

УДК 577.15; 573.6

С. В. Дзядевич<sup>1</sup>, В. М. Архипова<sup>1</sup>, К. Мартле<sup>2</sup>, Н. Жаффрезик-Рено<sup>2</sup>,  
О. П. Солдаткін<sup>1</sup>, Г. В. Єльська<sup>1</sup>

## ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ БІОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ХОЛІНЕСТЕРАЗ ДЛЯ ЕКОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ

<sup>1</sup>*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України*

<sup>2</sup>*Еколь Централь, м. Ліон, Франція*

Описано досягнення авторів з розробки електрохімічних біосенсорів на основі іммобілізованих холінестераз для екологічного моніторингу. З використанням ефектів зворотнього та незворотнього інгібування ферментів розроблені біосенсори для визначення концентрацій різних токсичних компонент (фосфорорганічні та карбаматні пестициди, гіпохлорит, глікоалкалоїди). Вивчені основні аналітичні характеристики розроблених біосенсорів у різних умовах роботи, запропоновані оптимальні експериментальні протоколи визначення токсичних компонент. Біосенсори демонстрували високу відтворюваність та добру операційну стабільність, а також стабільність при зберіганні.

*Ключові слова: електрохімічні біосенсори, холінестерази, токсичні компоненти, інгібування ферменту.*

S. V. Dzyadevych<sup>1</sup>, V. N. Arkhypova<sup>1</sup>, C. Martelet<sup>2</sup>, N. Jaffrezic-Renault<sup>2</sup>,  
A. P. Soldatkin<sup>1</sup>, A. V. El'skaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine*

<sup>2</sup>*Ecole Centrale de Lyon, France*

## ELECTROCHEMICALS BIOSENSORS BASED ON IMMOBILISED CHOLINESTERASES FOR ECOLOGICAL MONITORING

This paper describes authors' achievements in the development of electrochemical biosensors based on immobilised cholinesterase for ecological monitoring. Various biosensors for determination of concentrations of different toxic substances (organophosphorous and carbamate pesticides, hypochlorite, glycoalkaloids) were designed on the basis of reversible and/or irreversible enzyme inhibition effects. The main analytical characteristics of the biosensors' development have been studied under different conditions and optimal experimental protocols for toxic substances determination have been proposed. Most of these biosensors show a high reproducibility and a good operational and storage stability.

*Keywords: electrochemical biosensors, cholinesterases, toxic substances, enzyme inhibition.*

Постійно зростаюча необхідність охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, перевірки якості харчових продуктів і питної води, збільшення кількості клінічних діагностичних тестів у медицині та ветеринарії потребує все більш широкого використання в практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Це відповідно диктує необхідність у наукових дослідженнях та розробці кардинально нових методів аналізу, зокрема створення біо- та хемосенсорних систем для якісного та кількісного визначення широкого спектру різноманітних сполук.

Аналітичні системи нового покоління – біосенсори – у найбільш загальному вигляді являють собою пристрої, що складаються із чутливого шару біоматеріалу (іммобілізованих ферментів, рецепторів, антитіл, клітин мікроорганізмів та ін.) та фізичного перетворювача (електрохімічного, оптичного, акустичного або калориметричного), який генерує електричний або оптичний сигнал у відповідь на зміну фізико-хімічних властивостей біоматриці пропорційно до концентрації аналізованої сполуки.

Холінестераза – один з багатьох ферментів, що відповідають за правильне функціонування нервової системи людей, інших хребетних та комах. Якщо кількість цього ферменту

знижується до критичного рівня, нервові імпульси, що йдуть до м'язів, не можуть довго часно контролюватися, що може призвести до серйозних наслідків і навіть смерті (Molecular and cellular ..., 1993). Деякі хімічні класи токсинів, такі як пестициди, глікоалкалоїди та інші, проявляють себе як інгібітори холінестераз, тим самим зменшуючи кількість активних холінестераз, необхідних для правильного функціонування людського організму.

Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей антихолінестеразних компонентів у довкіллі. Було розроблено певну кількість різних біосенсорів на основі холінестераз, які використовували різні джерела ферментів та різні методи іммобілізації та детекції. Схема визначення включала амперометричні (Składal, Mascini, 1992; Amperometric ..., 1995; Comparative investigation ..., 2000), потенціометричні (Development of sensors ..., 1999; Rapid detection ..., 2000; Comparison of ..., 1996), кондуктометричні (Conductometric biosensor ..., 1994; Кондуктометрический ..., 1994a), оптичні (Fiber optic ..., 2000; Pogačnik, Franko, 2003), флюорометричні (Díaz, Ramos Peinado, 1997) та п'єзоелектричні (New principle of ..., 2003) системи перетворення сигналу.

У нашій роботі використовували ацетилхолінестеразу (АХЕ) з електричного вугря з активністю 292 од. акт./мг; бутирилхолінестеразу (БуХЕ) з сироватки крові коня з активністю 13 од. акт./мг; альбумін сироватки бика, ацетилхолінхлорид (АцХ), бутирилхолін хлорид (БуХ) та глутаровий альдегід виробництва фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Німеччина).

Як токсичні речовини для інактивації ферментів використовувалися: фосфорорганічні пестициди: трихлорфон [(dimethyl-2,2,2-trichlor-1-hydroxyethyl)-phosphonate], діізпропилфторфосфат, параоксон-етил [diethyl-p-nitrophenyl phosphate], параоксон-метил [O,O-dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphate], паратіон-метил [(O,O-dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphorothiate] фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія); карбаматний пестицид карбофуран [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N-methylcarbamate] фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія), глікоалкалоїди  $\alpha$ -чаконін (95 % чистоти),  $\alpha$ -соланін (95 % чистоти) з паростків картоплі, томатін (Lycopersicin) (98 % чистоти), деміссідін (соланін D), езерін (Physostigmine) та аглікони соланідін (98 % чистоти) з паростків картоплі, томатідін (3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -tomatidane), соласодін (Solasod-5-en-3 $\beta$ -ol) (99 % чистоти) фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Німеччина).

Як буферний розчин використовували калій-фосфатний розчин ( $KH_2PO_4$ – $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ ) вітчизняного виробництва. Усі інші реактиви – вітчизняного та імпортного виробництва з кваліфікацію «ос. ч.» або «х. ч.».

