

На правах рукописи

СУПРУН ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**ПЕРОКСИДАЗНЫЕ И ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

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

Казань - 2004

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина" Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель: доктор химических наук
Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Евгеньев Михаил Иванович
(Казанский государственный технологический университет)

доктор химических наук,
ст.н.с. Карякин Аркадий Аркадьевич
(Московский государственный университет
им.М.В.Ломоносова, химический факультет)

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт безопасности жизнедеятельности Республики Башкортостан (г.Уфа)

Защита диссертации состоится 9 декабря 2004 г. в 14 ч. на заседании диссертационного совета К 212.081.04 при Казанском государственном университете по адресу: г.Казань, ул.Кремлевская, 18, Химический институт им.А.М.Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

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

Автореферат разослан " ____ " ноября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук

Л.Г.Шайдарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ*)

Актуальность работы. Применение ферментов с целью идентификации и количественного определения биологически активных соединений позволяет достичь уникальной селективности и чувствительности их определения, в том числе, с использованием стандартной измерительной аппаратуры и по месту пробоотбора. Недостатки применения ферментов в рутинном анализе - низкая устойчивость при хранении и высокая стоимость - могут быть компенсированы путем их иммобилизации на нерастворимых носителях. При этом особое значение приобретает способ введения иммобилизованного фермента в состав специализированного аналитического устройства - биосенсора, поскольку именно характеристики контакта биокompонента и преобразователя определяют способ регистрации сигнала и его селективность. Это особенно важно при проведении измерений в матрицах сложного состава, в присутствии электрохимически активных примесей, органических растворителей и т.д.

В этой связи актуальным является исследование новых способов модификации графитовых электродов, отличающихся разнообразием свойств, простотой введения дополнительных компонентов в состав электродного вещества и воспроизводимостью характеристик при массовом производстве с использованием технологий струйной печати (напыления) и микролитографии.

Целью настоящей работы явилось создание амперометрических пероксидазных и холинэстеразных сенсоров на основе модифицированных графитовых электродов и установление влияния модификаторов на операционные и аналитические характеристики определения субстратов и ингибиторов ферментов.

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

- разработать методы модификации графитовых тонко- и толсто пленочных электродов нафтоном, полианилином, политирамином, в том числе путем электрополимеризации, производными каликс[4]резорциноларенов и анти-телами против нонилфенола и цефтазидима; установить характер влияния модификаторов в соответствии с механизмом их действия;
- выбрать условия иммобилизации пероксидазы и холинэстеразы, обеспечивающие наиболее устойчивый воспроизводимый сигнал и высокую чувствительность определения их субстратов (пероксидаза) и ингибиторов (холинэстераза);

*) Научным консультантом работы является зав.кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета, д.х.н., проф. Будников Герман Константинович

- изучить влияние гетерогенных медиаторов электронного переноса (полианилин, берлинская лазурь) на условия регистрации сигнала и аналитические характеристики пероксидазных и холинэстеразных сенсоров;
- установить возможность повышения чувствительности определения и расширения круга определяемых соединений (цефтазидим, нонилфенол) с помощью пероксидазных сенсоров и модификаторов, обеспечивающих накопление субстратов на поверхности электрода;
- разработать чувствительные методы определения субстратов пероксидазы и ингибиторов холинэстеразы с применением модификаторов различного механизма действия.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- предложены подходы к модификации планарных графитовых электродов, позволяющие решать задачи стабилизации ферментов (нафион, политирамин), снижения рабочего потенциала измерения сигнала (нафион, берлинская лазурь, полианилин) и улучшения аналитических характеристик определения субстратов за счет их селективного накопления на электроде;
- показана возможность использования берлинской лазури для снижения потенциала окисления тиохолина и регистрации сигнала холинэстеразного сенсора, установлено влияние медиатора и состава иммобилизационной смеси на характеристики определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов;
- изучено влияние комплексов "гость-хозяин" с участием промазина и хлоропромазина и каликс[4]резорциноларенов на характеристики их прямого и пероксидазного окисления на электродах, модифицированных полианилином;
- предложено использовать совместную иммобилизацию пероксидазы и антител против низкомолекулярных соединений - гаптен - для регистрации иммунологических взаимодействий на поверхности сенсора по изменению скорости пероксидазного окисления гидрохинона и метиленового синего.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- предложены простые и удобные в использовании способы модификации электродов путем электрополимеризации анилина и тирамина с последующей иммобилизацией ферментов и включением дополнительных модификаторов за счет электростатических взаимодействий, физической сорбции и кросс-сшивки глутаровым альдегидом;
- разработаны методы определения остаточных количеств пестицидов антихолинэстеразного действия в зерне; предложено использовать холинэсте-

разный сенсор для контроля разложения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов при брожении виноградного сока;

- разработан биферментный сенсор с пероксидазой и холинэстеразой, иммобилизованными на одном графитовом электроде, модифицированном политирамином, для определения субстратов пероксидазы и ингибиторов холинэстеразы.

На защиту выносятся:

- результаты изучения влияния нафтона и политирамина на стабильность и чувствительность сигнала пероксидазного и холинэстеразного сенсоров при определении субстратов и ингибиторов ферментов и вывод о стабилизирующем влиянии модификаторов при хранении и использовании биосенсоров;
- характеристика влияния компонентов поверхностного слоя (низкомолекулярные модификаторы, глутаровый альдегид, альбумин, нафтон) и выбор состава иммобилизационной смеси и условий иммобилизации, обеспечивающих оптимальное сочетание стабильности сигнала и чувствительности определения ароматических субстратов пероксидазы и фосфорорганических и карбаминатных пестицидов - ингибиторов холинэстеразы;
- новый способ регистрации сигнала холинэстеразного сенсора при модификации печатного графитового электрода берлинской лазурью и результаты определения с его помощью ингибиторов холинэстеразы;
- влияние условий пробоподготовки и проведения измерения на чувствительность определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в зерне и виноградном соке в процессе брожения и вывод о возможности применения холинэстеразных сенсоров для контроля качества сельскохозяйственной продукции;
- влияние модификаторов на аналитические характеристики определения ароматических субстратов пероксидаз с помощью моно- и биферментного сенсора на основе модифицированных преобразователей сигнала, в том числе в присутствии специфических антител и комплексообразователей, и вывод о характере влияния структуры субстрата и механизме действия модификаторов на чувствительность и селективность их определения;

