

На правах рукописи



Юнусов Равиль Рэмилович

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА
ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ
ЛИГАНДОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: Евгенийев Михаил Иванович,
доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

Гоголашвили Эдуард Лаврентьевич
кандидат химических наук,
Начальник Центра химико-аналитических исследований ФГБУН «Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова» КНЦ РАН

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г.Уфа

Защита состоится «5» декабря 2013 г. в 14-30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А. М. Бутлерова КФУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КФУ, Химический институт им. А.М. Бутлерова.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Казымова М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Создание средств экспресс-контроля потенциально опасных химических и биологических факторов является приоритетной задачей развития современной аналитической химии, направленное на обеспечение безопасности общества и здоровья населения. Угрозы биологического и химического терроризма, а также растущие объемы применения химических средств защиты растений заставляют интенсифицировать исследования в указанной области. Применительно к веществам нервно-паралитического действия достижение требуемых характеристик чувствительности и селективности определения токсикантов достигается, в первую очередь, с применением фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Являясь биологической мишенью для веществ нервно-паралитического действия, АХЭ реагирует на их присутствие снижением своей активности, что может быть зафиксировано различными физико-химическими методами. Несмотря на то, что механизм ингибирования АХЭ и способы регистрации ее активности в настоящее время хорошо изучены, остаются задачи обеспечения селективности отклика и повышения чувствительности определения пестицидов антихолинэстеразного действия. Их решение требует дальнейшего развития соответствующих методов регистрации сигнала, опирающихся на достижения современного материаловедения и аналитического приборостроения для подавления влияния компонентов матрицы образца и повышения чувствительности преобразователей сигнала.

Электрохимические способы регистрации сигнала холинэстеразных сенсоров выгодно отличаются от оптических методов простотой используемого оборудования, удобством реализации в виде компактных сенсоров, чувствительностью регистрации сигнала. Внедрение новых наноразмерных материалов, обеспечивающих коммуникацию биохимических и электрохимически активных компонентов, может существенно улучшить характеристики электрохимической регистрации сигнала об ингибировании холинэстераз, что расширит область контроля остаточных количеств пестицидов антихолинэстеразного действия.

Целью исследования явилось создание электрохимических холинэстеразных сенсоров для определения фосфорорганических пестицидов на основе новых наноразмерных материалов – носителей фермента и медиаторов электронного переноса, отличающихся улучшенными аналитическими и операционными характеристиками, а также их тестирование на модельных растворах фосфорор-

ганических пестицидов и искусственных объектах анализа.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

- изучить условия регистрации сигнала – тока окисления тиохолина – с использованием стеклоуглеродных электродов, модифицированных новыми медиаторными системами – комбинированными покрытиями из окисленных углеродных нанотрубок (ОУН) и фталоцианина кобальта (ФЦК);
- определить рабочие условия иммобилизации АХЭ с применением поликарбоксилированных макроциклических носителей – производных тиакаликс[4]арена, а также углеродных наноразмерных материалов, для достижения высокой чувствительности регистрации ингибирования фермента;
- установить операционные характеристики измерения сигнала разработанных биосенсоров и аналитические характеристики определения с их помощью ацетилтиохолина (АТХ) и фосфорорганических пестицидов в зависимости от способа модификации преобразователя сигнала;
- провести тестирование модельных растворов ингибиторов и искусственных образцов загрязненных вод и фруктовых соков с помощью разработанных холинэстеразных сенсоров и определить требования к пробоподготовке образцов для учета матричного эффекта.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые:

- предложено использовать новые медиаторные системы на основе композиций углеродных материалов (ОУН и углеродная сажа (УС)) и ФЦК для снижения рабочего потенциала окисления тиохолина;
- разработаны способы иммобилизации АХЭ на макроциклических поликарбоксилированных носителях на тиакаликс[4]ареновой основе;
- проведено систематическое исследование влияния строения поверхностного слоя (природа медиатора и носителя фермента) и установлено влияние конфигурации макроциклического носителя и строения заместителей на кинетику ингибирования и операционные характеристики холинэстеразных сенсоров;
- проведено систематическое исследование аналитических характеристик определения фосфорорганических пестицидов с помощью биосенсоров, различающихся по способу модификации поверхности и иммобилизации фермента;

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- разработаны простые и надежные способы модификации электродов углеродными материалами, ФЦК и макроциклическими поликарбоксилированными

носителями фермента, обеспечивающими быстрый отклик и высокую точность измерения сигнала биосенсоров на субстрат и ингибиторы фермента;

- предложены высокочувствительные способы определения фосфорорганических соединений – ингибиторов фермента – с хроноамперометрической регистрацией сигнала;

- разработаны способы пробоподготовки для снижения влияния компонентов матрицы при количественном определении пестицидов в водах различного назначения и для обнаружения веществ антихолинэстеразного действия в свежесжатых фруктовых соках.

На защиту выносятся:

- результаты модификации стеклоуглеродных электродов углеродными наноматериалами и ФЦК, позволяющей снизить рабочий потенциал окисления тиохолина до 50 - 150 мВ при сохранении высокой скорости отклика и отсутствии отравления электрода тиольными соединениями;

- условия карбодиимидной ковалентной иммобилизации АХЭ на модифицированных преобразователях сигнала, обеспечивающие уменьшение расхода фермента и увеличение чувствительности определения фосфорорганических пестицидов за счет сохранения высокой диффузионной проницаемости слоя для субстрата и ингибитора и уменьшенного расхода фермента на единицу поверхности электрода;

- рабочие условия измерения сигнала ацетилхолинэстеразных сенсоров на субстрат и ингибиторы в зависимости от способа модификации и фермент-ингибиторной специфичности, свидетельствующие об отсутствии мешающего влияния гетерогенного характера реакции на измеряемые параметры биосенсора.