У роботі використано кондуктометричні перетворювачі виробництва Київського радіозаводу і pH-чутливі польові транзистори виробництва Київського заводу «Мікроприлад».

Планарні кондуктометричні електроди, що складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлялися вакуумним запиленням на керамічну основу (спечений алюмінієвий оксид товщиною 0,5 мм, розміри 5  $\times$  40 мм) (Тонкопленочный ..., 1994 б) (рис. 1, а). Чутлива поверхня кожної електродної пари була приблизно 1  $\times$  1,5 мм.

Потенціометричний сенсорний чип на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) містить два ідентичні  $Si_3N_4$ -ІСПТ, конструкція і робота яких описані раніше (Operational of ..., 1996) (рис. 1, б). ІСПТ працюють на постійному струмі в режимі напруги «стік – витік» ( $I_s = 200$  мкА,  $V_{ds} = 1$  В). Незапилену підкладку сенсорного чипу використовували як квазі-референтний електрод.

Біологічно активні мембрани формували зшиванням ферменту з БСА на поверхні перетворювача в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду (Кондуктометричний ..., 1995). Суміш 5 % (w/v) ферменту, 5% (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину в 20 мМ фосфатному буфері (pH 7,4) наносили краплями на чутливу поверхню одного з перетворювачів, а суміш 10 % (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину в 20 мМ фосфатному буфері (pH 7,4) – на референтний перетворювач. Потім сенсорний чип поміщали в атмосферу насичених парів глутарового альдегіду і після витримки впродовж 30 хв мембрани висували 15 хв. у повітрі за кімнатної температури.

Усі виміри проводили при денному світлі за кімнатної температури у відкритій комірці, заповненій 5 мМ розчином фосфатного буфера, pH 7,4, що активно перемішувався.

Потрібні концентрації субстрату отримували додаванням визначеної кількості вихідного розчину відповідної концентрації. Розчини токсичних субстратів готували в дистильованій воді і використовували для інгібування ферменту в спеціальній комірці.

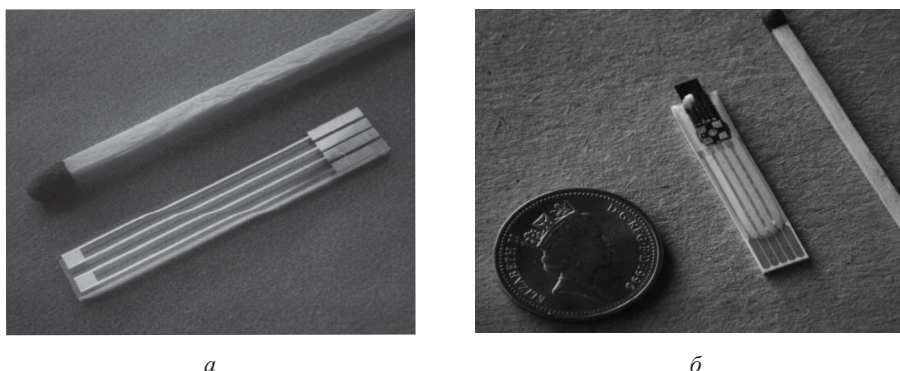


Рис. 1. Загальний вигляд кондуктометричного (а) і потенціометричного (б) перетворювачів

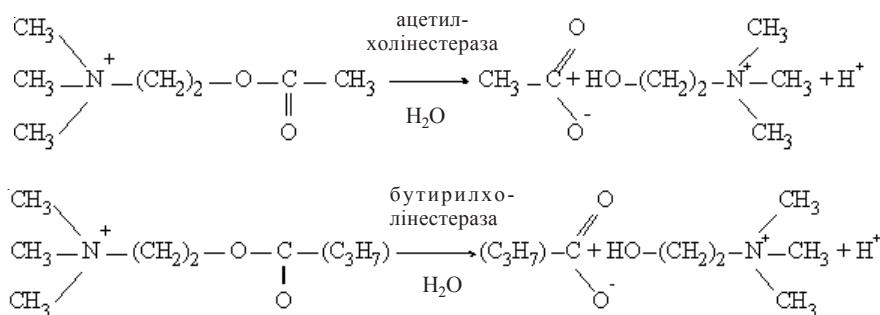
Диференціальний вихідний сигнал між вимірювальним і референтним сенсорами реєструвався за допомогою виготовлених нами кондуктометричного (Пацковский, Волотовский, 1996) та потенціометричного (Волотовский, Пацковский, 1996) приладів.

Рівень інгібування ферментів незворотними токсичними речовинами, а отже – і концентрація останніх оцінювалася біосенсорами за такою процедурою:

- сенсор уміщували в буферний розчин і реєстрували вихідний сигнал (базова лінія «0»);
- субстрат або еквімолярна суміш субстратів (2 мМ концентрація кожного компонента) додавали до вимірювальної комірки і реєстрували стаціонарний вихідний сигнал, який приймався за 100 %;
- після 2–3-кратного відмивання буферним розчином сенсор розміщували в спеціальній комірці з розчином зразка токсину на 20 хв. (час інгібування), а потім знову відмивали буферним розчином, щоб видалити рештки незв'язаного інгібітора;
- сенсор занурювали в розчин субстрату тієї ж концентрації і реєстрували відгук сенсора.

Концентрацію токсичного субстрату оцінювали, порівнюючи стаціонарні сигнали до і після інкубації у розчині зразка токсину.

В основі роботи біосенсорів на основі холінестераз лежать наступні ферментативні реакції:



У ході цих двох реакцій генеруються протони, що призводить до зміни *pH* чи провідності всередині мембрани, тому ми можемо використовувати кондуктометричні датчики для визначення зміни провідності або потенціометричні біосенсори на основі *pH*-чутливих польових транзисторів. Стосовно амперометричних біосенсорів, то в ході

реакції не продукується електроактивних компонентів, і тому ми не можемо використувати амперометричні перетворювачі. Для цього необхідно використовувати іншу ферментативну реакцію (Skłádal, Mascini, 1992; Amperometric ..., 1995; Comparative investigation ..., 2000; Development of sensors ..., 1999).

