

На правах рукописи

ГОГОЛЬ Элина Владимировна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ
ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДИСТЫХ
МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ
ПЕСТИЦИДОВ**

03.00.16 - Экология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

К А З А Н Ь - 2000

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии экологического факультета Казанского государственного университета.

Научный руководитель:	доктор химических наук, профессор Евтюгин Г.А. доктор агрохимии, профессор Марти Ж.-Л.
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, профессор Фридланд С.В. доктор химических наук, профессор Евгеньев М.И.
Ведущая организация:	Институт проблем прикладной экологии и при- родопользования, г.Уфа

Защита состоится " __ " _____ 2000 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета К 053.29.24 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГУ.

Автореферат разослан " __ " _____ 2000 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета К 053.29.24,

доктор химических наук

Евтюгин Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Растущий поток загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, предъявляет все более жесткие требования к эколого-аналитическому контролю их остаточных количеств. Это связано как с постоянным расширением числа токсикантов, так и с углублением представлений о токсическом действии загрязняющих веществ. Как следствие, ужесточаются гигиенические нормативы присутствия экотоксикантов в воде, почве и продуктах питания. Все это приводит к постоянно растущему разрыву между пробоотбором и фактическим получением информации о состоянии окружающей среды. Повышается риск поступления токсических веществ в питьевые воды и продукты питания, осложняется оперативное управление экологической ситуацией в целом.

Решение указанных проблем состоит в развитии методов биохимической диагностики, ориентированных на оценку токсического эффекта наиболее опасных загрязнителей. Перспективным направлением развития таких методов является создание надежных и простых в эксплуатации ферментных сенсоров. Они сочетают преимущества ферментов (высокая чувствительность к экотоксинам) и аппаратных средств контроля (количественная оценка загрязнения и возможность автоматизации).

Холинэстеразы наиболее часто используются в ферментативных методах контроля окружающей среды. Это связано с уникально широким кругом ингибиторов фермента, в числе которых пестициды, поверхностно-активные вещества, соли тяжелых металлов. Однако практическое использование холинэстераз в экологическом мониторинге требует решения проблем стабилизации фермента при хранении, интерпретации отклика и упрощения процедуры измерения. Попытки решить проблемы путем создания одноразовых сенсоров на основе технологий микропечати не продвинулись дальше пилотных образцов, поскольку воспроизводимость отклика биосенсоров в производимой серии и быстрая инактивация холинэстераз в процессе хранения не позволяют получить надежного и воспроизводимого сигнала и присутствия токсикантов в объектах окружающей среды.

Внедрение средств биохимической диагностики в практику экологического мониторинга требует в первую очередь решить вопросы надежности аппаратного оснащения, сопряжения биологического компонента и средства измерения. В этой связи настоящая работа, посвященная развитию теоретических и практических основ конструирования холинэстеразных биосенсоров и их применения для определения пестицидов в объектах окружающей среды, является **актуальной**.

Цель настоящей работы - создание и сравнительная характеристика новых биосенсоров на основе углеродистых и современных модифицирующих материалов для определения остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в объектах окружающей среды.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- исследовать различные углеродистые материалы и способы изготовления сенсоров на их основе с целью снижения рабочего потенциала и повышения воспроизводимости сигнала;
- изучить формирование амперометрического отклика биосенсора, стабильность иммобилизованной холинэстеразы и аналитические характеристики определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов;
- установить механизм влияния модифицирующего слоя нафтона на операционные и аналитические характеристики биосенсоров, определить рабочие условия нанесения модифицирующего покрытия;
- провести сравнительные испытания амперометрических сенсоров для определения фосфорорганических пестицидов в стационарном и проточно-инжекционном режиме;
- изучить влияние органических растворителей и обратимых эффекторов на отклик биосенсоров и его чувствительность к фосфорорганическим пестицидам
- оценить эффективность применения биосенсоров в экспресс-оценке остаточных количеств пестицидов в растительной продукции, в том числе в рамках

межлабораторного эксперимента с участием Центра фитофармации Перпиньянского университета (Перпиньян, Франция).

Научная новизна работы заключается в том, что:

- впервые установлена возможность селективного определения сигнала (тока окисления тиохолина) биосенсоров на основе углеродистых материалов и снижения рабочего потенциала окисления в присутствии модифицирующего слоя нафтона без использования медиаторов электронного переноса;
- впервые показано, что нанесение модифицирующего слоя ионообменного полимера между основным материалом электрода и иммобилизованным ферментом не только стабилизирует отклик биосенсора, но и повышает чувствительность и селективность определения фосфорорганических пестицидов;
- установлено активирующее влияние ацетонитрила на нативную и иммобилизованную холинэстеразу и на этой основе достигнуто снижение пределов обнаружения фосфорорганических пестицидов в водно-органических экстрактах из зерна;
- определены пути повышения чувствительности и селективности определения пестицидов за счет регулирования удельной активности и толщины ферментсодержащего слоя для биосенсоров на основе печатных углеродных электродов и за счет нестационарного режима массопереноса реагентов в ферментсодержащем слое и сорбционного предконцентрирования на материале мембраны в точно-инжекционном режиме.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- разработаны простые в производстве и удобные в использовании амперометрические биосенсоры на основе планарных углеродных электродов, изготавливаемых методом микропечати, позволяющие детектировать присутствие фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в воде и растительных экстрактах на уровне нормативов ПДК;
- предложены упрощенные методики ферментативного определения остаточных количеств пестицидов из растительных экстрактов без удаления органического растворителя;

- разработаны и апробированы конструкции проточных ячеек для проточно-инжекционного определения пестицидов.