- определение наномолярных количеств пестицидов (параоксон, малаоксон, малатион) с чувствительностью, зависящей от природы карбоксилированных заместителей и конфигурации тиакаликс[4]аренов, в модельных растворах, водах и фруктовых соках.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований докладывали на Итоговой научной конференции Химического института им.А.М.Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, 2011), Конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Научно-образовательного центра «Материалы и технологии 21 века» при Казанском (Приволжском) федеральном университете (Казань, 2011), III Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012» (Уфа – Абзаково, 2012), Симпо-

зиуме НАТО «Portable chemical sensors for the rapid detection of chemical and biological agents and other weapons of terrorism» (Лунд - Сногхольм, Швеция, 2011).

Публикации. По результатам исследований опубликованы 2 статьи в международных реферируемых журналах, 1 глава в коллективной монографии и 3 тезисов доклада на конференциях различного уровня.

Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоял в постановке и решении основных задач, проведении основных экспериментальных исследований в области модификации электродов макроциклическими рецепторами и углеродными материалами, изучении их вольтамперных и импедиметрических характеристик, разработке методик определения субстрата и ингибиторов холинэстераз, оценке кинетических параметров ингибирования, интерпретации и систематизации полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка использованных библиографических источников (141 источник). Диссертация изложена на 127 страницах компьютерной верстки, содержит 22 рисунка и 16 таблиц.

Во **Введении** раскрыта актуальность темы исследования, определены цели и задачи, сформулированы научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В **Литературном обзоре** (глава 1) рассмотрены особенности функционирования холинэстеразных сенсоров для определения фосфорорганических пестицидов. В частности рассмотрены особенности взаимодействия холинэстеразы с необратимыми ингибиторами,

В **Экспериментальной части** (глава 2) представлены данные об объектах исследования, используемых методах и измерительном оборудовании, приведены условия формирования чувствительного слоя разработанных биосенсоров, условия измерения и способы обработки сигнала в отношении определяемых соединений.

Главы 3 и 4 посвящены обсуждению полученных результатов.

Диссертация выполнена на кафедре аналитической химии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при поддержке грантов РФФИ 09-03-92420_КЭ «Композиты на основе углеродных нанотрубок и электрохимически активных полимеров для создания новых биосенсоров» и 11-03-381а «Амплификация сигнала электрохимических (био)сенсоров путем самосборки полиэлектrolитов с включением наноразмерных медиаторных систем», а

также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (мероприятие № 1.2.1 Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук, госконтракт № 16.740.11.0496 от 16 мая 2011 г. «Электрохимические ДНК-сенсоры для детектирования белков и токсинов на основе наноразмерных медиаторных систем»).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Амперометрические холинэстеразные сенсоры изготавливали на основе стеклоуглеродных электродов (СУЭ) с площадью рабочей поверхности 2.5 мм^2 , модифицированных ФЦК и ОУН, ФЦК и УС, ФЦК и карбоксилированными тиакаликс[4]аренами (структурные формулы приведены в табл.1). Кроме того, ингибирование фермента изучали на печатных графитовых электродах, изготовленных методом трафаретной печати на полуавтоматическом принтере DEK 248 (DEK, Англия). В работе использовали АХЭ (КФ 3.1.1.7) из электрического органа угря («Sigma-Aldrich», Германия, 687 Е/мг белка). Ковалентную иммобилизацию фермента проводили путем карбодиимидного связывания с помощью *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид хлорида и *N*-гидроксисукцинимид. Субстратом ферментативной реакции служил ацетилтиохолин хлорид (АТХ). Продукт его гидролиза (тиохолин) регистрировали по току окисления при 50-200 мВ отн. Ag/AgCl.

В качестве модельных необратимых ингибиторов АХЭ использовали стандартные образцы фосфорорганических пестицидов Pestanal («Sigma-Aldrich», США). Степень ингибирования иммобилизованной АХЭ рассчитывали как относительное уменьшение тока окисления тиохолина, измеренного до и после инкубирования биосенсора в растворе ингибитора в течение 15 мин. Окисление тионовых пестицидов перед измерением проводили с использованием электрогенерированного хлора, получаемого в гальваностатическом электролизе в растворе пестицида, содержащем 0.1 М NaCl.

Электрохимические измерения проводили в трехэлектродной нетермостатированной ячейке в режиме постоянноточковой вольтамперометрии и хроноамперометрии с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N («Metrohm Autolab b.v.», Голландия). Электрохимический импеданс измеряли с помощью модуля FRA2 AUTOLAB PGSTAT 302N в присутствии эквимольной смеси феррицианидов калия. Расчет сопротивления переноса заряда проводили

по эквивалентной схеме Рэндлса.

Таблица 1. Список использованных в работе тиакаликс[4]аренов

Шифр	Название тиакаликс[4]арена	Структура
1a	5,11,17,23-Тетра- <i>трет</i> -бутил-25,26,27,28-тетракис-[(ди(гидроксикарбонилметил)иминокарбонил)-метокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (<i>конус</i>)	
16	5,11,17,23-Тетра- <i>трет</i> -бутил-25,26,27,28-тетракис-[(ди(гидроксикарбонилметил)иминокарбонил)-метокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (<i>частичный конус</i>)	
1в	5,11,17,23-Тетра- <i>трет</i> -бутил-25,26,27,28-тетракис-[(ди(гидроксикарбонилметил)иминокарбонил)-метокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (<i>1,3-альтернат</i>)	
2a	5,11,17,23-Тетра- <i>трет</i> -бутил-25,26,27,28-тетра[(гидроксиацетидацетидакарбонил)метокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (<i>конус</i>)	

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРА НА ОПЕРАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ СЕНСОРОВ

В качестве модификаторов электродов при создании ацетилхолинэстеразных сенсоров в работе были использованы материалы, улучшающие электрохимические характеристики сенсоров при определении продукта ферментативной реакции - тиохолина. К ним относятся ФЦК, ОУН и УС. Необходимость их использования обусловлена высоким перенапряжением окисления тиохолина, препятствующим применению сенсоров в присутствии электрохимически активных примесей, а также необходимостью увеличения удельной площади поверхности преобразователя сигнала для повышения эффективности иммобилизации АХЭ. Также в работе в качестве модификаторов поверхности сенсоров были использованы тиакаликс[4]арены, способные образовывать наноструктурированные покрытия. Их присутствие увеличивает эффективность ковалентной иммобилизации фермента при сохранении проницаемости слоя для низкомолекулярных носителей заряда. В структуре ОУН, УС и тиакаликс[4]аренов присутствуют карбоксильные группы, участвующие в карбодиимидной сшивке фермента.