Обидва ферменти відповідають за гідроліз як ацетилхолін хлориду, так і бутирилхолін хлориду, але з різним ступенем і показують різну афінність до ряду інгібіторів.

На рис. 2 представлено калібрувальні криві для АцХ та БуХ та їх суміші для біосенсора на основі АХЕ та БуХЕ.

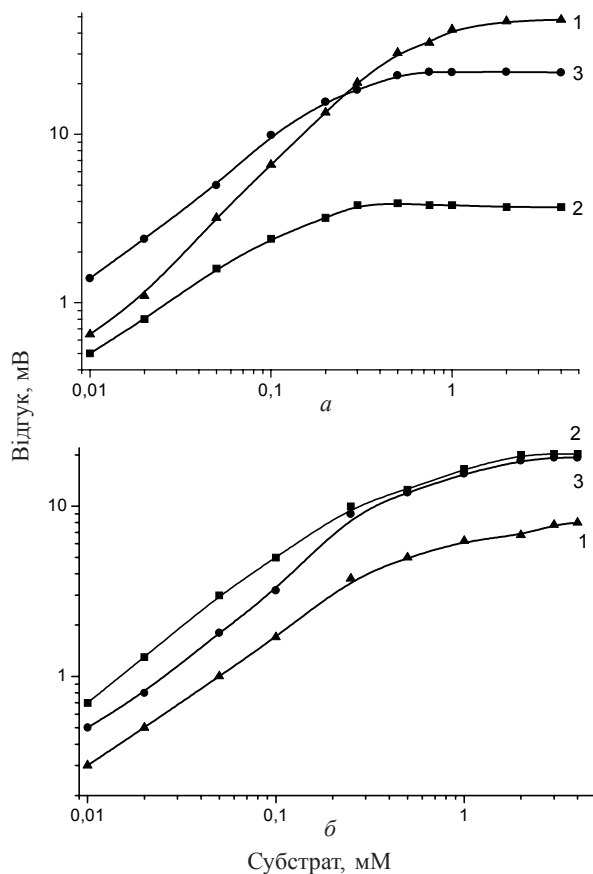


Рис. 2. Залежність відгуку потенціометричного біосенсора на основі АХЕ (а) та БуХЕ (б) від концентрацій АцХ (1), БуХ (2) та їх еквімолярної суміші (3). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері,  $pH$  7,4

З рисунку видно, що ні АХЕ, ні БуХЕ біосенсори не є повністю специфічні до своїх основних субстратів. АХЕ каталізує не тільки гідроліз АцХ (це значення взято за 100%), але й деяку кількість БуХ (майже 15%), але зі значно нижчою швидкістю. Це може пояснити той факт, що при додаванні еквімолярної суміші субстратів (більш за 0,3 мМ) ми спостерігаємо конкуренцію між АцХ та БуХ за зв'язування з активним центром ферменту. Оскільки БуХ займає деяку частину активних центрів АцХЕ, швидкість гідролізу зменшується, і відгук сенсора на суміш субстратів теж зменшується. Але біосенсор демонструє збільшення відгуку для малих концентрацій еквімолярної суміші субстратів (до 0,3 мМ).

БуХЕ каталізує гідроліз як БуХ (ця величина взята за 100%), так і АцХ (близько 35%). Якщо використовується суміш субстратів, то спостерігається гідроліз обох субстратів, і відгук сенсора зменшується у порівнянні з основним субстратом. Але у порівнянні з АХЕ відгук сенсора зменшується зовсім незначно, тому що кінетика гідролізу обох субстратів не дуже відрізняється.

Таким чином, використовуючи холінестеразні біосенсори, ми можемо визначати концентрацію їх субстратів, а саме ацетилхолін хлориду та бутирилхолінхлориду.

Залежності рівня інгібування іммобілізованих БуХЕ та АХЕ від концентрацій  $\alpha$ -чаконіну та параоксон-метилу представлені на рис. 3. Як видно з рис. 3, біосенсор на основі БуХЕ значно чутливіший до  $\alpha$ -чаконіну, ніж біосенсор на основі АХЕ. Для інших типів стероїдних алкалоїдів, таких як  $\alpha$ -соланін, соланідін та томатін, були отримані подібні результати при використанні потенціометричних біосенсорів (Development and optimisation ..., 2003). У протилежність цьому потенціометричний біосенсор на основі АХЕ більш чутливий до фосфорорганічних пестицидів, ніж сенсор на основі БуХЕ. Подібні результати були отримані і для кондуктометричних біосенсорів. Також було показано, що тільки біосенсор на основі АХЕ чутливий до гіпохлориту та біосенсори на основі БуХЕ та АХЕ в різній мірі чутливі до деяких важких металів (*Hg* та *Ag*) (Multibiosensor based on ..., 2001).

