хлорпирифос-метила (б) в виноградном соке (■, ▲) и буферном растворе (Δ, □) с помощью холинэстеразных сенсоров, модифицированных полианилином (▲, Δ) и берлинской лазурью (■, □)

В случае хлорпирифос-метила удалось практически полностью исключить влияние матрицы на чувствительность его определения с помощью обоих сенсоров. Для карбофурана использование полианилинового сенсора снижает наклон градуировочного графика почти вдвое, по-видимому, за счет влияния буферной емкости сока или сорбции органических компонентов, меняющей характеристики рН-отклика модификатора.

Разработанные сенсоры в найденных рабочих условиях пробоподготовки и измерения ингибирования и сигнала позволяют надежно обнаруживать остаточные количества пестицидов в виноградном соке на уровне международных стандартов, принятых в странах традиционного виноделия (0.1 мг/кг винограда).

ВЫВОДЫ

1. Найдено, что использование новых модификаторов углеродных электродов (полианилин, замещенные каликс[4]арены, салицилальдиминметакрилат, берлинская лазурь) позволяет в широких пределах и направленно варьировать операционные и аналитические характеристики холинэстеразных сенсоров, расширяет круг определяемых соединений и снижает влияние матрицы на определение фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в растительном материале. Разработанные биосенсоры отличаются повышенной стабильностью сигнала (время жизни до 6 месяцев в сухих условиях) и чувствительностью к субстратам и ингибиторам холинэстераз.
2. 1,3-Дизамещенные каликсарены и замещенные салицилальдиминметакрилаты обеспечивают сорбционное накопление продукта ферментативной реакции - тиохolina – на поверхности электрохимического преобразователя. Это позволяет снизить потенциал измерения сигнала, повысить чувствительность определения субстрата, а также предложить новые способы определения щавелевой кислоты и ионов металлов, участвующих в образовании комплексов "гость-хозяин", в микромолярном диапазоне концентраций.
3. Использование полианилина, допированного камфорсульфоновой кислотой, позволило создать потенциометрический холинэстеразный сенсор, отличающийся высокой чувствительностью к субстратам и ингибиторам холинэстеразы в сочетании с пониженной чувствительностью к буферной емкости и рН среды.
4. Сравнительная характеристика холинэстеразных сенсоров, отличающихся по способу регистрации сигнала, природе модификатора, удельной активности и

источнику фермента, показала, что определяющее влияние на аналитические характеристики определения пестицидов оказывают процессы переноса вещества через границу мембрана-раствор.

5. Применение асимметричных мембран с поверхностным слоем инертного белка и проточно-инжекционный режим измерения позволяют повысить селективность определения гидрофобных пестицидов в присутствии других эффекторов фермента.

6. Созданные потенциометрические и амперометрические сенсоры в найденных рабочих условиях пробоподготовки и ингибирования позволяют проводить определение фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в водных растворах на уровне $n \times (10^{-9} - 10^{-5})$ М и до 5 мкг/л - в виноградном соке без предварительного разделения или концентрирования.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Evtugyn G.A., Gogol E.V., Ivanov A.N., Latipova V.Z. Flow-injection analysis of cholinesterase inhibitors: optimization of detection system. / International Congress on Analytical Chemistry. Moscow June 15-21, 1997. Abstracts. 1997. V.1. F-12.
2. Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Gogol E.V., Marty J.-L., Budnikov H.C. Carbon-paste amperometric biosensor for the flow-through determination of cholinesterase inhibitors. / ESEAC'98. 7th European Conference on Electroanalysis. Book of Abstracts. Coimbra, 1998. P.188.
3. Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Gogol E.V., Budnikov H.C. The comparative determination of cholinesterase inhibitors in flow-through and batch conditions. / 3rd INCO-Copernicus Workshop "Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in the field" Coimbra, May 1998. P.24.
4. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Ризаева Е.П., Иванов А.Н., Латыпова В.З. Сравнительная оценка электрохимических биосенсоров для определения ингибиторов - загрязнителей окружающей среды. / "Анализ объектов окружающей среды" Тез. докл. III Всерос. конф. "Экоаналитика-98". Краснодар 20-25 сент. 1998. С.69-70.
5. Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Gogol E.V., Marty J.L., Budnikov H.C. Amperometric flow-through biosensor for the determination of cholinesterase inhibitors. // Anal. Chim. Acta. 1999. V.385. P.13-21.
6. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Ризаева Е.П., Иванов А.Н., Латыпова В.З. Сравнительная оценка электрохимических биосенсоров для определения ингибиторов - загрязнителей окружающей среды. // Журн.аналит.химии. 1999. Т.54. № 9. С.973-982.
7. Ivanov A.N., Evtugyn G.A., Gyurcsanyi R.E., Toth K., Budnikov H.C. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. // Anal. Chim. Acta. 2000. V.404. № 1. P.55-65.
8. Ivanov A.N., Stoikova E.E., Stoikov I.I., Evtugyn G.A., Antipin I.S., Budnikov H.C. The influence of the modification of sensor surface on the analytical performance