Модифицированные электроды были изучены методом спектроскопии электрохимического импеданса (сопротивление переноса заряда R_2 для электродов, модифицированных различными комбинациями углеродных наноматериалов, ФЦК и макроциклических рецепторов, приведено на рис.1).

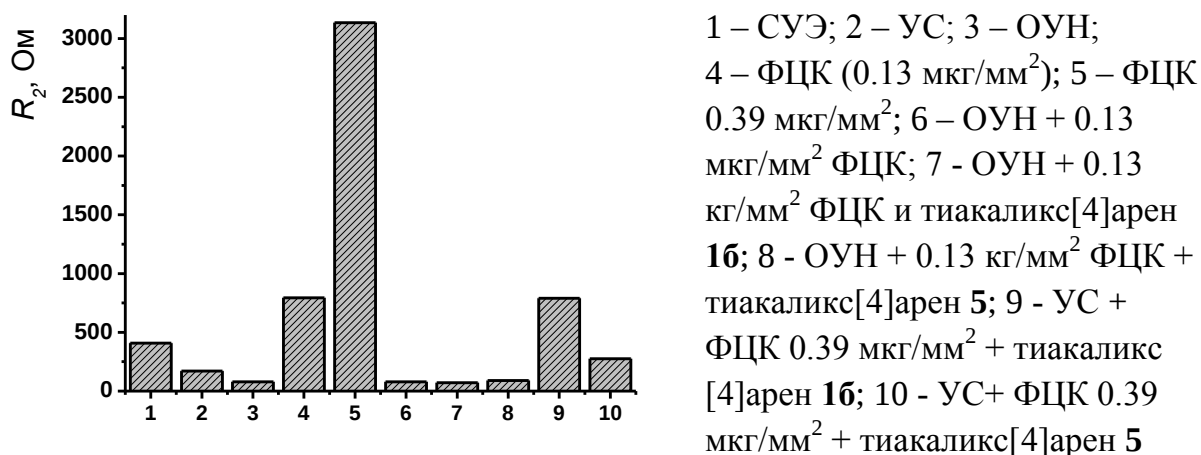


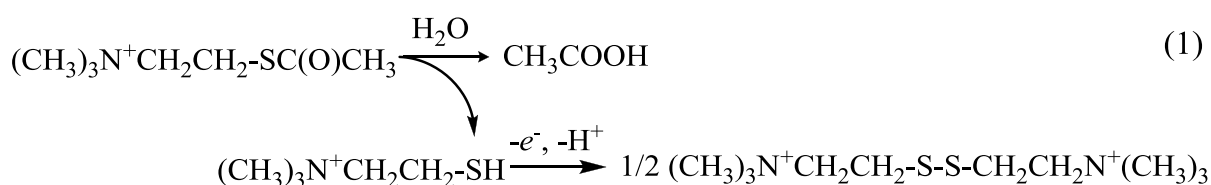
Рисунок 1 - Зависимость сопротивления переноса заряда от способа
модификации СУЭ

ФЦК в отсутствие углеродных наноматериалов оказывает в целом блокирующее действие на прямой перенос электрона, возрастающее с увеличением поверхностной концентрации ФЦК. Введение в состав композитных покрытий одновременно углеродных наноматериалов и ФЦК нивелирует блокирующий эффект последнего. Значения сопротивления и емкости остаются примерно постоянными в пределах погрешности измерения параметров импеданса. Как и в случае самого СУЭ, увеличение содержания ФЦК на наноуглеродных материалах ухудшает условия электронного переноса независимо от природы наноуглеродного материала. Однако для УС эффект проявляется существенно больше, чем для ОУН. При добавлении макроциклических рецепторов, несущих карбоксильных группы и свободных от них, к ОУН переход от тиакаликс[4]арена **16** к незамещенному тиакаликс[4]арену **5** практически не влияет на значение сопротивления, тогда как для УС внедрение поликарбоксилированных рецепторов увеличивает сопротивление относительно незамещенного тиакаликс[4]арена практически вдвое. Поликарбоксилированные тиакаликс[4]арены, осажденные на СУЭ отдельно или совместно со ФЦК, увеличивают сопротивление переноса заряда в силу частичного или полного блокирования поверхности электрода.

Результаты исследования методом спектроскопии электрохимического импеданса показали, что происходит увеличение истинной площади поверхности электрода, покрытого наноуглеродными материалами, относительно чистого СУЭ. ФЦК, не обладая собственной электропроводностью в выбранном интервале потенциалов, снижает скорость электронного обмена в соответствии со степенью заполнения поверхности. При этом использование композиций ФЦК и наноуглеродных материалов практически нивелирует его влияние на сопротивление переноса заряда. Наибольшей эффективностью обладают ОУН, присутствие которых снижает сопротивление до 10 раз, независимо от присутствия в слое ФЦК. Замена поликарбоксилированных рецепторов на незамещенный тиакаликс[4]арен незначительно меняет параметры импеданса. Напротив, УС при высокой эффективности катализа электронного обмена на границе электрод-раствор обладает меньшей способностью к сорбционному удерживанию других компонентов слоя, что не позволяет сохранить низкое сопротивление заряда при осаждении на электрод макроциклических рецепторов и ФЦК.