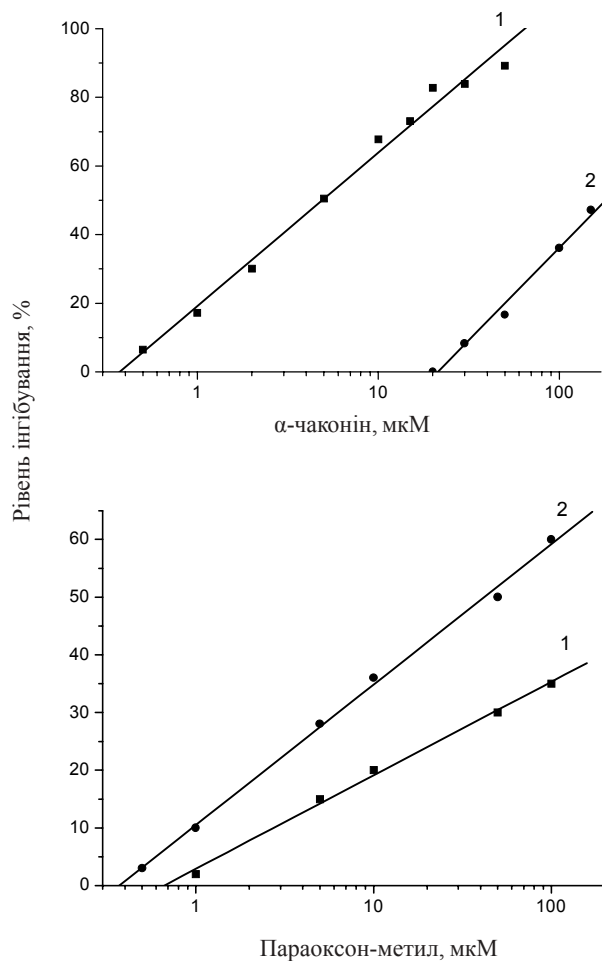
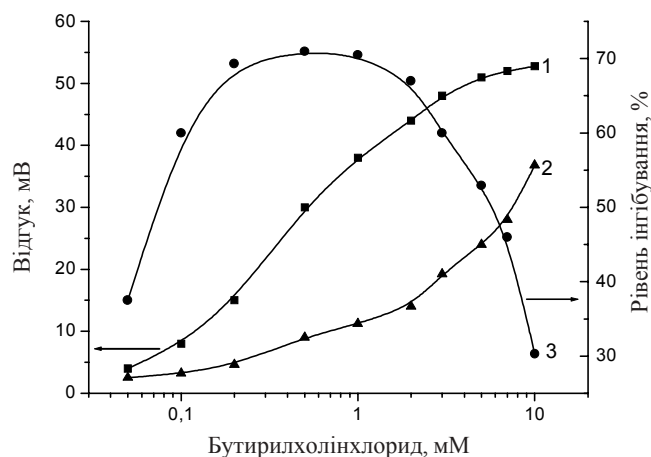


Рис. 3. Залежність рівня інгібування іммобілізованих БуХЕ (1) та АХЕ (2) від концентрацій  $\alpha$ -чаконіну та параоксон-метилу. Відгуки біосенсора на основі ІСПТ на додавання 1 мМ  $\alpha$ -чаконіну та 2 мМ параоксон-метилу. Концентрації субстрату були виміряні в 5 мМ фосфатному буфері, *pH* 7,4

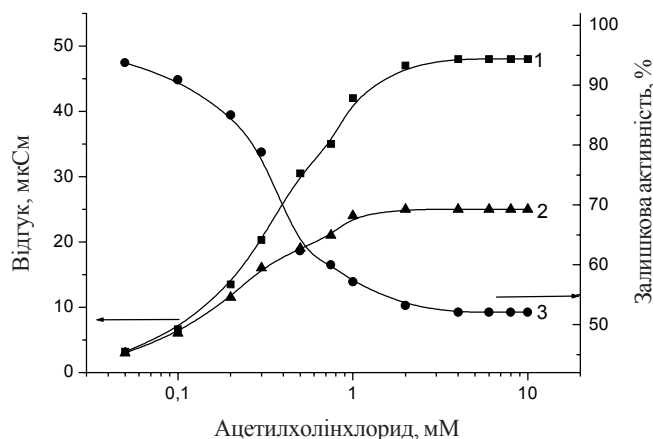
Для того щоб знайти оптимальні умови для визначення інгібіторів, було досліджено відгуки біосенсорів на додавання субстратів без та в присутності різних інгібіторів у виміральному розчині.

На рис. 4, а наведено калібрувальну криву для визначення БуХ разом із залежністю рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ для зворотнього інгібітора  $\alpha$ -чаконіну. Такий рівень

інгібування визначався як відносне зменшення відгуку біосенсора на субстрат у присутності інгібітора. З рисунку добре видно, що найкраща чутливість і точність вимірювань спостерігається для концентрацій БуХ близько 0,5 мМ. Дані, що наведені на рис. 4, б, демонструють залежність відношення відгуку сенсора на додавання АцХ до та після його інкубації в розчині з незворотнім інгібітором параоксон-метилом. Відгук біосенсора після інгібування було використано як маркер залишкової активності іммобілізованого ферменту. З цього рисунка ясно, що краща чутливість вимірювань спостерігалась для концентрацій АцХ більше 2 мМ.



a



б

Рис. 4. Калібрувальні криві потенціометричного БуХЕ (а) та кондуктометричного АХЕ (б) біосенсорів для визначення субстратів до (1) та після (2) інкубації з 20 мкМ  $\alpha$ -чаконіну (а) та 30 мкМ параоксон-метилу (б). Залежність рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ (а, 3) та залишкової активності іммобілізованої АХЕ (б, 3) від концентрації субстратів. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5 з часом інгібування 20 хв. для параоксон-метилу

Для низьких концентрацій субстрату інгібіторний ефект проявляється менше, тому що фермент у мембрані знаходиться в надлишку і тільки частина його відповідає за перетворення субстрату (тобто залишок ферменту не бере участі у ферментативній реакції). У цьому випадку молекули ферменту, що зв'язуються з інгібітором, можуть компенсуватися тими вільними молекулами ферменту, що до цього моменту не брали участі у



ферментативній реакції. У результаті експериментально отримане зменшення відгуку біосенсора буде меншим за реальне зменшення активності ферменту за рахунок інгібіторного ефекту. Такий ефект є типовим для всіх іммобілізованих ферментів незалежно від їх механізму інгібування чи методу визначення активності ферменту (Dzyadevych et al., 2002a).

Для високих концентрацій субстрату ситуація дещо інша і залежить від типу інгібування. У випадку зворотніх інгібіторів, таких як глікоалкалоїди, і субстрат і інгібітор взаємодіють з іммобілізованим ферментом одночасно і конкурують за його центри зв'язування. У цьому випадку при збільшенні концентрації субстрату чутливість по відношенню до інгібітора падає. Така ситуація притаманна тільки зворотному механізму інгібування. Тому БуХ у концентрації 0,5 мМ було вибрано для подальших вимірювань з визначення концентрацій глікоалкалоїдів (Development and optimisation ..., 2003). Також було продемонстровано відсутність впливу на рівень інгібування часу інкубації сенсора з глікоалкалоїдами (Enzyme biosensor ..., 2004 a).