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Всероссийском симпозиуме "Тест-методы химического анализа" (Москва, 2001), Поволжской конференции по аналитической химии (Казань, 2001), Всероссийской конференции "Актуальные проблемы аналитической химии" (Москва, 2002 г.), 12 Международной конференции по аналитической химии EUROANALYSIS 12 (Дортмунд, Германия, 2002), Научной конференции молодых ученых, аспиран-

тов и студентов Научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003), 17 Международном симпозиуме по биоэлектрохимии (Флоренция, Италия, 2003), 8 Международном симпозиуме по кинетическим методам анализа КАС-2004 (Рим, Италия, 2004), Всероссийской конференции по аналитической химии "Аналитика России - 2004 (Москва, 2004).

Основные результаты изложены в 4 статьях и 9 тезисах докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 50 рисунка и 10 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 248 ссылок на отечественные и зарубежные работы.

Диссертация выполнена при поддержке РФФИ (грант № 97-03-33210 "Разработка тестовых методов определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров" и № 00-03-32605 "Разработка электрохимических биосенсоров на основе планарных модифицированных электродов для диагностики загрязнения окружающей среды"), научно-образовательной программы CRDF и Минобрнауки РФ (НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века" REC-007), ИНТАС (грант 00-273 "Создание химических и биохимических сенсоров для контроля продукции виноделия"), программы поддержки научных обменов НАТО (грант PST.CLG.979178).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор

Изложены и систематизированы способы иммобилизации пероксидазы и холинэстеразы, методы определения субстратов и ингибиторов пероксидазы с помощью биосенсоров на основе иммобилизованного фермента. Рассмотрено влияние способа иммобилизации ферментов и регистрации сигнала на аналитические характеристики биосенсоров.

Экспериментальная часть

Использовали бутирилхолинэстеразу (БуХЭ) из сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8), 610 и 260 Е/мг твердого вещества, ацетилхолинэстеразу (АХЭ) из электрического угря (Кф 3.1.1.7), 244 Е/мг производства "Sigma", и пероксидазу из хрена (КФ 1.11.1.7), "Sigma", 250 Е/мг, и "Vitact", 360 IU / мг. Субстратами АХЭ служили ацетилтиохолин хлорид и иодид (АТХХ и АТХИ, "Sigma"), субстратами БуХЭ - АТХХ и бутирилтиохолин иодид (БуТХИ, "Sigma"). Органиче-

скими субстратами пероксидазы служили гидрохинон, 2-амино-4-нитрофенол, *n*-метоксианилин, анилин, 3,4-дихлорфенол, *o*-, *m*-, и *n*-нитроанилин, *n*-хлоранилин, *o*- и *n*-аминопиридин, метиленовый синий, промазин и хлоропромазин.

В качестве модельных ингибиторов АХЭ и БуХЭ использовали алдикарб, метиокарб, паратион-метил, хлорпирифос-метил, кумафос ("Riedel-de-Haen", Seelze, Германия) и параоксон ("Sigma").

Антитела против нонилфенола были предоставлены для исследований зав.лабораторией иммунохимических методов анализа С.А.Ереминым (Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова), против цефтазидима - зав.лабораторией иммунохимии Школы медицины и фармации Университета г. Сандерленд, Великобритания, проф.Ф.Ровеллом (F.Rowell).

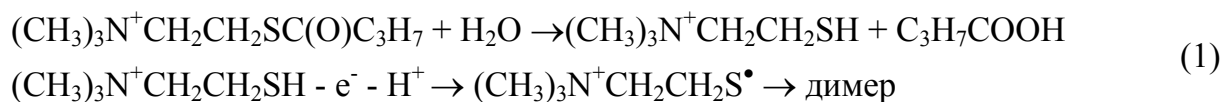
Замещенные каликс[4]резорциноларены были синтезированы в лаборатории супрамолекулярной химии Института органической и физической химии им.А.Е.Арбузова КНЦ РАН и предоставлены для исследования д.х.н. Э.Х.Казаковой.

Амперометрические измерения проводили в трехэлектродной ячейке с хлорсеребряным электродом сравнения в режиме линейной и циклической развертки потенциала ("Экотест-ВА", "Эконикс-Эксперт", Москва), а также при постоянном потенциале на вольтамперографах EcoChemie, BAS и ИВА. Для создания ферментных сенсоров использовали толстопленочные эпоксиграфитовые электроды (НПВП "ИВА", Екатеринбург) и тонкопленочные печатные графитовые электроды, изготовленные в университете "Tor Vergata" (Рим, Италия), Центре фитотерапии университета г.Перпиньян (Франция) и лаборатории электрохимии UMR-CNRS 6006 университета г. Нант (Франция) и НПВП "ИВА" (Екатеринбург).

При изучении комплексообразования с участием каликсрезорциноларенов и определении промазина и хлоропромазина с помощью пероксидазного сенсора использовали проточно-инжекционную систему, состоящую из насоса Ismatec и шестиканального клапана Rheodyne с инъекционной петлей на 100 мкл.

Операционные параметры холинэстеразных сенсоров на основе модифицированных планарных электродов

В качестве сигнала холинэстеразных сенсоров измеряли ток прямого или медиаторного окисления тиохолина, образующегося в реакции ферментативного гидролиза ацетил- или бутирилхолина (1).