Совершенствование конструкции холинэстеразных сенсоров направлено на снижение рабочего потенциала измерения сигнала и увеличение абсолютных значений регистрируемых токов. Исследование модифицированных ОУН элек-

тродов с помощью спектроскопии электрохимического импеданса показало увеличение эффективности электронного переноса. Также несколько уменьшился разброс характеристик электродов (токи заряжения, дрейф регистрируемых токов во времени) в связи с нивелированием вариаций рельефа поверхности при очистке СУЭ перед нанесением модификатора. В серии последовательных измерений на одном электроде и параллельных измерений на различных электродах погрешность измерения тока окисления тиохолина не превышала 2% (6 измерений). Кроме того, ОУН играют роль трехмерной матрицы для включения ФЦК в состав модифицирующего слоя. ФЦК служит катализатором окисления тиохолина, образующегося при гидролизе АТХ (1).



На циклических вольтамперограммах, регистрируемых с помощью АХЭ-сенсора на основе СУЭ, модифицированного ОУН и ФЦК, пик окисления тиохолина наблюдается при потенциале -100 ... -50 мВ, в то время как на чистом СУЭ – при 500 мВ, на электроде, модифицированном только ОУН, – при 50-200 мВ. Введение ФЦК в слой ОУН на поверхности сенсора дополнительно снижает потенциал окисления тиохолина на 100 мВ и заметно уменьшает фоновые токи заряжения, что предположительно связано со стерическим блокированием отрицательного заряда немодифицированных карбоксилатных групп нанотрубок и снижением влияния на фоновые токи положительного заряда тиохолина и продукта его окисления - дисульфида. Линейный участок концентрационной зависимости тока окисления, регистрируемого методом хроноамперометрии при потенциале +50 мВ на электроде, модифицированном ФЦК и ОУН, описывается уравнением $I, \text{ мкА} = 0.0006 + 226 \times c, \text{ мМ}$ ($R = 0.9988$).

Наличие свободных карбоксильных групп ОУН на поверхности модифицированного СУЭ позволяет иммобилизовать большее количество АХЭ и увеличить сигнал по сравнению с немодифицированным электродом. Для установления аналогичной зависимости в отношении ингибиторов был изучен сигнал сенсора на основе ОУН и ФЦК в отношении малаоксона. Результаты, полученные для различных количеств иммобилизованного фермента на электроде, представлены на рис.2. Как видно, увеличение тока окисления тиохолина сопряжено со снижением чувствительности определения ингибитора.

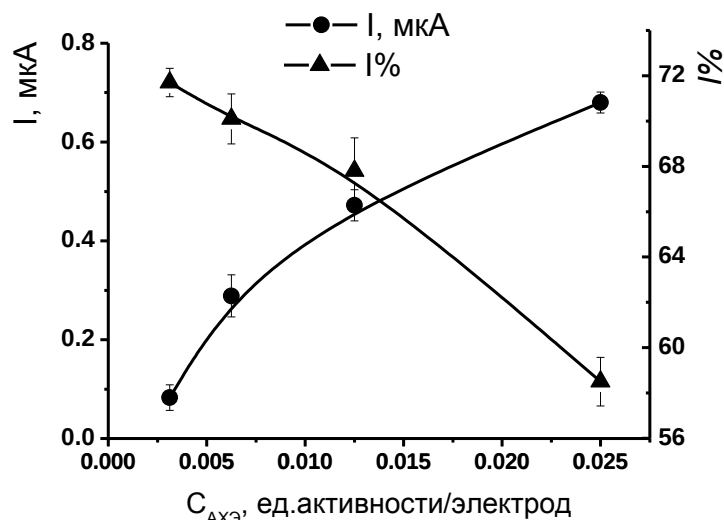


Рисунок 2 - Зависимость тока окисления тиохолина (I , μA) и степени ингибирования АХЭ ($I\%$) после 15 мин. инкубирования в растворе 20 $\mu\text{г/л}$ малаоксона от количества фермента, иммобилизованного на электроде ($E/\text{электрод}$). Электрод модифицирован ОУН и ФЦК

Исходя из соотношения погрешности измерения и чувствительности измерения ингибирования признано целесообразным использовать в дальнейшем концентрацию фермента 0.0065 Е АХЭ на электрод.

При использовании УС максимум тока окисления тиохолина наблюдается в интервале +100...+150 мВ, совместно с ФЦК - при потенциале 0 мВ. В дальнейшем для измерения сигнала электрод поляризовали при +100 мВ, что обеспечило наиболее стабильный и воспроизводимый отклик ацетилхолинэстеразного сенсора на тиохоллин. Зависимость сигнала от количества АХЭ, взятого для иммобилизации, имело вид, сходный с полученным в присутствии ОУН.

Помимо нанокуглеродных материалов, в качестве матрицы для иммобилизации АХЭ были изучены поликарбоксилированные производные тиакаликс[4]аренов, различающиеся по длине цепи заместителей нижнего обода и конфигурации макроцикла. Они также могут неспецифически концентрировать фосфорорганические пестициды, повышая чувствительность их определения. На рис. 3 представлена зависимость сигнала ацетилхолинэстеразных сенсоров, модифицированных тиакаликс[4]аренами **16**, **3** и **4**, от их количества на электроде. Сначала при увеличении поверхностной концентрации тиакаликс[4]аренов анодный ток окисления тиохолина растет, что обусловлено увеличением количества АХЭ в слое.