У випадку незворотного механізму інгібування для високих концентрацій субстрату (частина насичення калібрувальної кривої) всі молекули ферменту беруть участь у ферментативній реакції. Оскільки частина молекул ферменту зв'язується з інгібітором, відгук біосенсора тут же зменшується. Така ситуація притаманна незворотному механізму інгібування. АцХ у концентрації 2 мМ було використано для подальших експериментів. Залежність відгуку біосенсора від різного часу інкубації в розчині пестицидів була досліджена Dzyadevych et al. (2002 a, b). Було показано, що рівень інгібування нелінійно залежить від часу інкубації, 20 хв. інкубації було вибрано для подальших експериментів.

Добре відомо, що концентрація буферу може впливати на відгук сенсора. На рис. 5 показано калібрувальні криві АХЕ біосенсора на основі ІСПТ, що отримані у фосфатному буфері з різними буферними ємностями. З рисунку видно, що діапазони роботи сенсора були різними і залежали від концентрації буферу. Також результати, представлені на рис. 5 і 6, демонструють сильну залежність відгуку потенціометричного біосенсора від концентрації буферу. При збільшенні концентрації буферного розчину від 1 мМ до 20 мМ

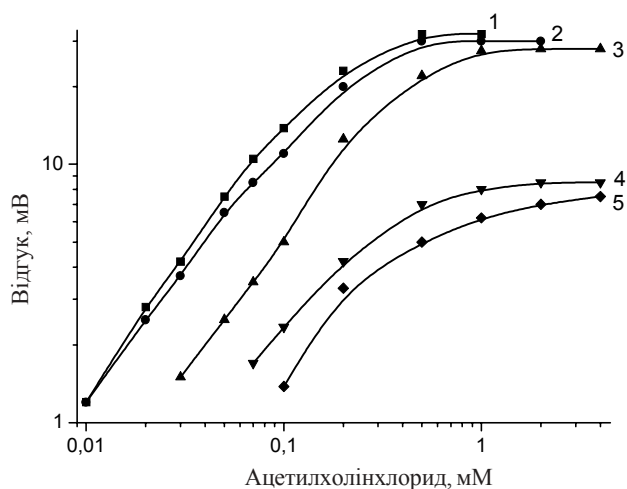


Рис. 5. Калібрувальні криві потенціометричного біосенсора на основі АХЕ для різних концентрацій фосфатного буферу, pH 7,5 (1 – 1 мМ, 2 – 2 мМ, 3 – 5 мМ, 4 – 10 мМ, 5 – 20 мМ)

вихідний сигнал зменшувався у 8–10 разів. У той же час рівень інгібування не залежав від концентрації буферу, навіть спостерігалось незначне його збільшення (рис. 6). Подібні результати були також отримані і для залежності відгуку сенсора від концентрації NaCl у робочому розчині (Development and optimisation ..., 2003). Тому варіація буферної ємності чи іонної сили не є важливим параметром для визначення інгібіторів.

Активність ферменту також залежить від  $pH$  робочого розчину, тому цей параметр було також досліджено.  $pH$ -залежність іммобілізованої БуХЕ по відношенню до субстрату та інгібітору була досліджена у «полімікс»-буфері. Такий комплексний буфер було вибрано для того, щоб знехтувати будь-яким впливом буферної ємності на величину відгука, тому що «полімікс»-буфер має однакову буферну ємність в діапазоні  $pH$  від 5 до 9.

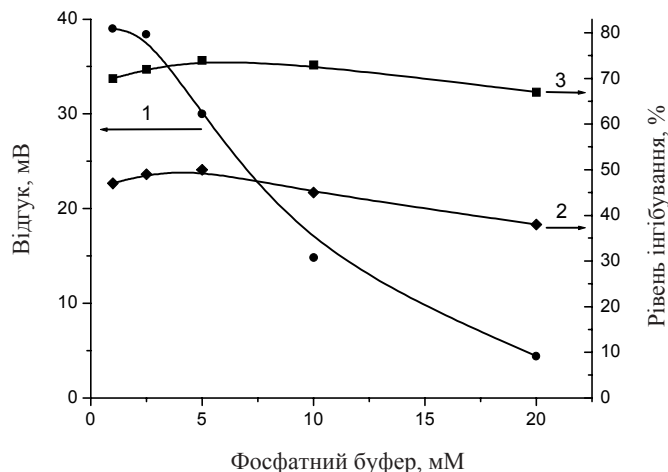


Рис. 6. Залежність відгуку потенціометричного біосенсора на 1 мМ БуХ (1) та рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ для 2 мкМ (2) та 5 мкМ (3)  $\alpha$ -чаконіну від концентрації буферу,  $pH$  7,2

Відгук біосенсора на 1 мМ БуХ був вивчений при різних  $pH$  у присутності та за відсутності  $\alpha$ -чаконіну (рис. 7), відповідно був розрахований рівень інгібування ферменту. Найбільший відгук на додавання субстрату отримано для буферного розчину з  $pH$  7,2, тоді як рівень інгібування не залежав від  $pH$  розчину. Ці дані добре збігаються з результатами,

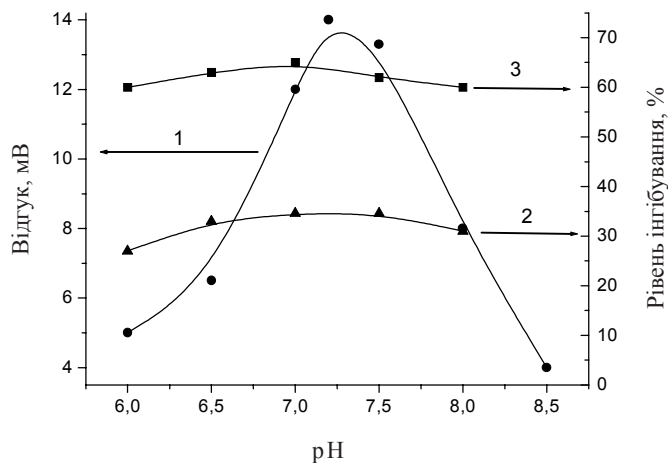


Рис. 7. Залежність відгуку потенціометричного біосенсора на 1 мМ БуХ (1) та рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ для 5 мкМ (2) та 25 мкМ (3)  $\alpha$ -чаконіну від  $pH$ . Вимірювання були проведені в 2,5 мМ «полімікс»-буфері

отриманими іншими авторами для холінестеразної активності по відношенню до субстратів та глікоалкалоїдів (Imato, Ishibashi, 1995; Roddick, 1989), але відрізняються від результатів по високій  $pH$ -залежності пошкодження мембран глікоалкалоїдами (McKee, 1959; Roddick, Rijnenberg, 1986).