Положения, выносимые на защиту:

- исследование и сравнение операционных и аналитических характеристик биосенсоров на основе печатных и объемных электродов из углеродистых материалов, выявление экспериментальных факторов (состав ферментсодержащего слоя, материал электрода, режим массопереноса в мембрану), определяющих чувствительность и селективность определения ингибиторов;

- механизм влияния полимерного слоя нафтона, стабилизирующего отклик биосенсора и повышающего чувствительность и селективность определения остаточных количеств пестицидов;

- влияние органического растворителя на активность нативной и иммобилизованной холинэстеразы и возможность прямого определения остаточных количеств пестицидов в экстрактах без удаления растворителя

- сравнительная оценка результатов контроля реальных объектов окружающей среды с помощью разработанных биосенсоров и стандартных методов хроматографического анализа, метрологическая характеристика биосенсоров в межлабораторном эксперименте.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на итоговой научной конференции Казанского государственного университета (1999 г.), 2 Всероссийском симпозиуме по проточному анализу (Москва, 1999), Международном конгрессе по аналитической химии (Москва, 1997), 3 международном симпозиуме INCO Соретник "Применение биосенсоров для определения загрязнителей в полевых условиях" (Коимбра, 1998), 7 Международном симпозиуме по электроаналитической химии ESEAC-98 (Коимбра, 1998), 4 Франко-испанском семинаре по биосенсорам (Монпелье, Франция, 1999), 5 Франко-испанском семинаре (Вик, Испания, 2000).

Основные результаты изложены в 2 статьях и 5 тезисах докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 173 страницах машинописного текста, включает 49 рисунков и 16 таблиц. Стоит из Введения, 4 глав, Выводов, Списка использованных библиографиче-

ских источников, включающего 229 ссылок на отечественные и зарубежные работы, и Приложения.

Диссертация выполнена на кафедре прикладной экологии Казанского государственного университета и в Лаборатории фитофармации Перпиньянского университета (Франция) в рамках договора о научном сотрудничестве между Казанским и Перпиньянским университетами и Российско-французской программы "Биотехнологии - агропроизводству" Миннауки РФ при поддержке РФФИ (грант № 97-03-33210 "Разработка тестовых методов определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров"), программы "Университеты России. Фундаментальные исследования" (грант № 015.01.07.01.12" Оценка загрязнения окружающей среды с помощью тест-методов биохимической диагностики").

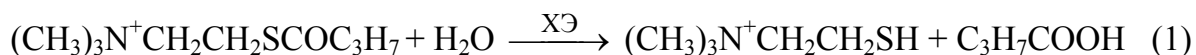
Часть экспериментальных результатов и выводы на их основе использованы в учебном процессе в Казанском государственного университете при чтении общего курса "Экологических мониторинг".

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В исследованиях использовали промышленно выпускаемые препараты бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади (ХЭ), КФ 3.1.1.8, производства АО "Биомед", г. Пермь, с удельной активностью $4,2 \pm 0,5$ Е/мг и "Sigma", США, с удельной активностью 600 Е/мг. Субстратом ферментативной реакции служил S-бутирилтиохолин иодид (БТХИ). Измерения проводили в 0,002 М. фосфатном буферном растворе, содержащих для постоянства ионной силы 0,1 М сульфата натрия.

Иммобилизацию ХЭ проводили путем кросс-сшивки парами и раствором глутарового альдегида на поверхности модифицированного нафтином печатного электрода и нитратцеллюлозной ("Sartorius") или нейлоновой ("Amersham") мембран.

Откликом служило максимальное изменение тока окисления тиохолина, регистрируемого после добавления субстрата (1).



Вольтамперометрические измерения проводили с помощью вольтамперографа ИВА-3 (НПВП "Ива", Екатеринбург) и потенциостата Metrohm (641 VA Detector, Швейцария).

В качестве модельных ингибиторов были изучены диазинон {О-(2-изопропил-4-метилпиримидил-6)-О,О-диэтилтиофосфат}; кумафос {О,О-диэтил-О-(3-хлор-4-метил-7-кумаринил)тиофосфат}; трихлорфон {О,О-диметил-(2,2,2-трихлоро)-1-гидроксиэтилфосфонат}; хлорпирифос-метил {О,О-диметил-О-[2-(диэтиламино)-6-метил-4-пиримидинил]-тиофосфат}, метиокарб: (4-метилтио-3,5-диметилфенил) N-метилкарбамат и фторид натрия.

Электроды на основе углеродистых материалов изготавливали из эпоксидно-углеродной композиции и путем микропечати на серебряной подложке из суспензии кристаллического графита в гидроксиэтилцеллюлозе с помощью принтера DEK 248 (DEK, Англия). Измерения в проточно-инжекционном режиме проводили с помощью блока БР-1 проточного анализатора (АО "Химавтоматика", Москва), оснащенного ячейкой типа "отражательная стенка" собственной конструкции.

Характеристика отклика амперометрических сенсоров. Углеродистые материалы весьма перспективны для создания биосенсоров, поскольку облегчают иммобилизацию фермента. Первоначально были изучены угольно-пастовые электроды на основе различных композиций с органическими и неорганическими пластификаторами и медиаторами электронного переноса (Nile Blue и Meldola Blue). Последний позволил снизить потенциал окисления тиохолина с 0,80 В до 0,60 В отн. Ag/AgCl, однако значительный фоновый ток и плохое разрешение пиков на вольтамперограммах приводили к низкой точности измерения сигнала. Вследствие низкой сорбционной емкости материала удельная активность ХЭ была достаточно низкой и быстро снижалась во времени вследствие вымывания фермента. Использование эпоксидно-углеродной композиции существенно улучшило воспроизводимость сигнала, снизив потенциал окисления до +0.50 В. Кроме того, на данных электродах удалось добиться разделения токов окисления тиохолина и иодид-иона, использующегося в качестве противоиона субстрата ХЭ. Прямая иммобилизация ХЭ в пасте и на поверхности приводят к низ-

кому невоспроизводимому отклику, поэтому использовались накладные мембраны на основе нейлоновых и нитратцеллюлозных носителей. Измерения проводили в проточно-инжекционном режиме. Форма сигнала и его основные характеристики приведены на рис.1 и в табл.1, градуировочные кривые определения субстрата – на рис.2.