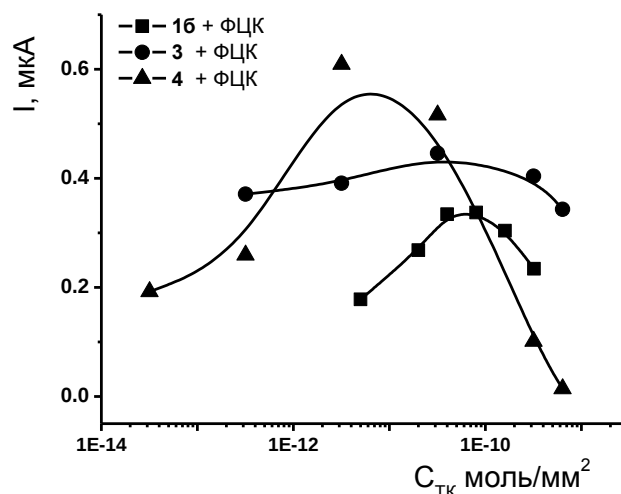


Рисунок 3 - Зависимость сигнала АХЭ сенсоров, модифицированных тиаликс[4]аренами **16**, **3** и **4** и ФЦК, от количества тиаликс[4]арена (C_{TK}) на поверхности. Хроноамперометрические измерения при +200 мВ, 1.0 мМ АТХ

С последующим увеличением концентрации макроциклов свыше 0.01 нМ/мм² наблюдается уменьшение токов. Это связано с уменьшением проводимости поверхностного слоя сенсора в связи с включением в него избытка неактивных компонентов. В дальнейших исследованиях использовали поверхностную концентрацию тиаликс[4]аренов 0.03 нМ/мм². Она обеспечивала достаточное количество центров связывания для иммобилизации фермента и почти не снижала проводимость поверхностного слоя сенсора. Характеристики определения АТХ с помощью разработанных сенсоров приведены в табл. 3. При высоких концентрациях АТХ (около 10 мМ) токи снижаются в силу автоингибирования фермента.

В серии конформеров *частичный конус* (**16**, **26**) и *1,3-альтернат* (**1в**, **2в**) показывают более высокую чувствительность сигнала (угол наклона градуировочной зависимости) по сравнению с конфигурацией *конус*. Минимальная чувствительность наблюдается для сенсора с **1а конус** с максимальным количеством карбоксильных групп в заместителях. Тиаликс[4]арены **3**, **4** с одной карбоксильной группой обладают наибольшей чувствительностью и минимальным пределом обнаружения субстрата. Добавление тиаликс[4]арена **16** и **5** в поверхностный слой ОУН и УС снижает чувствительность определения АТХ.

Константу Михаэлиса K_m (каж.) вычисляли методом Лайнуивера-Берка путем построения зависимости в двойных обратных координатах $1/I - 1/c_{ATX}$, где I - сигнал биосенсора, а c_{ATX} - концентрация субстрата.

Таблица 3. Аналитические характеристики определения АТХ с помощью биосенсоров, модифицированных различными компонентами совместно с ФЦК

Модификаторы + ФЦК	Фермент, Е / электрод	ДОК, мМ	C_{lim} , мМ	K_m (каж.), мМ	$I, \text{ мкА} = a + b \times c_{\text{АТХ}}, \text{ М}$		
					a	b	R
ОУН	0.00625	0.01 - 1.0	0.01	0.78	0.0463	463.2	0.9904
УС	0.00625	0.01 - 1.0	0.01	0.72	0.0529	507.4	0.9924
ОУН + 1б	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	0.74	0.0577	344.0	0.9278
УС + 1б	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	0.78	0.0809	372.2	0.9812
ОУН + 5	0.0125	0.1 - 1.0	0.1	2.71	0.0369	259.6	0.9978
УС + 5	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	0.50	0.0369	244.9	0.9547
1а	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	0.75	0.0127	162.4	0.9737
1б	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	1.40	0.0189	455.1	0.9872
1в	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	0.61	0.0264	383.4	0.9892
2а	0.0125	0.01 - 1.0	0.01	1.20	0.0171	306.9	0.9863
2б	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	1.12	0.0198	332.4	0.9835
2в	0.00625	0.1 - 1.0	0.1	1.22	0.0456	498.8	0.9930
3	0.00625	0.01 - 1.0	0.01	1.93	0.0066	509.0	0.9993
4	0.00625	0.01 - 1.0	0.01	1.81	0.0032	666.9	0.9931

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСЕНСОРОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

С целью изучения влияния наноматериалов, использованных для модификации поверхности сенсора и иммобилизации фермента, на поведение ингибиторных биосенсоров проведено сравнительное исследование биосенсоров для определения необратимых ингибиторов АХЭ – фосфорорганических пестицидов в модельных растворах. Эксперименты проводили, используя в качестве преобразователя сигнала печатные графитовые электроды. Предварительно было показано, что электрохимические реакции на них не отличались от процессов на СУЭ.

Для оценки влияния использованных модификаторов на взаимодействие иммобилизованного фермента с пестицидами были рассчитаны кажущиеся константы бимолекулярного взаимодействия фермент-ингибитор. Для этого использовали уравнение (2) принимая регистрируемый ток окисления тиохолина мерой скорости ферментативной реакции.

$\ln \frac{I_0}{I_t} = k_{\text{II(каж)}} c_I \tau$ (2) где I_0 и I - сигнал сенсора до и после инкубирования в растворе ингибитора, $k_{\text{II(каж)}}$ - кажущаяся константа бимолекулярного взаимодействия, c_I - концентрация ингибитора, τ - время инкубирования

Рассчитанные значения $k_{\text{II(каж)}}$ представлены в табл.4. Для всех изученных биосенсоров значения $k_{\text{II(каж)}}$, полученные для малаоксона, больше, чем для параоксона, хотя для нативного фермента соотношение обратно (0.287 и 0.114 мкМ⁻¹ мин⁻¹, соответственно). Сравнение показывает, что для параоксона иммобилизация фермента слабо влияет на необратимое ингибирование АХЭ, тогда как для малаоксона иммобилизация увеличивает изменение активности на порядок величины.

Таблица 4. Кажущиеся константы бимолекулярного ингибирования иммобилизованной АХЭ $k_{\text{II(каж)}}$, мкМ⁻¹мин⁻¹, для холинэстеразных сенсоров с различными модификаторами и ФЦК в составе поверхностного слоя.