Модификация нафием. Как было показано, нанесение на графитовый электрод слоя нафиема не только снижает скорость деградации электродного вещества, но и снижает рабочий потенциал окисления тиохолина на 200-250 мВ. Это позволяет исключить параллельное окисление иодид-иона и повысить точность измерения сигнала биосенсора. Изучено влияние способа модификации и продолжительности кросс-сшивки глутаровым альдегидом на характеристики сигнала (рис.1). Присутствие нафиема приводит к некоторому снижению сигнала по сравнению с немодифицированным сенсором, в то же время, увеличивается его стабильность и время жизни сенсора.

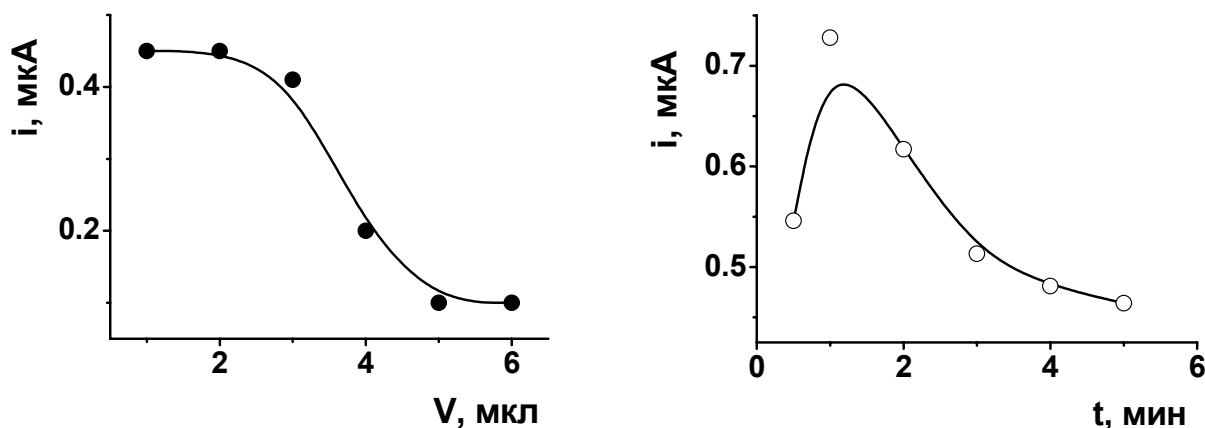


Рисунок 1. Влияние объема 0.5% суспензии нафиема, наносимой на электрод, (1) и продолжительности кросс-сшивки БуХЭ парами глутарового альдегида (2) на сигнал биосенсора на 0.1 мМ БуТХИ

Аналитические характеристики определения пестицидов с помощью холинэстеразного сенсора приведены в табл.1. Для контроля загрязнения пестицидами зерна и сельскохозяйственной продукции предложено проводить экстракцию остаточных количеств пестицидов ацетонитрилом с последующим инкубированием сенсора в разбавленном экстракте без удаления растворителя. Компоненты растительной матрицы уменьшают чувствительность определения пестицидов на 10-20% (рис.2). Холинэстеразный сенсор позволяет проводить определение 0.1-0.5 мг/кг кумафоса, 5-45 мг/кг хлорпирифос-метила и 15-50 мг/кг метиокарба.

Таблица 1. Определение пестицидов с помощью холинэстеразного сенсора на основе печатного графитового электрода, модифицированного нафионом

Пестицид	$I, \% = a + b \times (C_L, \text{мкМ})$			$C_{\text{min}}, \text{мкМ}$	Диапазон определяемых концентраций, мкМ
	a	b	r^2		
Кумафос	-3 ± 1	295 ± 5	0.9982	0.04	0.08-0.25
Хлорпирифос-метил	1.3 ± 1.1	5.2 ± 0.2	0.9935	1.0	2.0-14.5
Метиокарб	-24 ± 12	64.5 ± 7.0	0.9563	0.2	0.8-2.0

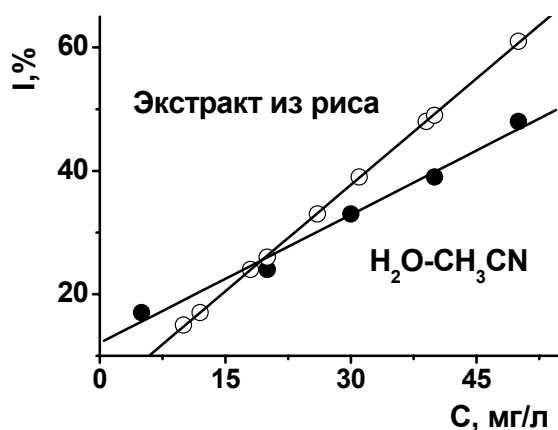
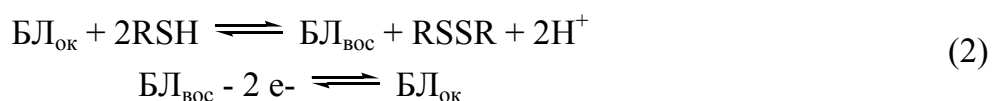


Рисунок 2. Определение метиокарба в экстракте из риса и смеси ацетонитрил- вода 1:10

Модификация берлинской лазурью^{*)}. Для более значительного снижения рабочего потенциала измерения сигнала холинэстеразного сенсора предложено модифицировать графитовый электрод ферроцианидом железа (III) (берлинской лазурью, БЛ), медиатором окисления тиохолина (2).



Участие медиатора в окислении тиола подтверждается характерными изменениями вольтамперограмм при внесении в раствор эфиров тиохолина (рис.3). Зависимость сигнала от концентрации субстрата при различных количествах АХЭ, взятых для иммобилизации, приведены на рис.4.

Введение альбумина в состав смеси для иммобилизации, а также дополнительное покрытие электрода нафионом до введения фермента увеличивают и стабилизируют сигнал, особенно в области малых активностей АХЭ.