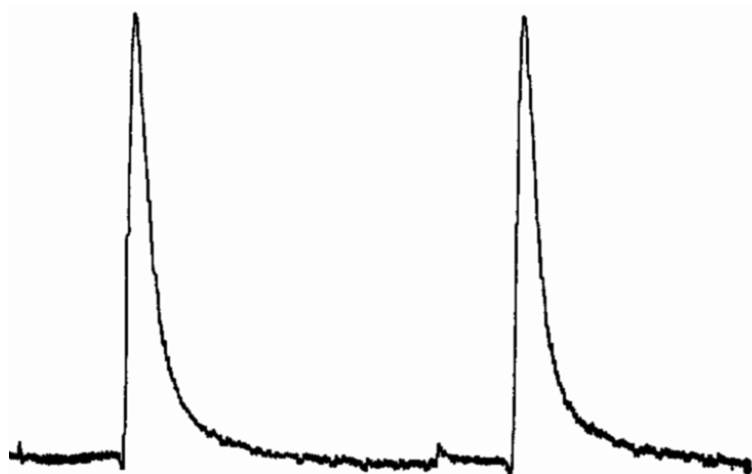


Рисунок 1. Отклик биосенсора на основе эпоксидно-углеродного электрода и ХЭ, иммобилизованной на накладной нейлоновой мембране

Таблица 1
Характеристики отклика амперометрических биосенсоров в проточно-инжекционном режиме (субстрат БТХИ 6×10^{-5} М).

Материал мембраны	ХЭ в растворе	Нейлон Hybond	Нитрат целлюлозы Sartorius
Удельная активность, Е/см ²	4,2 (Е/мл)	1,8	1,4
Ток пика, мкА	31	5,5	12,5
Полуширина пика, с	24	61	33
Время пика, с	12	40	20
Общее время измерения, с	120	180	150

ХЭ сохраняет активность в течение не менее чем 3 месяцев после иммобилизации на нейлоне и нитрате целлюлозы, в растворе отклик сохраняется в течение не менее чем 3 недель, резкое снижение отклика, иногда наблюдаемое, связано, по-видимому, с образованием микротрещин и подтеканием буферного раствора к поверхности электрода.

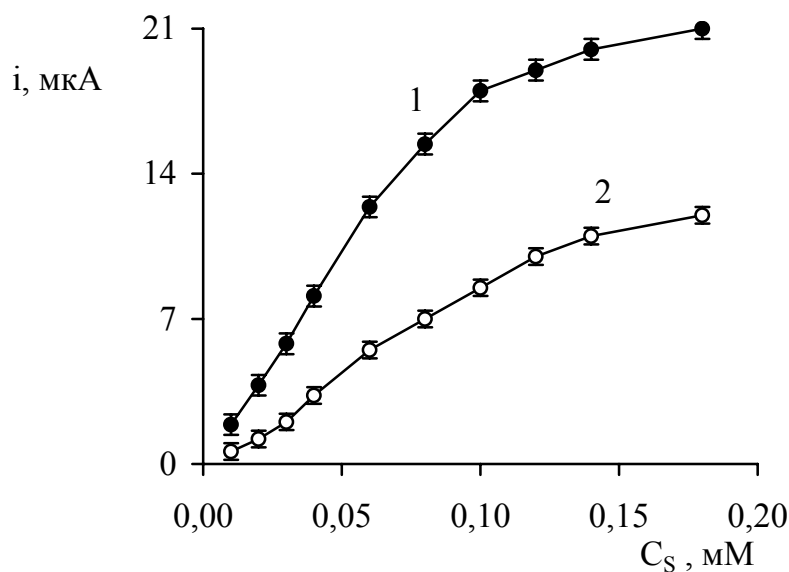
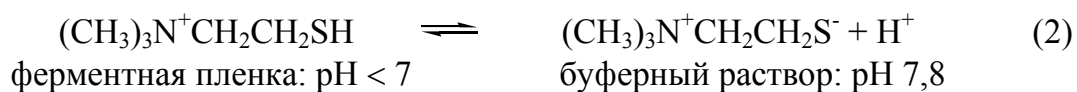


Рисунок 2. Определение БТХИ с помощью амперометрического биосенсора на основе эпоксидно-углеродного электрода и ХЭ, иммобилизованной на нитратцеллюлозной (1) и нейлоновой (2) мембране.

Наилучшие результаты были получены с печатными электродами, в которых кристаллический графит размещали в виде суспензии в гидроксипропилцеллюлозе на пластиковом носителе. Благодаря использованию техники удалось добиться высокой воспроизводимости характеристик поверхности сенсора и воспроизводимости основных операционных характеристик биосенсоров в серии. Предварительное тестирование электродов показало, что время их жизни ограничено деградацией электропроводящего слоя. Для увеличения адгезии углеродсодержащего слоя и снижения рабочего потенциала впервые было предложено наносить промежуточный слой ионообменного полимера нафiona. В результате такой модификации потенциал окисления тиохолина снижается с 0,8 В (немодифицированные электроды) до 0,25-0,41 В, по-видимому, за счет влияния катионообменных свойств полимера.

В подтверждение этого на модифицированных электродах практически не происходит окисления иодид-ионов. Тиохоллин полностью ионизирован в щелочной среде буферного раствора (рН 7,8), однако его образование в ферментной пленке сопровождается высвобождением эквивалентного количества масляной кислоты в соответствии с ур.(1). Поэтому большая часть тиохолина во внутрен-

ней части ферментной пленки, расположенной на нафиевом покрытии, представляет собой неионизированную катионную форму (2).



В результате рабочий потенциал окисления тиохолина на планарных электродах с нафиевым покрытием оказался лишь незначительно больше, чем для аналогичных сенсоров с включением медиаторов электронного переноса. В то же время, разработанный способ иммобилизации позволил сохранить естественное микроокружение фермента и упростить процедуру изготовления биосенсора.

Влияние нафиена на отклик биосенсора представлено на рис. 3,4.