Інгібування холінестераз фосфорорганічними та карбаматними пестицидами базується на різних механізмах (Simonian, 2001). Карбаматні пестициди – це зворотні інгібітори АХЕ, вони конкурують з субстратом за сайти зв'язування ферменту через карбомілацію АХЕ. У протилежність цьому фосфорорганічні пестициди – це незворотні інгібітори, вони блокують серини в активних центрах ферменту через фосфорилування. Інгібування АХЕ гіпохлоритом також незворотне, але механізм такого інгібування не зовсім ясний (New enzyme ..., 1997). Інгібування БуХЕ глікоалкалоїдами є зворотним (Development of potentiometric ..., 2002).

Калібрувальні криві кондуктометричного АХЕ біосенсора для різних пестицидів представлені на рис. 8. Вони були лінійні в напівлогарифмічному масштабі для всіх пестицидів, що аналізувались. Мінімальна границя визначення –  $5,0 \times 10^{-11}$  М для діізопропилфторфосфату,  $1,0 \times 10^{-8}$  М – для параоксон-етилену,  $5,0 \times 10^{-7}$  М – для параоксон-метилу,  $3,0 \times 10^{-7}$  М – для трихлорфону,  $5,0 \times 10^{-6}$  М – для паратіон-метилу і  $2,0 \times 10^{-6}$  М – для карбофурану.

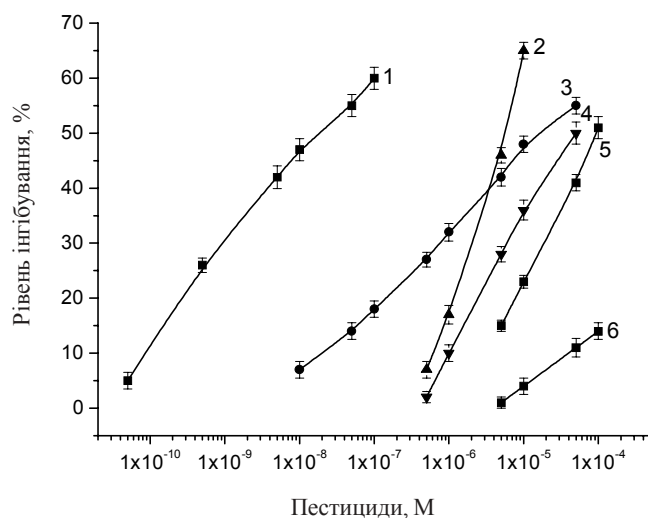


Рис. 8. Калібрувальні криві кондуктометричного АХЕ біосенсора для визначення діізопропилфторфосфату (1), трихлорфону (2), параоксон-етилену (3), параоксон-метилу (4), карбофурану (5) та паратіон-метилу (6). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, час інкубації 20 хв., концентрація АцХ 2 мМ

Таким чином, при використанні обох ферментів максимальна чутливість біосенсора була отримана для діізопропилфторфосфату, тоді як мінімальна – для паратіон-метилу (таблиця).

Таблиця

Динамічний діапазон роботи розроблених біосенсорів для визначення пестицидів, час преінкубації – 20 хв.

Пестицид	Динамічний діапазон, М			
	Кондуктометричний біосенсор		Потенціометричний біосенсор	
	АХЕ мембрана	БуХЕ мембрана	АХЕ мембрана	БуХЕ мембрана
Діізопропилфторфосфат	$5,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-11} - 5,0 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-11} - 5,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-7}$
Параоксон-етил	$1,0 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$
Параоксон-метил	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$
Трихлорфон	$3,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5}$
Паратіон-метил	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$
Карбофуран	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$

Аналітичні характеристики біосенсорів на основі двох різних перетворювачів були дуже близькі як з точки зору мінімальної границі визначення, так і динамічного діапазону роботи. Досліджені пестициди можна розмістити по силі їх інгібування у наступний ряд:

діізопропилфторфосфат > параоксон-етил > трихлорфон >  
параоксон-метил > карбофуран > паратіон-метил.

Залежність рівня інгібування АХЕ біосенсора на основі ІСПТ від концентрацій гіпохлориту представлена на рис. 9. Мінімальна границя визначення –  $5,0 \times 10^{-6}$  М гіпохлориту. Ці дані добре збігаються з результатами, отриманими для інактивації *E. coli* гіпохлоритом (Albrich, Hurst, 1982). Але при необхідності границя визначення може бути зменшена за рахунок збільшення часу інкубації сенсора в розчині гіпохлориту.

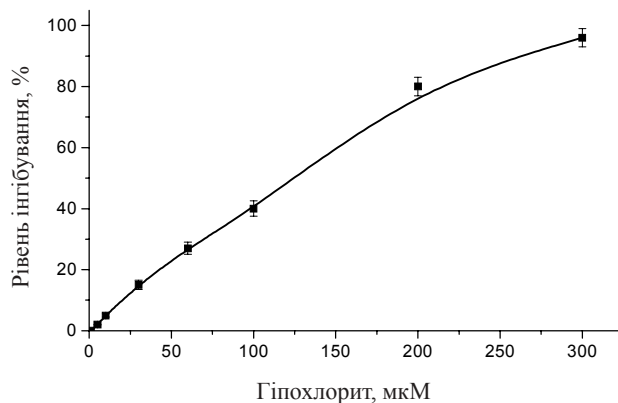


Рис. 9. Калібрувальна крива АХЕ біосенсора на основі ІСПТ для визначення гіпохлориту. Вимірювання були проведені в 10 мМ фосфатному буфері,  $pH$  7,2; час інкубації 20 хв., концентрація АцХ 0,25 мМ

На рис. 10 представлені калібрувальні криві для визначення різних глікоалкалоїдів та агліконів. Як можна бачити з рисунка, іммобілізована БуХЕ інгібується всіма цими компонентами в різній мірі, але в діапазоні концентрацій від 1 мкМ та 100 мкМ. Стосовно саме глікоалкалоїдів, то мінімальна границя їх визначення залежала від їх типу та склала 0,2 мкМ – для  $\alpha$ -чаконіну, 0,5 мкМ – для  $\alpha$ -соланіну та 0,5 мкМ – для томатіну. Ця границя визначалась найменшою концентрацією, що може бути досягнута з заданим ступенем імовірності. Динамічні діапазони визначення глікоалкалоїдів дозволяли вести мову про можливість їх кількісного визначення в картоплі та помідорах.