Модификаторы + ФЦК	$k_{\text{II(каж)}}$, мкМ ⁻¹ мин ⁻¹	
	Параоксон	Малаоксон
ОУН	0.255±0.006	1.103±0.053
УС	0.539±0.115	0.853±0.090
ОУН + 1б	0.290±0.023	1.094±0.051
УС + 1б	0.458±0.019	1.162±0.067
ОУН + 5	0.114±0.008	0.661±0.041
УС + 5	0.277±0.025	1.139±0.113
1а	0.315±0.010	1.070±0.063
1б	0.737±0.063	1.124±0.106
1в	0.289±0.018	1.508±0.120
2а	0.539±0.025	1.108±0.133
2б	0.300±0.027	1.329±0.090
2в	0.319±0.018	1.072±0.060
3	0.221±0.009	0.891±0.061
4	0.370±0.029	0.404±0.011

При степени ингибирования 10-50 % (10-200 мкг/л параоксона и 2 - 50

мкг/л малаоксона) зависимость степени ингибирования от логарифма концентрации пестицида может быть аппроксимированы линейной функцией. Полная концентрационная зависимость степени ингибирования, измеренная при помощи разработанных биосенсоров, количественно выражается логистической функцией (2),

$$I\% = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{c_I}{x_0}\right)^p} \quad (2)$$

где $I\%$ - степень ингибирования АХЭ, %, c_I - концентрация пестицида, мкг/л, A_1 и A_2 – верхний и нижний пределы ингибирования, x_0 – параметр, близкий к I_{50} , p – мера чувствительности определения ингибирования

В табл. 5 и 6 представлены параметры логистической функции зависимости степени ингибирования от концентрации пестицидов в модельных растворах.

Таблица 5. Аналитические характеристики определения параоксона, мкг/л, с помощью разработанных ацетилхолинэстеразных сенсоров

Модификаторы + ФЦК	$I\% = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{c_I}{x_0}\right)^p}$				
	A_1	A_2	x_0	p	R
ОУН	1.40±0.23	100.00±8.32	50.31±10.84	1.4104±0.2612	0.9907
УС	9.43±1.79	100.00±10.27	58.68±11.56	1.0420±0.2413	0.9889
ОУН + 1б	4.59±0.56	86.77±4.59	44.13±3.52	1.4941±0.2567	0.9871
УС + 1б	1.50±0.57	100.00±11.03	37.43±9.62	1.0502±0.2769	0.9826
ОУН + 5	8.35±1.46	89.30±3.01	94.43±3.07	1.9293±0.2036	0.9993
УС + 5	0.00±0.30	100.00±9.49	46.89±5.82	0.9895±0.2854	0.9956
1а	4.06±1.74	93.94±4.56	42.94±3.40	1.1765±0.1903	0.9952
1б	6.82±1.02	100.00±8.27	49.97±7.38	1.0241±0.2147	0.9911
1в	6.25±1.33	100.00±4.03	55.84±4.62	1.1488±0.1247	0.9956
2а	3.24±0.71	100.00±2.59	39.78±1.39	1.0480±0.1124	0.9983
2б	0.00±0.42	100.00±10.03	38.25±6.55	1.2069±0.2440	0.9930
2в	3.98±1.09	77.58±2.60	28.86±1.74	1.3014±0.1746	0.9915
3	1.47±0.14	100.00±4.25	59.54±3.70	1.1917±0.1292	0.9983
4	4.30±1.77	100.00±9.08	98.83±10.94	0.9858±0.1832	0.9937

Таблица 6. Аналитические характеристики определения малаоксона, мкг/л, с помощью разработанных ацетилхолинэстеразных сенсоров

Модификаторы + ФЦК	$I\% = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{c_I}{x_0}\right)^p}$				
	A_1	A_2	x_0	p	R
ОУН	9.90±0.71	87.78±1.52	12.22±0.50	1.6874±0.1141	0.9881
УС	15.16±1.67	100.00±8.89	21.20±2.22	1.7566±0.2128	0.9859
ОУН + 1б	4.81±2.61	85.57±5.11	11.17±1.53	1.3643±0.2800	0.9886
УС + 1б	9.62±1.56	74.93±5.45	8.57±1.12	2.0690±0.4661	0.9929
ОУН + 5	4.56±1.40	99.55±10.96	27.04±3.80	1.0764±0.1744	0.9966
УС + 5	6.02±2.28	100.00±5.02	12.26±1.45	1.0956±0.1579	0.9965
1а	5.79±2.53	100.00±7.09	14.13±1.36	1.2158±0.2319	0.9926
1б	14.65±2.76	80.63±5.72	11.64±1.17	1.4328±0.2018	0.9772
1в	0.00±0.98	98.01±2.89	6.74±0.47	0.9780±0.0602	0.9996
2а	0.00±5.74	100.00±9.50	10.33±1.11	0.9440±0.2578	0.9916
2б	7.77±1.39	100.00±14.19	11.54±1.58	1.0481±0.1994	0.9913
2в	12.13±0.56	94.86±1.70	14.97±0.65	1.4873±0.0832	0.9991
3	3.62±1.39	100.00±5.86	15.15±1.14	1.3480±0.1926	0.9916
4	0.00±5.92	100.00±11.21	31.11±2.46	1.2901±0.2951	0.9938

Недостатком использования логистических функций является относительная сложность расчетов, однако такая функция наиболее полно описывает исходные данные. Это следует из больших значений R и из анализа остатков - отклонений экспериментальных данных от аппроксимирующих функций. Они меньше по абсолютным значениям и распределены более однородно в зависимости от концентрации пестицида по сравнению с линейной зависимостью.

В табл.7 представлены показатели I_{15} и I_{50} (концентрации ингибиторов, вызывающие 15% и 50% ингибирования) разработанных биосенсоров для параоксона и малаоксона. Критерием чувствительности сигнала биосенсоров к определяемым пестицидам может служить показатель I_{50} , а I_{15} можно считать пределом обнаружения пестицида по критерию 3σ (погрешность измерения ингибирования 5%).