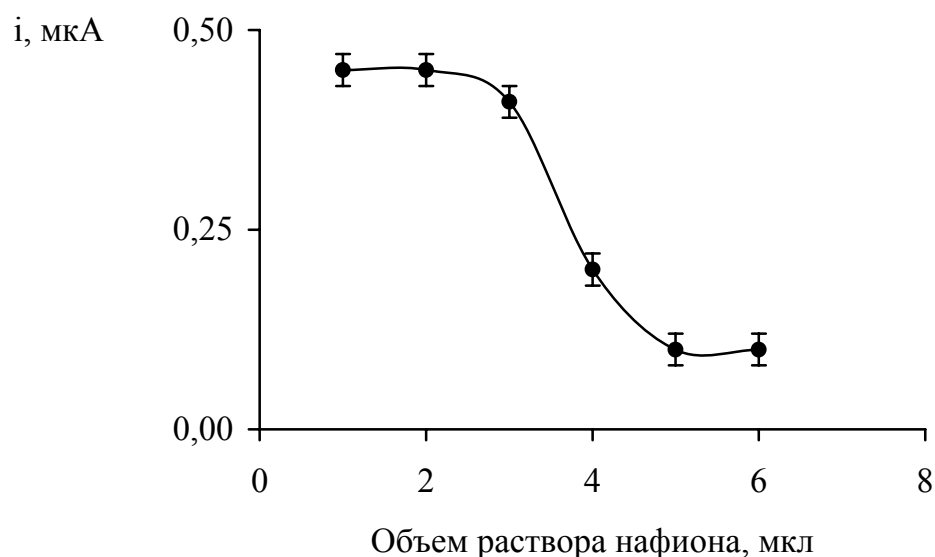


Рисунок 3. Зависимость сигнала биосенсора на основе печатного электрода от аликвоты 0,05 % нафиена, наносимого на электрод. Субстрат БТХИ 1×10^{-4} М, E +400 мВ. Фосфатный буферный раствор 2×10^{-3} М + 1×10^{-1} М Na_2SO_4 , pH 7,8, 37°C.

ХЭ иммобилизовали на поверхности печатного электрода в парах глутарового альдегида при пониженном давлении. Процедура иммобилизации позволяет получать сверхтонкие пленки фермента, практически не оказывающие диффузионного торможения переноса реагентов в мембрану.

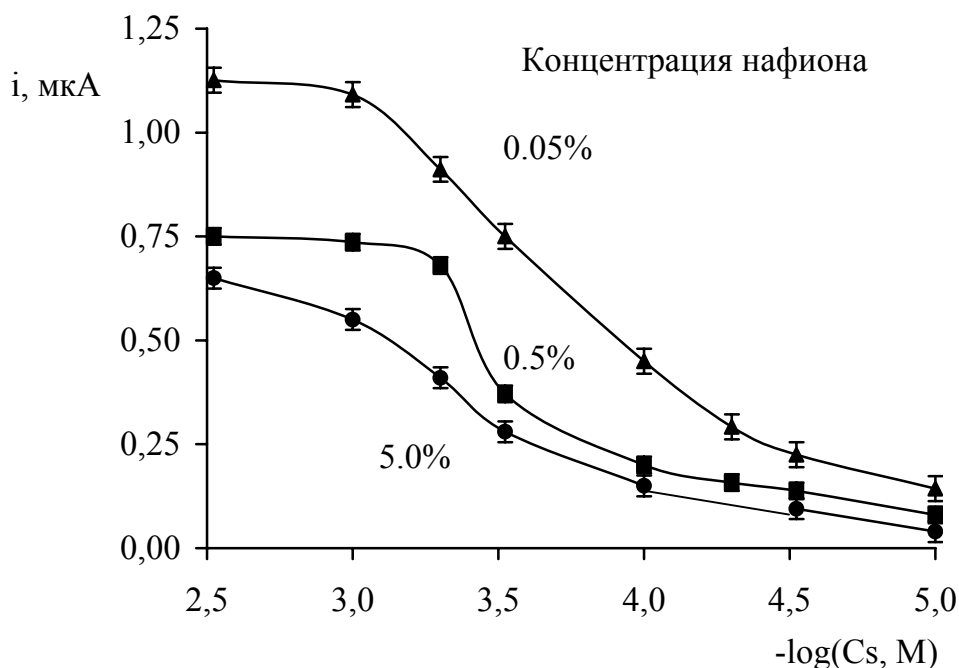


Рисунок 4. Зависимость отклика биосенсора на основе печатного электрода от концентрации наффона. Аликвота 2 мкл на 1 электрод. Условия измерения сигнала см. рис.2.

Иммобилизация не меняет кинетических параметров ферментативной реакции. Константа Михаэлиса, рассчитанная по зависимости отклика от концентрации субстрата в двойных обратных координатах $i^{-1} - Cs^{-1}$, составила 2×10^{-4} М для раствора ХЭ и $1,7 \times 10^{-4}$ М для иммобилизованного фермента.

Определены оптимальные характеристики нанесения наффона (2 мкл 0,005 % суспензии на электрод) и иммобилизации ХЭ (время обработки парами глутарового альдегида 3-4 мин., 1-5 Е фермента на электрод).

Полученный сигнал линейно зависит от концентрации БТХИ в диапазоне концентраций 1×10^{-5} - 5×10^{-4} М. Природа буферного раствора оказывает незначительное влияние на определение субстрата. По мере разбавления раствора сигнал возрастает до максимального значения при концентрации 2×10^{-3} - 5×10^{-3} М. рН-Оптimum отклика биосенсора практически совпадает с полученным для нативного фермента в тех же условиях измерения (рис. 5).