^{*)} Исследования проводили в лаборатории биосенсоров университета "Tor Vergata" (зав.лаб. проф.Дж.Паллески (G.Palleschi))

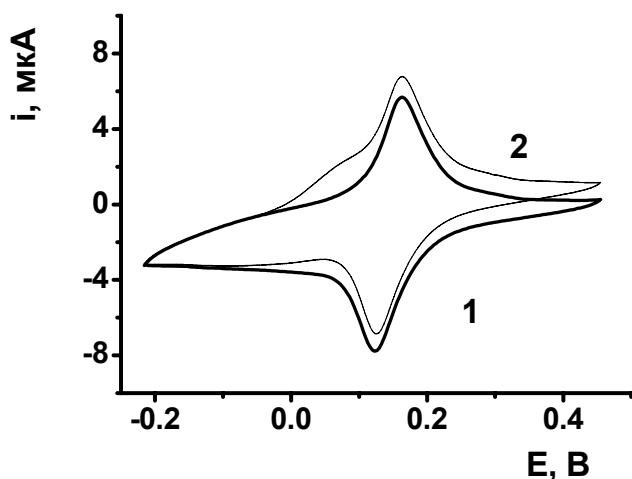


Рисунок 3. Вольтамперограмма, полученная с помощью АХЭ/БЛ сенсора до (1) и через 3 мин. после введения 1.5 мМ АТТХ (2)

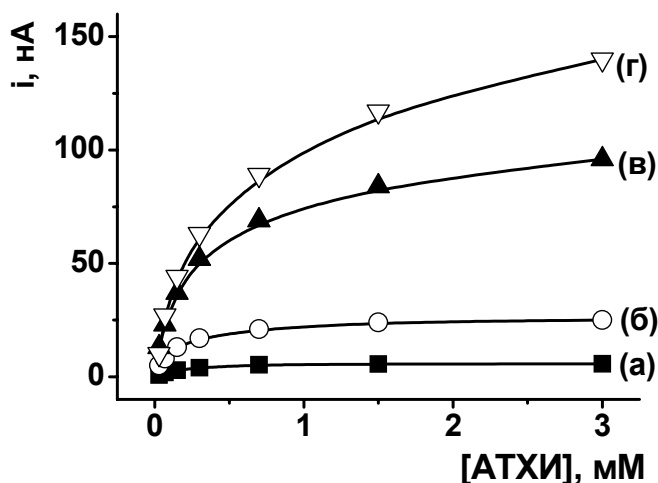


Рисунок 4. Зависимость тока окисления от концентрации АТХИ. Для иммобилизации использовали смесь 0.1% альбумина, 1% глутарового альдегида, 0.1% нафтона и 0.02 Е/мкл (а), 0.05 Е/мкл (б), 0.1 Е/мкл (в) и 0.2 Е/мкл (г) АХЭ

Разработанные биосенсоры отличаются очень быстрым откликом – 90% изменения тока происходит в течение 7-8 с, стабилизация сигнала – менее чем за три минуты. Результаты определения пестицидов антихолинэстеразного действия с помощью биосенсора на основе электрода, модифицированного берлинской лазурью, приведены в табл.2. Биосенсор был использован для контроля процесса распада пестицидов в процессе ферментации виноградного сока. Как оказалось, остаточные количества пестицидов обнаруживаются в сусле в течение 3-4 дней ферментации (рис.5), что согласуется с результатами хроматографического определения.

Разработанные холинэстеразные сенсоры выгодно отличаются от описанных в литературе низкими рабочими потенциалами измерения сигнала и быстрым откликом, не уступая по чувствительности определения пестицидов антихолинэстеразного действия. Возможно их применение в качестве средства предварительного контроля зерна и виноградного сока на остаточное содержание фосфорорганических и карбаминатных пестицидов.

Таблица 2. Определение пестицидов с помощью ацетилхолинэстеразного сенсора основе печатного графитового электрода, модифицированного берлинской лазурью (инкубирование 10 мин.)

Пестицид	$I, \% = a + b \times \lg(C_i, M)$			$C_{min},$ нМ	Диапазон определяемых концентраций, нМ
	a	b	r^2		
Алдикарб	626±61	94±10	0.9835	160	200-2000
Параоксон	526±13	70±2	0.9989	40	50-630
Паратион-метил	1054±42	137±7	0.9973	20	25-100

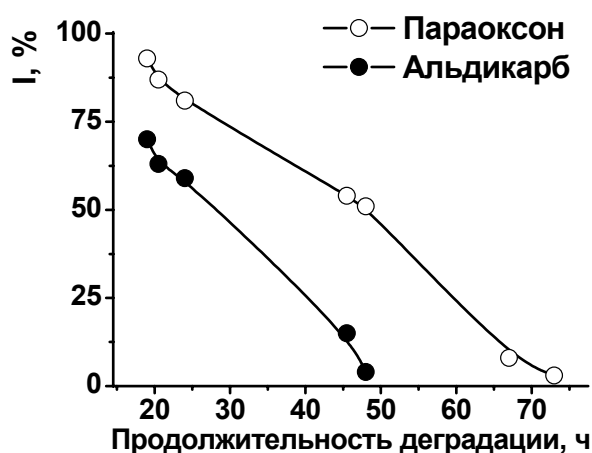


Рисунок 5. Динамика деградации параоксона и алдикарба в белом виноградном соке в процессе его ферментации. Инкубирование 10 мин.

Пероксидазные сенсоры на основе модифицированных графитовых электродов

Пероксидазные сенсоры готовили, иммобилизуя фермент кросс-сшивкой глутаровым альдегидом совместно с желатином. Условия иммобилизации определяли, используя в качестве органического субстрата гидрохинон (рис.6). Максимальный и стабильный сигнал сенсора достигался в фосфатном буферном растворе при pH 5.5. Иммобилизованный фермент сохранял активность в течение полутора-двух месяцев при хранении в сухом виде при 4°C.