- of electrochemical cholinesterase biosensors. / 11 Russian-Japan Analytical Symposium on Analytical Chemistry, Moscow, 21-24 Aug.2000, L 31.
9. A.N.Ivanov, L.V.Lukachova, G.A.Evtugyn, A.A.Karyakin, H.C.Budnikov Cholinesterase biosensor based on carbon electrode modified with processed polyaniline. XVI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 1-6 June 2001. Book of Abstracts. 2001. Bratislava, P.126.
10. Budnikov H.C., Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Ivanov A.N. Biochemical detection of environmental pollutants based on enzyme-inhibition and host-guest complexation./ ASIANALYSIS VI. The Sixth Asian Conference on Analytical Sciences. Aug.7-10 2001, Tokyo, Japan, p.41.
11. Evtugyn G.A., Budnikov H.C., Ivanov A.N. Inhibitor determination based on modified electrochemical sensors: affecting nature. / 7th International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry, 26-29 Sept. 2001, Bucharest, Romania, Book of Abstracts, O10.
12. Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Иванов А.Н., Супрун Е.В. Одноразовые амперометрические биосенсоры в эколого-аналитическом контроле.// Микросистемная техника. 2001. №7. С.45-50.
13. Budnikov H., Evtugyn G., Stoikova E., Ivanov A. Photometric detection of host-guest complexation based on biochemical indicating reaction.// Anal.Sci. 2001. V.17. Suppl. P. a183-a186.
14. Ivanov A.N., Lukacheva L.V., Evtugyn G.A., Karyakina E.E., Kiseleva S.G., Budnikov H.C., Orlov A.V., Karpacheva G.P., Karyakin A.A. Polyaniline modified cholinesterase sensor for pesticide determination.// Bioelectrochemistry. 2002. V.55. № 1-2. P.75-77.
15. Белякова С.В., Иванов А.Н., Евтюгин Г.А., Будников Г.К. Ферментные тест-методы оценки загрязнения винограда и продуктов виноделия: влияние матрицы./ Всерос. конф. "Актуальные проблемы аналитической химии". Москва, 11-15 марта 2002 г. М. Т.2. С.276-277.
16. G.A.Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Budnikov H.C. Modification of carbon electrodes for improvement of analytical characteristics of cholinesterase sensors./ Matrafured 2002. International Conference on Electrochemical Sensors. Matrafured. 2002. Oct.13-18. Book of Abstracts. P.W2.
17. Ivanov A.N., Stoikov I.I., Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Budnikov H.C. Amperometric enzyme sensors modified with calix[4]arenes for the sensitive detection of host-guest complexation./ Euroanalysis 12. Dortmund Sept.8-13. 2002. Book of Abstracts. P. 309.
18. Иванов А.Н., Евтюгин Г.А., Брайнина Х.З., Будников Г.К., Стенина Л.Э. Холинэстеразные сенсоры на основе толстопленочных графитовых электродов для проточно-инжекционного определения фосфорорганических пестицидов.// Журн. аналит. химии. 2002. Т. № 11. С.1224-1230.