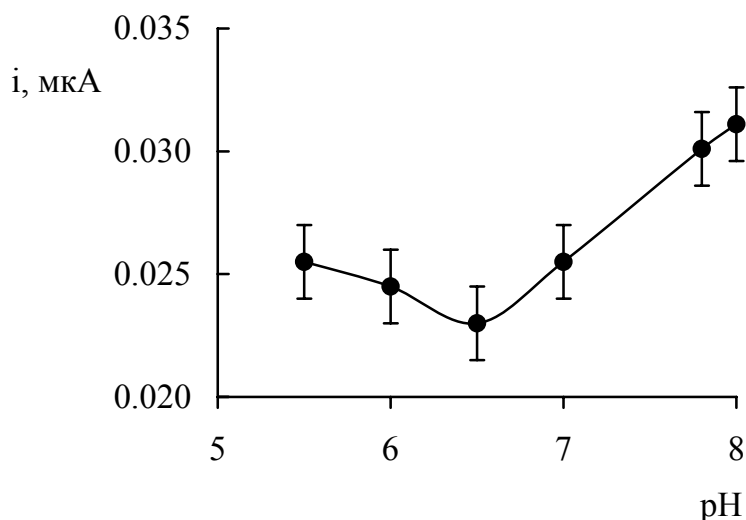


Рисунок 5. Зависимость сигнала печатного биосенсора от pH рабочего буферного раствора. БТХИ 1×10^{-4} М, боратный, трис- и фосфатный буферные растворы.

Таким образом, предварительное изучение различных типов биосенсоров позволило предложить использование эпоксидно-графитовых и печатных модифицированных нафиемом биосенсоров для испытаний с модельными растворами токсикантов и экстрактами реальных объектов окружающей среды. Некоторые характеристики исследованных типов электродов и биосенсоров на их основе представлены в табл.2.

Таблица 2
Характеристики электродов на основе углеродистых материалов и возможность их использования в составе холинэстеразных биосенсоров

Электроды	Угольно-пастовые	Эпоксидно-углеродные	Печатные планарные
Характеристики			
Рабочий потенциал окисления тиохолина (отн. Ag/AgCl), мВ	+ 800	+ 500-600	+250-410
Погрешность измерения сигнала (6 последовательных измерений, $C_S 1 \times 10^{-3}$ М), отн. %	8-12	5-7	3-4
Соотношение фонового тока и сигнала ($C_S 1 \times 10^{-3}$ М)	1-50	1-2	0,1-0,2
Возможность иммобилизации фермента:			
- в материале электрода	+	-	-
- на поверхности без носителя	-	+	+
- на инертном носителе	+	+	-

Влияние органического растворителя. При ферментативном определении остаточных количеств пестицидов в растительном материале основная проблема состоит в выборе органического экстрагента. В ходе настоящей работы был проведен скрининг органических растворителей по оказываемому ими антихолинэстеразному действию. Как показало исследование, присутствие 20-25 % этанола и ацетона вызывает некоторое снижение активности ХЭ, причем иммобилизация на нейлоне и нитрате целлюлозы стабилизирует отклик как на субстрат, так и на ингибирующее влияние пестицидов (табл. 3).

Таблица 3

Антихолинэстеразное действие органических растворителей

Растворители, смешивающиеся с водой		Растворители, не смешивающиеся с водой	
Растворитель	Антихолинэстеразное действие	Растворитель	Антихолинэстеразное действие
Этанол 10%	-	Хлороформ	+
20%	+		
Ацетон 10%	-	Тетрахлоруглерод	+
20%	+		
Ацетонитрил 10%	(а)	Гексан	-

Примечание. а) Активирующее действие

Для ацетонитрила впервые установлено не ингибирующее, а активирующее влияние на ХЭ как в нативном, так и в иммобилизованном состоянии. Это позволяет предложить данный растворитель для экстракции остаточных количеств пестицидов с последующим их ферментативным определением. Также было установлено, что экстракция ацетонитрилом чистых образцов зерна пшеницы, риса, ржи, ячменя не приводит к выделению природных ингибиторов ХЭ: после разбавления экстракт не оказывал ингибирующего влияния на активность нативного и иммобилизованного фермента. Количественные характеристики влияния ацетонитрила на отклик биосенсора на основе печатного электрода представлены на рис.б.

Определение пестицидов из модельных водных растворов. Для расчета степени необратимого ингибирования использовали относительное снижение

отклика биосенсора: $I = (s_1 - s_2) \times 100\%$, где s_1 и s_2 – отклики биосенсора до и после ингибирования, соответственно.

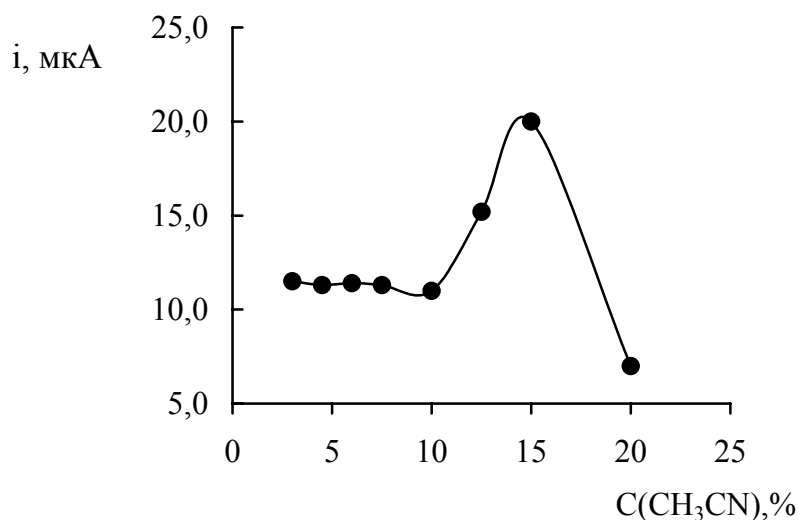
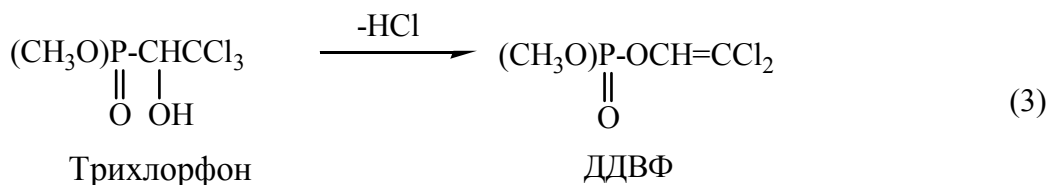


Рисунок 6. Зависимость тока окисления тиохолина в присутствии 1 Е/мл ХЭ от концентрации ацетонитрила, об.%. Субстрат БТХИ 1×10^{-3} М. Фосфатный буферный раствор, рН 7,8.