Таблица 7. Значения I_{15} и I_{50} параоксона и малаоксона, рассчитанные по логистической функции концентрационной зависимости сигнала

Модификаторы + ФЦК	Параоксон, мкг/л		Малаоксон, мкг/л	
	I_{15}	I_{50}	I_{15}	I_{50}
ОУН	13.71	49.30	2.53	12.66
УС	4.29	48.02	2.88	17.26
ОУН + 1б	12.12	50.82	2.70	13.31
УС + 1б	6.49	36.36	2.67	10.83
ОУН + 5	27.03	97.32	3.87	24.95
УС + 5	8.12	46.89	1.57	10.90
1а	8.01	44.60	2.27	12.77
1б	5.08	43.30	2.14	12.87
1в	7.72	49.71	1.17	7.02
2а	6.03	37.32	1.65	10.33
2б	9.09	38.25	1.10	9.82
2в	7.60	42.77	1.60	13.36
3	12.73	58.06	3.41	14.33
4	12.08	90.22	8.11	31.11

Найденные значения I_{15} хорошо согласуются со значениями $k_{II(каж)}$, представленными в табл.4. Наименьшими пределами обнаружения при определении параоксона обладают сенсоры, модифицированные УС ($I_{15} = 4.29$ мкг/л, $k_{II(каж)} = 0.539 \pm 0.215$), и тиакаликс[4]ареном **1б** ($I_{15} = 5.08$ мкг/л, $k_{II(каж)} = 0.737 \pm 0.063$ мкМ⁻¹мин⁻¹). При обнаружении малаоксона наилучшие показатели показали биосенсоры, включающие тиакаликс[4]арен **2б** *частичный конус* ($I_{15} = 1.10$ мкг/л, $k_{II(каж)} = 1.329 \pm 0.090$ мкМ⁻¹мин⁻¹) и **1в** *1,3-альтернат* ($I_{15} = 1.17$ мкг/л, $k_{II(каж)} = 1.508 \pm 0.120$ мкМ⁻¹мин⁻¹).

Ацетихолинэстеразные сенсоры, модифицированные ОУН, ФЦК и тиакаликс[4]ареном **1б**, были использованы для оценки возможности применения в контроле реальных объектов. Для этого использовали бутилированную питьевую воду «Волжанка» (Ундоровский завод минеральной воды «Волжанка»), приобретенную в местной торговой сети, и водопроводную воду г. Казани, отобранную непосредственно по месту проведения анализа. Для оценки влияния матрицы образцов и эффективности сенсоров при определении пестицидов ис-

пользовали метод «введено-найдено». Измерения степени ингибирования, проведенные по той же методике в образцах воды без введения ингибиторов, не показали ни значимого снижения сигнала, ни активации фермента. Таким образом, компоненты матрицы исследованных образцов не оказывали необратимого действия на фермент. Результаты определения представлены в таблице 8.

Таблица 8. Оценка правильности определения пестицидов в воде методом «введено-найдено» с помощью ацетилхолинэстеразных сенсоров, $n = 3$, $P < 0.05$

Модификаторы + ФЦК	Параоксон, мкг/л		Малаоксон, мкг/л	
	Введено	Найдено	Введено	Найдено
Питьевая вода "Волжанка"				
ОУН	30.0	33.3 ± 3.1	2.0	2.2 ± 0.4
Тиакаликс[4]арен 16	30.0	25.2 ± 4.0	10.0	8.9 ± 2.2
Водопроводная вода				
ОУН	30.0	32.1 ± 0.5	5.0	6.2 ± 0.5
Тиакаликс[4]арен 16	30.0	25.3 ± 3.9	10.0	8.7 ± 1.0

Биосенсор, модифицированный ОУН, всех случаях показывает несколько завышенные результаты, в то время как с сенсором, модифицированным тиакаликс[4]ареном **16**, результаты определения пестицидов оказываются заниженными по сравнению с введенным количеством ингибиторов.

Для повышения эффективности определения малатион предварительно окисляли до малаоксона по оригинальной методике с использованием хлора, генерированного *in situ* в процессе электролиза, проводимого в присутствии хлорида натрия. Избыток хлора после электролиза удаляли муравьиной кислотой. Для контроля методом «введено-найдено» были использованы сенсоры на основе тиакаликс[4]аренов **16**, **1в** и **26**, характеризующиеся наименьшим пределом обнаружения малаоксона. Инкубирование биосенсоров в растворах, полученных при электролиза в отсутствие пестицида, не приводило к значимому изменению сигнала биосенсора. Результаты, полученные при тестировании бутилированной воды, содержащей 2.6 мкг/л малатиона, приведены в табл.9. Наиболее точные результаты были получены при использовании биосенсора, модифицированного тиакаликс[4]ареном **16**. Все три протестированных сенсора могут быть использованы для обнаружения малатиона на уровне 2.5 мкг/л (10 мкг/л с учетом разбавления раствора при пробоподготовке), что отвечает установленному нормативу содержания в питьевых водах.

Таблица 9. Оценка правильности определения малатиона методом «введено – найдено» после его электрохимического окисления, n = 3, P<0.95

Модификаторы + ФЦК	Концентрация малатиона, мкг/л	
	Введено	Найдено
Тиакаликс[4]арен 1б	2.6	2.6 ± 0.3
Тиакаликс[4]арен 1в	2.6	2.5 ± 1.3
Тиакаликс[4]арен 2б	2.6	3.2 ± 0.9

Для контроля правильности определения малатиона в свежавыжатых соках из винограда и апельсина методом «введено-найденно» были использованы сенсоры на основе тиакаликс[4]аренов **1б**, **1в** и **2б**. Инкубирование биосенсоров в растворах соков, не содержащих пестицид, после проведения электролиза не меняло сигнал сенсоров. Характеристики чувствительности определения малатиона приведены в табл.10.