В координатах Лайнуивера-Берка зависимость сигнала от концентрации гидрохинона линейна, а значение константы Михаэлиса (6.4 мМ) удовлетворительно совпадает с параметром нативного фермента, определенным в тех же условиях. Это свидетельствует об отсутствии значительных диффузионных ограничений взаимодействия фермента и субстратов.

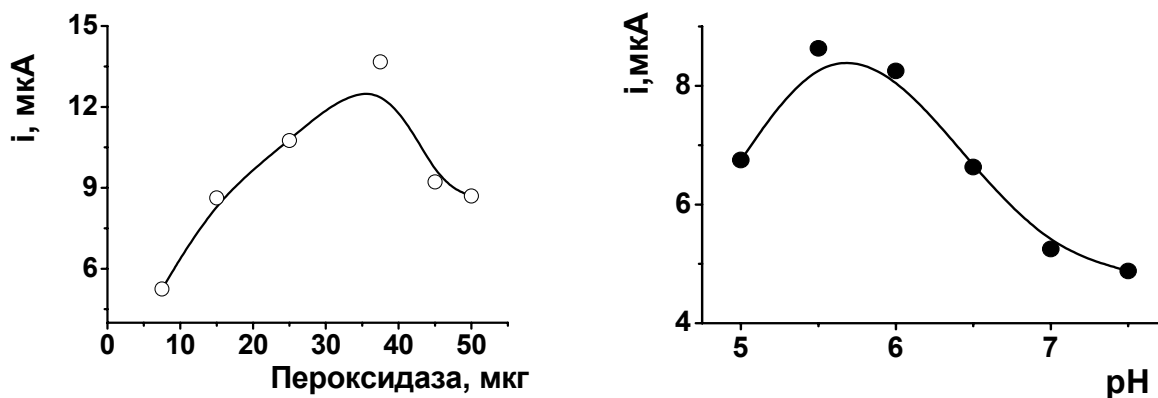


Рисунок 6. Зависимость сигнала пероксидазного сенсора от количества пероксидазы, взятой для иммобилизации, и pH фосфатного буферного раствора (гидрохинон 1.0 мМ, пероксид водорода 3.0 мМ)

Пероксидазный сенсор позволяет определять также замещенные анилины, фенолы и некоторые гетероциклические соединения в милли- и микромолярном диапазоне из концентраций (рис.7). Сигналом служил ток восстановления продуктов пероксидазного окисления, регистрируемый в том же диапазоне потенциалов, что и ток восстановления бензохинона. Предел обнаружения ароматических субстратов (3.3-60 мкМ) меняется симбатно с расчетным значением константы Михаэлиса. Чувствительность определения снижается при переходе от *o*- и *n*-изомеров к *m*-замещенным анилинам. Наименьшая чувствительность определения с помощью пероксидазного сенсора достигнута для *m*-нитроанилина, наибольшая - для *n*-метоксианилина и 2-амино-4-нитрофенола.

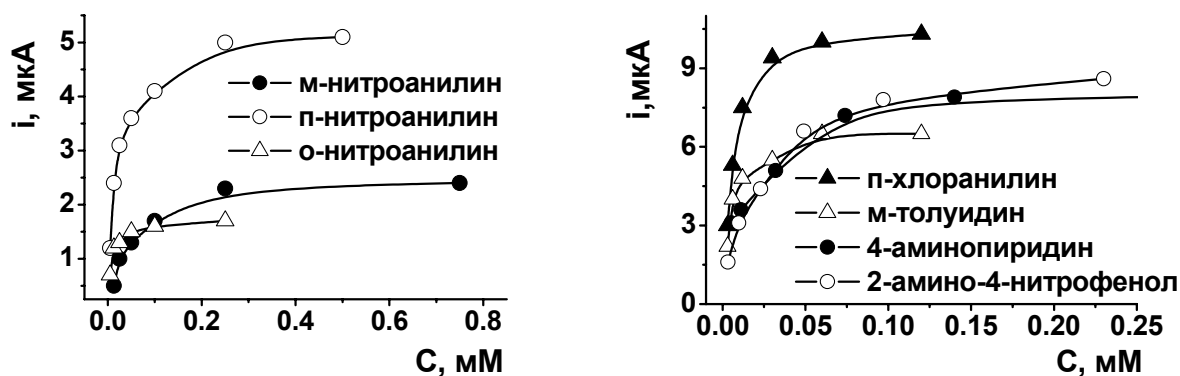


Рисунок 7. Зависимость сигнала пероксидазного сенсора от концентрации ароматических субстратов. Пероксид водорода 3.0 мМ. Фосфатный буферный раствор, pH 5.5

Наклон градуировочной зависимости не коррелирует с величиной максимального тока насыщения, который для *para*-замещенных ароматических соединений значительно (иногда в несколько раз) выше. Для других соединений предельные значения тока, соответствующие насыщению поверхностного слоя субстратом, совпадают. По-видимому, это связано с образованием электрохимически активных димеров (олигомеров), активность которых на электроде превышает активность исходных соединений.

При совместном присутствии двух субстратов наблюдается аддитивность сложения сигналов, отвечающих отдельным субстратам. Однако, в узком диапазоне концентраций иногда наблюдались максимумы тока. Более активный компонент синергически ускорял окисление менее активного (рис.8).