В табл.4 приведены результаты определения пестицидов с помощью печатных электродов, модифицированных нафоином, обобщены в табл.6.

Свежеприготовленный раствор трихлорфона выдерживался перед определением в течение не менее, чем 4 часов. По данным хроматографического анализа, в растворе образуются как минимум 4 разных продукта гидролитической трансформации трихлорфона. Максимум накопления одного из них, дихлорметилвинилфосфата (ДДВФ) соответствует максимальному ингибирующему эффекту раствора (3).



Тионовые фосфорорганические пестициды предварительно электрохимически окисляли до кислородных аналогов для повышения чувствительности определения. Для повышения их растворимости эксперименты проводили в 10 % растворе ацетонитрила.

Таблица 4

Градуировочные зависимости определения пестицидов
с помощью печатного тонкопленочного электрода $I(\%) = a + b \times \log(C_i, M)$

Пестицид	Трихлорфон	Кумафос	Хлорпирифос
B	219 ± 26 (200 ± 30)	$2,9 \pm 0,1$	35 ± 7
A	1410 ± 170 (1200 ± 300)	$-2,3 \pm 0,9$	177 ± 33
Коэффициент корреляции (r)	0,9785	0,9974	0,9952
Предел обнаружения, M	$3,5 \times 10^{-7}$ (9×10^{-7})	$3,5 \times 10^{-8}$ (5×10^{-7})	2×10^{-5}
Диапазон определяемых концентраций, M	$4 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-7}$	$4,7 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$

Примечание. В скобках приведены значения, полученные для немодифицированного электрода (в отсутствие слоя нафiona)

Эффективность активации пестицида зависит от продолжительности электролиза (рис.7). Максимум эффективности достигается после 5 мин. электролиза для кумафоса и 7 мин. – для хлорпирифоса. В отсутствие ацетонитрила продолжительность электрохимического окисления превышала 10 мин для всех изученных пестицидов.

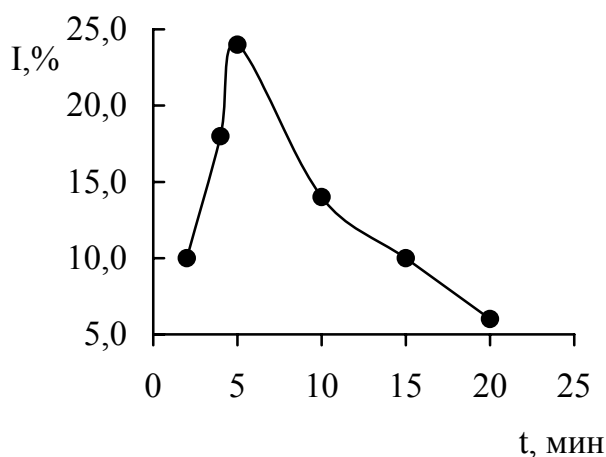


Рисунок 7. Зависимость ингибирующего действия $2,7 \times 10^{-8}$ M кумафоса от продолжительности его электрохимического окисления

Модификация нафионом приводит к снижению предела обнаружения трихлорфона в 3 раза. Для кумафоса этот эффект еще выше, по-видимому вследствие его сорбционного концентрирования на модифицирующем слое полимера, поскольку кумафос менее полярен, чем трихлорфон. Токсичность хлорпирифоса для теплокровных животных меньше, чем кумафоса (LD_{50} для крыс 170 и 16

мг/кг соответственно). В том же направлении меняются пределы их обнаружения.

Чувствительность определения фосфорорганических пестицидов зависит также от толщины образующейся на поверхности сенсора белковой пленки. Сравнение тонкопленочных биосенсоров с высокоактивным ферментом (600 Е/мг) и толстопленочных с малоактивным (4,2 Е/мг) препаратом ХЭ при одинаковой удельной активности фермента на рабочей поверхности сенсора имеют различный режим функционирования. Толстопленочные биосенсоры показывают предел обнаружения кумафоса более чем на порядок выше, а степень ингибирования – в 2-5 раз ниже, чем тонкопленочные. К тому же наблюдается восстановление ферментативной активности при отмывке.

Как показали исследования с тонкопленочными биосенсорами с различной удельной активностью ХЭ, с ростом активности фермента чувствительность отклика в отношении пестицидов снижается. Так, при нагрузке высокоактивной ХЭ 5.3 Е / электрод метиокарб определяется в диапазоне концентраций $4,4 \times 10^{-5}$ – $2,2 \times 10^{-4}$ М, тогда как при активности 0,1 Е / электрода - 1×10^{-6} - 2×10^{-6} М. Для окисленной формы кумафоса соответствующие диапазоны концентраций составили 2×10^{-7} - $5,5 \times 10^{-6}$ М и 4×10^{-8} - 2×10^{-7} М соответственно. Очевидно, что при большей активности иммобилизованного фермента требуется относительно больше ингибитора для достижения того же ингибирующего эффекта. Таким образом, в зависимости от конкретной эколого-аналитической задачи можно подбирать соотношение величины сигнала и чувствительности к пестицидам как компромисс между требованиями точности определения отклика и чувствительности определения токсиканта.

В экспериментах с эпоксидно-графитовыми электродами чувствительность определения пестицидов в проточно-инжекционном режиме оказалась даже выше, чем для нативного фермента. Можно предположить, что это связано с сорбционным концентрированием гидрофобного пестицида на полимерном носителе (табл.5). Этому способствовала специально сконструированная проточная ячейка с высоким отношением площади ферментсодержащей мембраны к объему контактирующего с ней раствора (2355 см^{-1}).