Таблица 10. Чувствительность определения малатиона с помощью ацетилхолинэстеразных сенсоров, модифицированных тиакаликс[4]аренами и ФЦК

Модификаторы + ФЦК	Концентрация малатиона, мкг/л			
	Виноградный сок		Апельсиновый сок	
	I ₁₅	I ₅₀	I ₁₅	I ₅₀
Тиакаликс[4]арен 1б	5	500	5	400
Тиакаликс[4]арен 1в	5	500	5	400
Тиакаликс[4]арен 2б	5	450	5	350

Результаты измерений показали сильное влияние матрицы исследуемых соков на сигнал ацетилхолинэстеразных сенсоров. По сравнению с водными растворами пестицида значительно увеличивается предел обнаружения и резко снижается чувствительность сигнала к малатиону. Причинами этого могут быть неполное окисление малатиона до малаоксона и маскирование ингибирующего действия пестицида компонентами матрицы сока. Увеличение времени электролиза сока с введенным известным количеством малатиона с 1 до 5 мин. не меняло степени ингибирования фермента. Следовательно, наиболее вероятным является взаимодействие компонентов матрицы сока или с малатионом, или с продуктами его окисления.

ВЫВОДЫ

1. Использование наноразмерных материалов – носителей фермента и медиаторов электронного переноса (фталоцианин кобальта, окисленные углеродные нанотрубки, углеродная сажа, карбоксилированные тиакаликс[4]арены) – в качестве модификаторов углеродных электродов в составе холинэстеразных сенсоров позволяет направленно регулировать чувствительность биосенсоров в отношении субстрата и ингибиторов холинэстераз, меняя предел обнаружения в 3-8 раз и наклон градуировочных зависимостей малаоксона и параоксона - в два раза.
2. Совместное использование фталоцианина кобальта с окисленными углеродными нанотрубками, углеродной сажей или карбоксилированными тиакаликс[4]аренами снижает рабочий потенциал окисления тioxолина до 100-200 мВ отн. Ag/AgCl и позволяет проводить измерения сигнала холинэстеразного сенсора в хроноамперометрическом режиме.
3. Разработан способ иммобилизации ацетилхолинэстеразы путем карбодиимидного связывания на окисленных наноуглеродных материалах (нанотрубки, сажа) и поликарбоксилированных макроциклических рецепторах на тиакаликсареновой платформе, позволивший сократить количество иммобилизованного фермента, упростить процедуру изготовления биосенсора и контролировать в широких пределах сигнал биосенсора в отношении ацетилтиoxолина и чувствительность определения фосфорорганических ингибиторов фермента (параоксон и малаоксон).
4. Использование поликарбоксилированных тиакаликс[4]аренов в конфигурации *конус*, по сравнению с конфигурациями *частичный конус* и *1,3-альтернат*, снижает количество иммобилизованного фермента при сохранении сигнала биосенсора и уменьшает чувствительность определения ацетилтиoxолина.
5. С помощью разработанных биосенсоров проведена количественная характеристика ингибирования иммобилизованной ацетилхолинэстеразы параоксоном и малаоксоном и установлен характер влияния наноразмерных модификаторов на бимолекулярную константу ингибирования, предел и чувствительность определения ингибиторов. Наименьшими пределами обнаружения параоксона обладают биосенсоры, модифицированные углеродной сажей и тиакаликс[4]ареном **1б**, несущим 8 карбоксильных групп, в конфигурации *частичный конус*. При обнаружении малаоксона наименьшими пределами обладают сенсоры, модифицированные тетракарбоксилированным тиакаликс[4]ареном **2б** (*частичный конус*) и макроциклом **1в** с 8 карбоксильными группами (*конус*).

6. Электрохимическое окисление малатиона в электролизе в присутствии хлорида натрия позволяет проводить определение до 2 мкг/л малатиона в бутилированной и водопроводной воде и до 5 мкг/л – в свежесобранном виноградном и апельсиновом соках при использовании в качестве модификаторов фталоцианина кобальта и тиакаликс[4]аренами **1б**, **1в** и **2б**.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ivanov, A.N. Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes - Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection [Text] / A.N. Ivanov, R.R.Younusov, G.A.Evtugyn, F.Arduini, D.Moscone, G.Palleschi // *Talanta* - 2011.- V.85.- P.216-221.
2. Evtugyn, G.A. Cholinesterase biosensors based on screen-printed electrodes modified with Co-phthalocyanine and polycarboxylated thiacalixarenes [Text] / G.A. Evtugyn, R.R.Younusov, A.N.Ivanov, R.R.Sitdikov, A.V.Galuchin, H.C.Budnikov, I.I.Stoikov, I.S.Antipin // *Electroanalysis* - 2012.- V.24, №3.- P.554-562.
3. Evtugyn, G. Nanomaterials in the cholinesterase biosensors for inhibitor determination / G.Evtugyn, R.Younusov, A.Ivanov // In: *Portable Chemical Sensors: Weapons against Terrorism* (D.P.Nikolelis Ed.). NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Springer Science + Business Media B.V., 2012.- P.227-244.
4. Evtugyn, G.A. Electrochemical biosensors for nerve agent detection based on nanostructured biorecognition layers [Text] / G.A.Evtugyn, A.N.Ivanov, R.R.Younusov // NATO ARW Symposium «Portable chemical sensors for the rapid detection of chemical and biological agents and other weapons of terrorism». Lund - Snogeholm Slots. 2011.- P.22-23.
5. Иванов, А.Н. Холинэстеразные биосенсоры на основе углеродных нанотрубок и углеродной сажи [Текст] / Иванов А. Н., Юнусов Р. Р., Будников Г. К., Евтюгин Г. А. // VIII Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012»: Материалы конф. Уфа-Абзаково, 3-9 июня 2012 г. / Отв. ред. В.Н. Майстренко.- Уфа: РИЦ БашГУ, 2012. - с.95.
6. Юнусов, Р.Р. Ацетилхолинэстеразный биосенсор на основе нанокompозитов одностенных углеродных нанотрубок и фталоцианина кобальта [Текст] / Р.Р.Юнусов, А.Н.Иванов // X Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии 21 века». Казань,- 2011.- С.117.