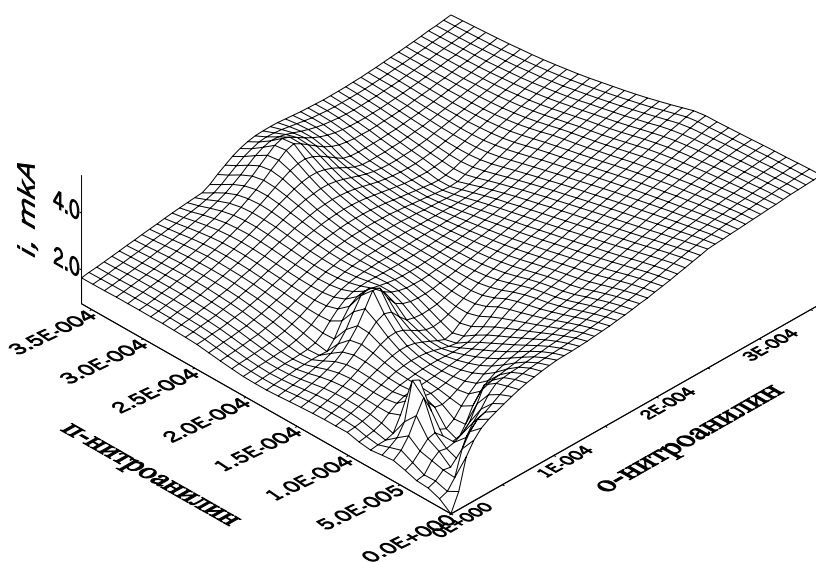
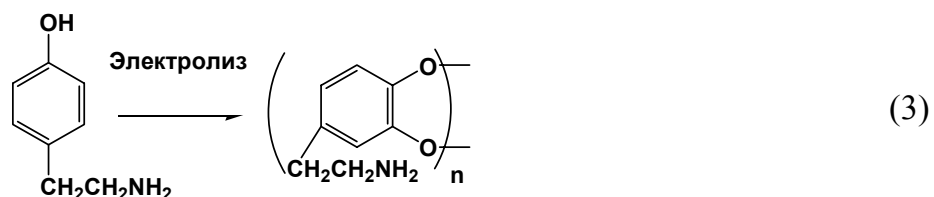


Рисунок 8. Моделирование сигнала пероксидазного сенсора в смеси *p*- и *o*-нитроанилина по 50 экспериментальным значениям отклика. Программа Surfer.

Реконструкция сигнала путем интерполяции экспериментальных значений в программе Surfer показала, что максимумы проявляются при кратных соотношениях концентраций субстратов, что, возможно, связано с ростом длины олигомерных продуктов окисления, проявляющих свойства медиаторов электронного переноса.

Биферментный сенсор на основе электрода, модифицированного политирамином. Учитывая потенциальное применение холинэстеразных и пероксидазных сенсоров для контроля определенных групп загрязнителей сточных вод, представляло интерес совместить на одном электроде оба фермента. С этой целью нами был разработан способ модификации электрода новой матрицей – политирамином (3), содержащим свободные аминогруппы в боковой цепи заместителей. Полимер получали электрохимически при многократном циклировании потенциала электрода в растворе тирамина в слабокислой среде. После

этого его обрабатывали глутаровым альдегидом и последовательно наносили ферменты.



Контроль характеристик покрытия осуществлялся путем подбора скорости развертки потенциала и количества циклов. Обратимость электродных реакций и вклад диффузионного торможения переноса вещества на границе электрод/полимер/раствор контролировали по току окисления гидрохинона.

Полученный сенсор позволял проводить определение субстратов и эффекторов пероксидазы и холинэстеразы, при этом выходной сигнал не зависел от последовательности измерений и их числа. Таким образом, пероксидаза и холинэстераза в поверхностном слое не влияли друг на друга, и выбор отклика проводили путем наложения соответствующего потенциала и введения в раствор того или иного субстрата.

Чтобы уменьшить погрешность измерения, связанную с необходимостью корректировать рН раствора, не совпадающего для указанных ферментов, сигнал биферментного сенсора измеряли при компромиссном значении рН 7.0, когда активность обоих иммобилизованных ферментов была достаточна для надежного измерения отклика.

Нанесение на электрод политирамина стабилизировало активность ферментов, особенно по сравнению с немодифицированным моноферментным пероксидазным сенсором (рис.9).

В то же время, покрытие политирамина несколько снижало рабочие токи и перечень определяемых субстратов пероксидазы по сравнению с моноферментным сенсором. Так, не было обнаружено сигналов пероксидазного окисления анилина, *n*-хлоранилина, *n*-аминопиридина и *n*-нитроанилина. Заметно возросли пределы обнаружения других субстратов, снизились наклоны градуировочных зависимостей (рис.10).

Чувствительность биферментного сенсора к ингибиторам БУХЭ оказалась несколько ниже, чем для нативного фермента и моноферментного сенсора. Для кумафоса и хлорпирифос-метила степень ингибирования I,%, БУХЭ линейно зависит от логарифма концентрации (4), диапазон определяемых концентраций достаточно узок: 0.2-0.8 мкМ для кумафоса и 0.07-3.0 мкМ для хлорпирифос-метила.

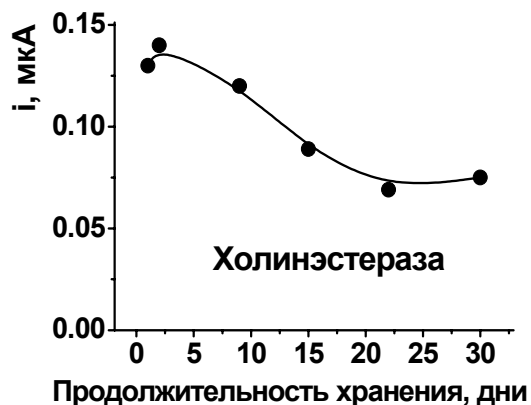
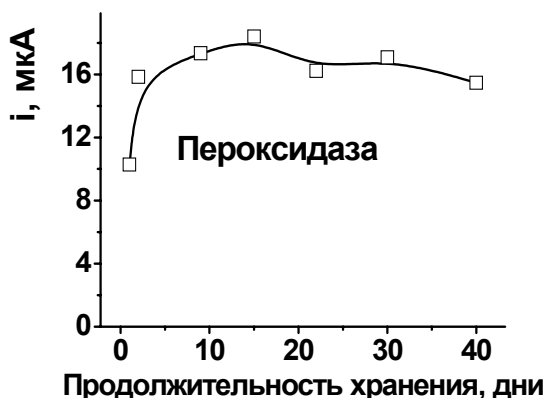


Рисунок 9. Изменение сигнала биферментного сенсора при его хранении в фосфатном буферном растворе. Измерение активности пероксидазы: гидрохинон 1.0 мМ, пероксид водорода 1.0 мМ; измерение активности БУХЭ: АТХХ 3.0 мМ.