Таблица 5

Градуировочные зависимости определения диазинона с помощью биосенсора на основе эпоксидно-углеродных электродов с накладными мембранами $I(\%) = a + b \times \log(C_1, M)$

Носитель	Нейлон	Нитрат целлюлозы	Нативная ХЭ
В	58±2	63±3	42±2
А	470±10	528±26	342±18
Коэффициент корреляции (r)	0,9981	0,9914	0,9956
Предел обнаружения, М	4×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	5×10^{-9}
Диапазон определяемых концентраций, М	$6 \times 10^{-9} - 3 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$	$7 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-7}$

Примечание. Скорость потока 0.4 мл/мин. Фосфатный буферный раствор 2×10^{-3} М + 0,1 М Na₂SO₄. Инкубирование 10 минут. Субстрат БТХИ 6×10^{-5} М.

Механизм формирования отклика печатных биосенсоров в стационарном и эпоксидно-углеродных электродов с накладными мембранами - в проточно-инжекционном режиме подтверждается закономерностями изменения ингибирующего действия фторидов. Переход от немодифицированного электрода к модифицированному нафионом сопровождается увеличением пределов обнаружения фторида с 1×10^{-5} до $1,7 \times 10^{-4}$ М, вероятно, вследствие электростатического торможения переноса аниона в мембрану. Аналогичный эффект имеет использование гидрофобных носителей. В ряду “водный раствор фермента – нейлон – нитрат целлюлозы” предел обнаружения фторидов закономерно увеличивается (2×10^{-5} - 8×10^{-5} - 5×10^{-4} М), а наклон калибровочной прямой $i_o/i_t - C_F, M$, – уменьшается (623 ± 9 - 549 ± 42 - 425 ± 15).

Определение пестицидов в растительном материале. Для изучения возможности детектирования остаточных количеств пестицидов в растительном материале в качестве модельных токсикантов были выбраны кумафос и метиокарб. Сопоставление результатов, полученных на модельных водных растворах пестицидов и их экстрактах из предварительно зараженных образцов зерна позволяет предположить, что степень экстракции ацетонитрилом достигает 90 %.

Аналитические характеристики определения кумафоса представлены в табл.6.

Таблица 6

Аналитические характеристики определения кумафоса в растительном материале с помощью холинэстеразных амперометрических биосенсоров.

Зерно	$I\% = a + b C_1, C_1, \text{ мг/л}$		
	a	B	r^2
Рис	$3,75 \pm 1,80$	$1,40 \pm 0,15$	0,9888
Ячмень	$4,85 \pm 3,50$	$1,40 \pm 0,30$	0,9799
Модельный раствор	$2,30 \pm 1,10$	$0,75 \pm 0,050$	0,9925

Для метиокарба реально определяемые количества составляют около 15% от внесенного количества, что связано, по-видимому, с высокой скоростью разложения этого карбаминатного пестицида при экстракции. Использование ацетонитрила позволило значительно снизить влияние матрицы, наблюдавшееся, в частности, при использовании накладных холинэстеразных мембран или при экстракции пестицидов ацетоном.

Помимо искусственно зараженных образцов зернопродуктов, нами были исследованы пробы перца и груши, полученные от местных поставщиков в супермаркеты региона Лангедок-Русийон (Франция). Параллельно определению ингибиторов ХЭ в пробах с использованием тонкопленочных биосенсоров проводился их анализ методом ВЭЖХ. В экстрактах груши были обнаружены хлорпирифос-этил, малатион и пиримифос-метил, в экстрактах перца эти же фосфорорганические пестициды и дитиокарбаминаты. Экстракты из загрязненных образцов демонстрировали необратимое ингибирующее действие при разбавлении в 7000 раз (перец) и 5000 раз (груша). Чистые образцы снижения отклика биосенсора не вызывали. Степень ингибирования закономерно снижалась при изменении степени разбавления экстрактов, что свидетельствует об отсутствии обратимой составляющей ингибирования. Электрохимическое окисление экстракта позволяет выявить вклад тионовых пестицидов в общее загрязнение образцов веществами антихолинэстеразного действия.

Оценка метрологических показателей биосенсоров в межлабораторном эксперименте. Для проверки воспроизводимости результатов, полученных при использовании печатных биосенсоров, был проведен межлабораторный эксперимент на базе кафедры прикладной экологии (Казанский университет) и Центра фитофармации (Университет г. Перпиньян, Франция).

Совпадение морфологии субстратных зависимостей отклика и выхода на предельное значение силы тока (насыщение мембраны субстратом) независимо от места проведения измерений и аппаратурного обеспечения эксперимента (рис.8) свидетельствует, что методика изготовления и хранения биосенсоров надежно обеспечивает воспроизводимость их основных операционных характеристики.

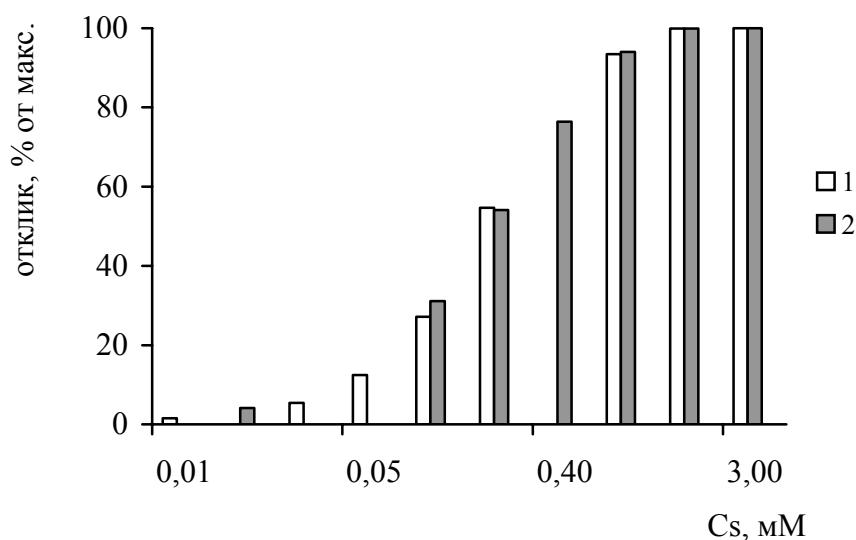


Рисунок 4. Оценка субстратной специфичности в межлабораторном эксперименте: 1 - результаты измерений в Казанском университете; 2 – результаты измерений в Центре фитофармации г. Перпиньян.