Відтворюваність біосенсорів, операційна стабільність та стабільність при зберіганні всебічно досліджені. Комбіновані результати такого дослідження представлені на рис. 11. При цьому відтворюваність та операційна стабільність аналізувались протягом дня, потім біосенсор зберігався в робочому буферному розчині при кімнатній температурі протягом ночі чи кількох днів і потім знову аналізувалась його відтворюваність та операційна стабільність. Така процедура повторювалась декілька разів. Відгуки біосенсора були добре відтворювані, відносно стандартне відхилення дорівнювало майже 3 %. Тест операційної стабільності показав, що біосенсор був стабільним протягом дня з відносним зменшенням сигналу близько 1 % на день. При зберіганні сенсора в 5 мМ фосфатному буфері,  $pH$  7,5 при температурі 4° С біосенсор залишався стабільним більш ніж 5 місяців.

Таким чином, у наших роботах вперше продемонстрована можливість застосування кондуктометричного і потенціометричного перетворювачів для створення біосенсорів на основі ацетилхоліністерази і бутирилхоліністерази. З використанням розроблених холіністеразних біосенсорів можна визначати концентрацію їх субстратів, а саме ацетилхолінхлориду та бутирилхолінхлориду. Крім того, з їх допомогою можна визначати різні токсичні компоненти, використовуючи інгібіторний аналіз. Розробка амперо-

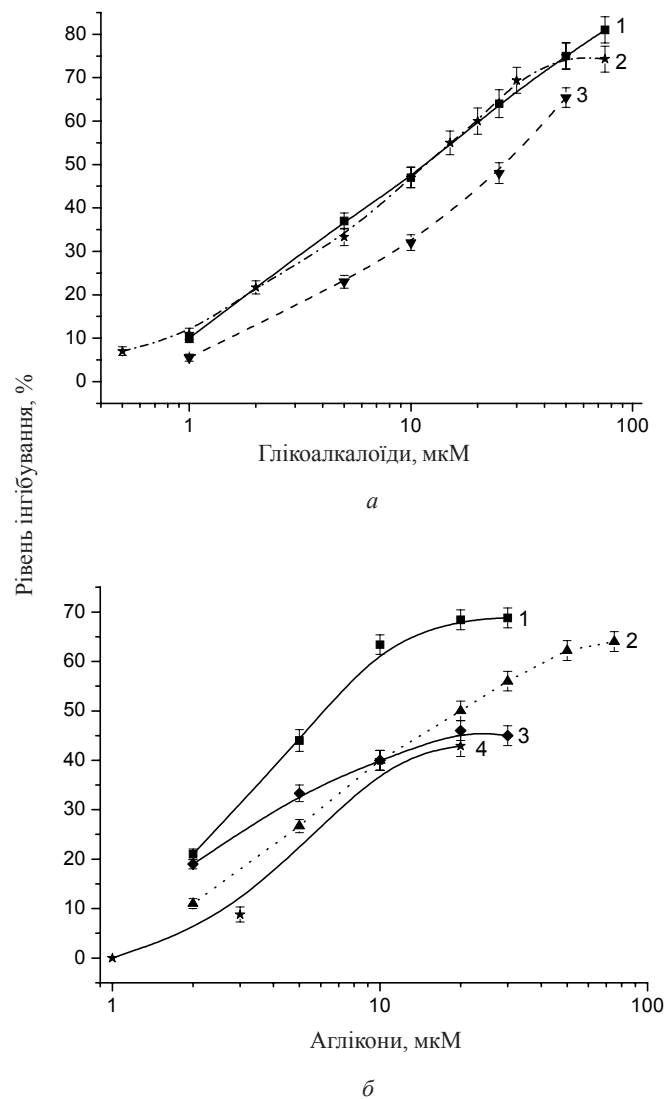


Рис. 10. Калібрувальні криві БУХЕ біосенсора на основі ІСПТ для визначення (а) різних глікоалкалоїдів ( $\alpha$ -чаконіну (1), томатіну (2) та  $\alpha$ -соланіну (3)) та (б) різних агліконів (деміссідін (1), соланідін (2), томатідін (3) та соласодін (4)). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, концентрація БУХ – 0,5 мМ

метричного біосенсора неможлива, тому що в процесі цієї ферментативної реакції не утворюється електроактивних частинок, які можна було б зафіксувати амперметричним перетворювачем.

Була проведена оптимізація роботи кондуктометричного і потенціометричного біосенсорів для визначення антихолінестеразних компонент на основі зворотного і незворотного механізмів інгібування. Обидва типи розроблених біосенсорів демонстрували високі аналітичні характеристики, що дозволяє зробити висновок про реальність їх практичного застосування для визначення фосфорорганічних і карбаматних пестицидів, гіпохлориту та глікоалкалоїдів.

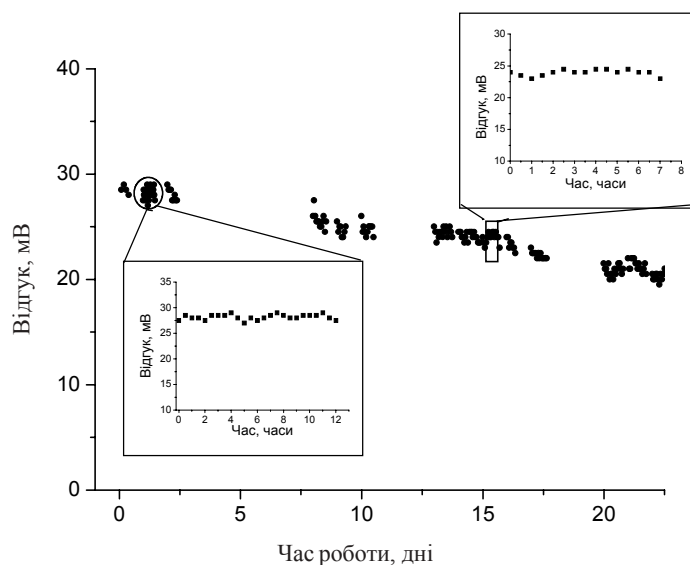


Рис. 11. Відтворюваність, операційна стабільність та стабільність при зберіганні БУХЕ біосенсора на основі ІСПТ. Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері,  $pH$  7,2, концентрація БУХ – 1 мМ

\* \* \*

Частина цієї роботи була виконана за фінансової підтримки фонду НАТО (Collaborative Linkage Grant № 979775) та комплексної програми Національної академії наук України «Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій».