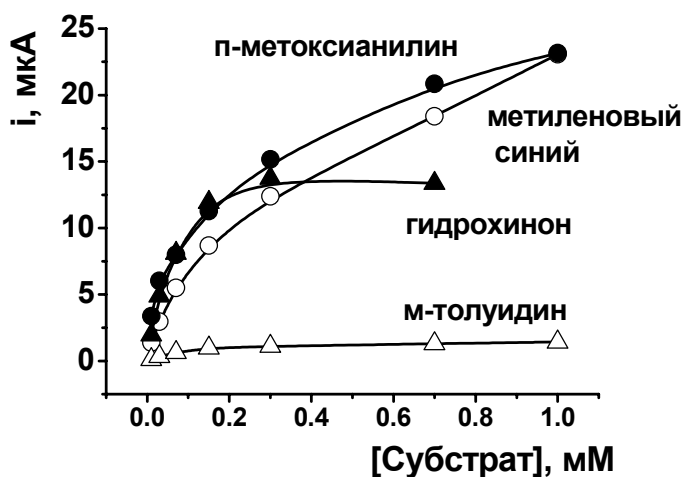


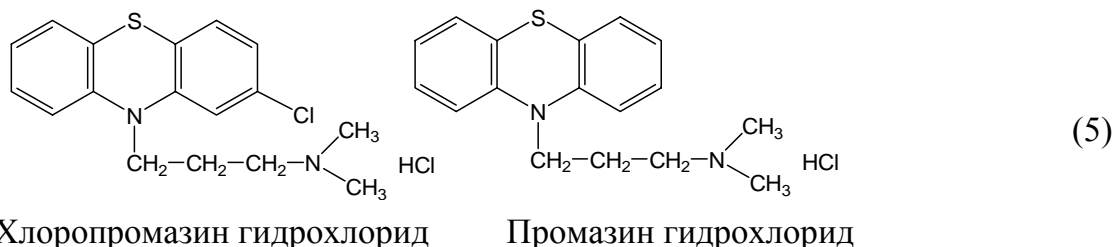
Рисунок 10. Зависимость сигнала биферментного сенсора от концентрации субстратов пероксидазы. Пероксид водорода 1.0 мМ.

Кумафос: $I, \% = 349 \pm 17 + (53 \pm 3) \times \lg(C_1, M)$, $r = 0.9939$, $n = 6$ (4)

Хлорпирифос-метил: $I, \% = (242 \pm 13) + (31 \pm 2) \times \lg(C_1, M)$, $r = 0.9917$, $n = 6$

Тем не менее, несмотря на некоторую потерю чувствительности определения субстратов и ингибиторов ферментов, использование политирамина в качестве матрицы для иммобилизации ферментов показало ряд преимуществ: высокую технологичность нанесения и возможность осаждения полимера из среды, не снижающей ферментативную активность; достижение высокой стабильности иммобилизованных ферментов: при хранении; использование единого формата измерения активности различных ферментов, иммобилизованных на едином носителе при отсутствии взаимного влияния условий измерения и эффектов "памяти" при смене субстрата.

Определение промазина и хлоропромазина.^{*)} К числу субстратов пероксидазы относятся производные фенотиазина, в том числе лекарственные препараты промазин и хлоропромазин (5). Они необратимо окисляются на графитовых электродах в области +600 мВ.

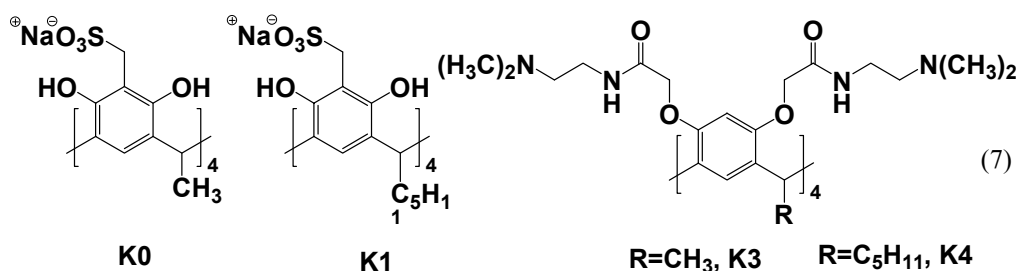


Для снижения рабочего потенциала сенсора было предложено модифицировать электрод полианилином, получаемым на поверхности путем многократного циклирования потенциала в 0.2 М серной кислоте. На модифицированном электроде удалось снизить рабочие потенциалы до +400 мВ. Пределы обнаружения промазина и хлоропромазина составили 3-5 мкМ, ур.(6).

Промазин: $i, \text{ мкА} = (0.10 \pm 0.03) + (2.12 \pm 0.08) \times (C, \text{ мМ})$ $R = 0.9959, n=8$ (6)

Хлоропромазин: $i, \text{ мкА} = (0.07 \pm 0.02) + (1.63 \pm 0.06) \times (C, \text{ мМ})$ $R = 0.9964, n=8$

На пероксидажном сенсоре на основе электрода, модифицированного полианилином, регистрировали токи восстановления продуктов ферментативного окисления промазина и хлоропромазина. Для повышения чувствительности определения были изучены производные каликс[4]резорциноларена (7), образующие с изученными соединениями комплекс "гость-хозяин".



Добавление каликс[4]резорциноларенов в раствор снижало сигнал пероксидазного окисления хлоропромазина (рис.11). Введение каликсаренов в состав поверхностного слоя не привело к заметному увеличению аналитического сигнала. Но комплексообразование проявляется при регистрации медиаторного переноса электрона на пероксидазу. Биокаталитический ток на электроде, модифицированном полианилином и каликсареном, наблюдается при введении в раствор пероксида водорода в отсутствие органических субстратов при 0.0 В.