Оценку воспроизводимости (4) ингибирования модельным раствором кумафоса проводили методом сравнения углов наклона градуировочных зависимостей кумафоса по Стьюденту.

$$\frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\delta_{b_1}^2 - \delta_{b_2}^2}} \leq 1 \quad t_{v, P=95\%} \quad (v = N_1 + N_2 - 4) \quad (4)$$

где b_1 – наклон прямой, полученной по результатам российского эксперимента, b_2 – наклон прямой, полученной по результатам французского эксперимента и ν – число степеней свободы. Результаты расчетов представлены в табл.7.

Таблица 10

Воспроизводимость измерения ингибирующего действия кумафоса по результатам межлабораторного эксперимента. $I(\%) = a + b \times \log(C_I, M)$

	Калибровочная кривая по результатам российского эксперимента	Калибровочная кривая по результатам французского эксперимента
a	$-2,26 \pm 0,87$	$5,67 \pm 1,59$
b	$2,90 \pm 0,067$	$2,18 \pm 0,11$
Коэффициент корреляции (R^2)	0,9987	0,9965
$S_b (\delta_b)$	0,423	0,985
Воспроизводимость	$0,814 \leq 2,16$	

Значение воспроизводимости свидетельствует, что результаты ингибирования с вероятностью 95% совпадают.

Аналогичным образом, ингибирующее действие разбавленного ацетонитрильного экстракта из риса, зараженного кумафосом, по результатам независимых измерений, проведенных в Казани и Перпиньяне с печатными биосенсорами, описываются единой градуировочной зависимостью:

$$I, \% = 8,78 \times C_I - 3,71; \quad R^2 = 0,9985 \quad (5)$$

$$R^2 \geq r_k = (t_{\nu, P=95\%} / \sqrt{\nu + t_{\nu, P=95\%}^2}) = 0,71$$

Таким образом, межлабораторный эксперимент свидетельствует о надежности измеренных показателей ингибирования и выводов о загрязнении образцов растительной продукции, сделанных на их основе. Холинэстеразные биосенсоры могут, таким образом, служить средством первичного контроля растительной продукции, предназначенного для быстрого определения наиболее загрязненных образцов с тем, чтобы в последующем химическом анализе выявить природу содержащегося в них пестицида.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые амперометрические холинэстеразные сенсоры на основе углеродистых композиций и модифицирующих материалов, обладающих улучшенными операционными и аналитическими характеристиками определения остаточных количеств фосфорорганических (хлорпирифос, трихлорфон, кумафос) и карбаминатных (метиокарб) пестицидов.
2. Электростатическое торможение переноса ионных компонентов реакции, создаваемое модифицирующим слоем нафiona, увеличивает время их жизни до 6 месяцев, снижает мешающее влияние ионов – эффекторов фермента и увеличивает долгосрочную стабильность отклика. Чувствительность определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в 1,5-2 раза выше, а предел обнаружения – в 2-5 раз ниже, чем для биосенсоров на основе немодифицированных электродов.
3. Иммобилизация холинэстеразы в парах глутарового альдегида позволяет получить сверхтонкие ферментсодержащие пленки, не создающие диффузионного торможения переноса компонентов реакции к поверхности сенсора. В результате расширяется диапазон определяемых концентраций и увеличивается чувствительность определения ингибиторов по сравнению с толстослойными мембранами, получаемыми путем кросс-сшивки раствором глутарового альдегида. Увеличение удельной активности фермента снижает чувствительность определения необратимых ингибиторов.
4. В проточно-инжекционных условиях чувствительность определения пестицидов с помощью иммобилизованной холинэстеразы повышается за счет сорбционного предконцентрирования ингибиторов. Действие обратимых эффекторов снижается в результате нестационарных условий их переноса в ферментсодержащую мембрану.
5. Установлены рабочие условия определения остаточных количеств пестицидов в растительном материале. Показано, что ацетон и этанол в концентрации до 25 % снижают, а ацетонитрил в концентрации до 20 % увеличивает активность нативной и иммобилизованной холинэстеразы. Оценка ингибирующего действия ацетонитрильных экстрактов из зерна пшеницы, ячменя, риса по-

зволяет определять фосфорорганические пестициды на уровне установленных максимально допустимых уровней.

Основное содержание диссертации отражено в публикациях:

1. Evtugyn G.A., Gogol E.V., Ivanov A.N., Latipova V.Z. Flow-injection analysis of cholinesterase inhibitors: optimization of detection system./ Intern.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 of Electro-analysis. Book of Abstr. 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.
4. 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. №1-3. P.13-21.
5. Gogol E.V., Marty J.-L., Evtugyn G.A., Budnikov H.C. The influence of the sensor and immobilization procedure on the sensitivity of the determination of cholinesterase inhibitors.// Abstr.of IV rencontre transfrontalière capteurs et biocapteurs. Montpellier. France. 1999.
6. Евтюгин Г.А., Иванов А.Н., Гоголь Э.В., Будников Г.К. Определение ингибиторов холинэстераз с помощью проточных электрохимических биосенсоров Сб.тезисов докл. 2 Всерос. Симпозиума "Проточный химический анализ" 1-3 декабря 1999. М.: ИОНХ РАН.- С.75-76
7. Gogol E.V., Evtugyn G.A., Marty J.-L., Budnikov H.C., Winter V.G. Amperometric biosensors based on Nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors.// Talanta. 2000. V.53. №2. P.379-389.