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Волотовский В. В., Пацковский С. В. Прибор для измерения затворного потенциала ионоселективных полевых транзисторов // Физика и техника полупроводников. – 1996. – № 3. – С. 168.
- Кондуктометрический биосенсор для определения фосфорорганических пестицидов / С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин, А. А. Шульга и др. // Журн. аналит. химии. – 1994а. – Т. 49. – С. 874-878.
- Кондуктометричний ферментний глюкосенсор. Пошук шляхів поліпшення аналітичних характеристик / С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін, В. М. Архипова и др. // Укр. біохім. журн. – 1995. – Т. 67, № 6. – С. 53-59.
- Пацковский С. В., Волотовский В. В. Прибор для кондуктометрических измерений тонкопленочных планарных электродов // Физика и техника полупроводников. – 1996. – № 4. – С. 168.
- Тонкопленочный кондуктометрический датчик для ферментных биосенсоров / С. В. Дзядевич, А. А. Шульга, С. В. Пацковский и др. // Электрохимия. – 1994б. – Т. 30. – С. 982-987.
- Albrich J. M., Hurst J. K. Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid: Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites // FEBS Lett. – 1982. – 144. – P. 157-161.
- Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides / La Rosa C., Pariente F., Hernández L., Lorenzo E. // Anal. Chim. Acta. – 1995. – 308. – P. 129-136.
- Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination / A. N. Ivanov, G. A. Evtugyn, R. E. Gyurcsányi et al. // Anal. Chim. Acta. – 2000. – 404. – P. 55-65.
- Comparison of two transduction modes for design of microbiosensors applicable to detection of pesticides / N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet et al. // Sensors Materials. – 1996. – 8 (6). – P. 161-167.
- Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides / S. V. Dzyadevich, A. A. Shul'ga, A. P. Soldatkin et al. // Electroanalysis. – 1994. – 6. – P. 752-758.
- Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of *solanaceous* glycoalkaloids / V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevich, A. P. Soldatkin et al. // Biosensors Bioelectron. – 2003. – 18. – P. 1047-1053.

Development of potentiometric biosensors for detection of glycoalkaloids in potatoes and their application for studying the enzyme inhibition mechanisms / V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, E. A. Nazarenko et al. // Book of the 16th European Conference on Solid-State Transducers, Prague: «Czech Technical University». – 2002. – P. 1155-1158.

Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports / A. K. Singh, A. W. Flounders, J. V. Volponi et al. // Biosens. Bioelectron. – 1999. – 14. – P. 703-713.

Dzyadevych S. V., Chovelon J.-M. A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique // Materials Science and Engineering C. – 2002b. – 21. – P. 55-60.

Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Chovelon J.-M. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors // Anal. Chim. Acta. – 2002a. – 459. – P. 33-41.

Díaz A. N., Ramos Peinado M. C. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorous pesticide fluorimetric analysis // Sens. Actuators B. – 1997. – 39. – P. 426-431.

Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes / S. V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin et al. // Analytical Letters. – 2004a. – Vol. 37, № 8. – P. 1611-1623.

Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red / M. Xavier, B. Vallejo, M. Marazuela et al. // Biosens. Bioelectron. – 2000. – 14. – P. 895-905.

Imato T., Ishibash N. Potentiometric butyrylcholine sensor for organophosphate pesticides // Biosensors Bioelectron. – 1995. – 10. – P. 435-441.

McKee R. Factors affecting the toxicity of solanine and related alkaloids to *Fusarium caeruleum* // J. Gen. Microbiol. – 1959. – 20. – P. 686-696.

Molecular and cellular biology of cholinesterases / J. Massoulié, L. Pezzementi, S. Bon et al. // Prog. Neurobiol. – 1993. – 41. – P. 31-91.

Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances / V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin et al. // Talanta. – 2001. – 55. – P. 919-927.

New enzyme potentiometric sensor for hypochlorite species detection / A. P. Soldatkin, D. V. Gorchkov, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault // Sens. Actuators B. – 1997. – 43. – P. 99-104.

New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezoelectric biosensor / A. Makower, J. Halánek, P. Skládal et al. // Biosens. Bioelectron. – 2003. – 18. – P. 1329-1337.

Operational of an ISFET with non-insulated substrate directly exposed to the solution / A. A. Shul'ga, L. I. Netchiporuk, A. K. Sandrovsky et al. // Sensors and Actuators B. – 1996. – 30. – P. 101-105.

Pogačnik L., Franko M. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor // Biosens. Bioelectron. – 2003. – 18. – P. 1-9.

Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor / W. E. Lee, H. G. Thompson, J. G. Hall, D. E. Bader // Biosens. Bioelectron. – 2000. – 14. – P. 795-804.

Roddick J. G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones // Phytochemistry. – 1989. – 28. – P. 2631-2634.

Roddick J. G., Rijnbergen A. L. Effect of steroidal glycoalkaloids of potato on the permeability of liposome membranes // Physiol. Plantarum. – 1986. – 68. – P. 436-440.

Simonian A. L., Efremenko E. N., Wild J. R. Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples // Anal. Chim. Acta. – 2001. – 444. – P. 179-186.

Skládal P., Mascini M. Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phtalocyanine-modified electrodes and immobilized cholinesterases // Biosensors Bioelectron. – 1992. – 7. – P. 335-344.

*Надійшла до редколегії 28.03.04*