^{*)} Исследование частично проводили в лаборатории электрохимии университета г.Нант, Франция (зав.лабораторией др.М.Буйтита (M.Vujtita))

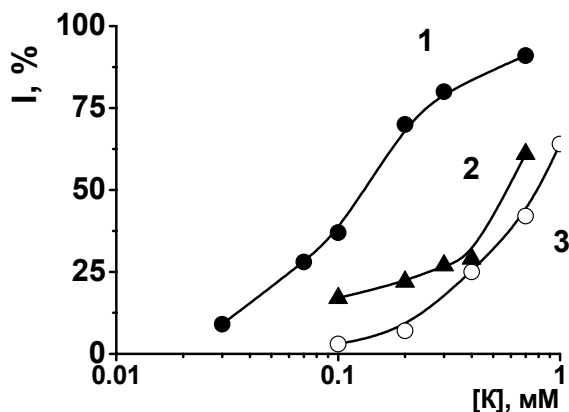


Рисунок 11. Влияние каликс[4]резорциноларенов К1 (1), К3 (2) и К4 (3) на сигнал пероксидазного сенсора на основе планарного эпоксиграфитового электрода. Хлоропромазин 0.7 мМ, H_2O_2 1.0 мМ

Если электрод инкубировать 10 мин в растворе промазина или хлоропромазина, наблюдается увеличение сигнала, особенно заметное в области малых концентраций пероксида водорода. По-видимому, влияние фенотиазинов можно отнести к их включению в медиаторный перенос электрона с активного центра фермента на электрод, протекающий в слое полианилина.

Иммуносенсоры с пероксидазной индикаторной реакцией. Чувствительность сигнала пероксидазного сенсора к поверхностным процессам позволила предложить вариант иммуносенсора, не требующий конъюгации определяемого компонента с индикаторным ферментом. Для этого проводили совместную иммобилизацию пероксидазы и специфических антител и регистрировали активность фермента (сигнал на специфический субстрат) как меру концентрации иммунореагента, присутствующего в растворе.

На рис.12. представлена зависимость сигнала иммуносенсора от концентрации цефтазида и его аналога - цефиксима. В наномолярном диапазоне концентраций наблюдается прогрессирующее снижение сигнала пероксидазного окисления гидрохинона. По-видимому, комплекс антиген-антитело замедляет ферментативный процесс за счет стерического блокирования иммобилизованного фермента либо в результате аллостерической регуляции его активности.

Иммуносенсор позволяет проводить определение цефтазида в диапазоне его концентраций от 0.3 до 1 нМ. Для аналога цефтазида - цефиксима - уменьшение сигнала иммуносенсора происходит при концентрациях гаптена, 100-1000 раз превосходящих концентрации цефтазида. Еще выше действующие концентрации сульфонамидных препаратов. При включении в состав поверхностного слоя антител против нонилфенола использование гидрохинона в качестве субстрата ферментативной реакции оказалось невозможным. По-видимому, за счет взаимодействия с антителами происходило увеличение сигнала иммуносенсора в серии повторных измерений из одного раствора субстрата.

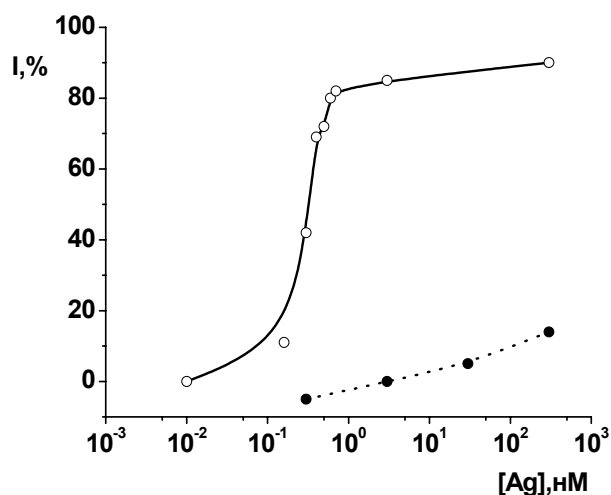


Рисунок 12. Определение цефтазидима с помощью иммуносенсора, на основе антител против цефтазидима. Пунктиром обозначен сигнал иммуносенсора на цефиксим

Среди других потенциальных субстратов пероксидазы был выбран метиленовый синий. Зависимость тока его восстановления окисленной формы метиленового синего от концентрации нонилфенола имеет сигмоидный вид (рис.13).

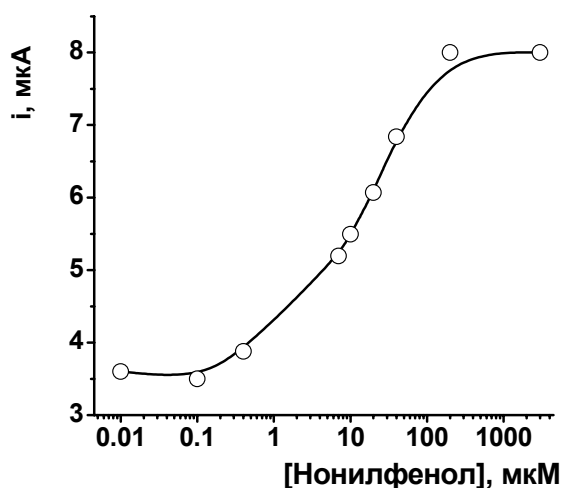


Рисунок 13. Влияние нонилфенола на сигнал иммуносенсора на основе антител против нонилфенола и пероксидазной индикаторной реакции. Метиленовый синий 2.0 мкМ

Линейный участок кривой отвечает диапазону концентраций 1×10^{-7} - 2×10^{-4} М. Чувствительность определения нонилфенола с помощью иммуносенсора с пероксидазной индикаторной реакцией согласуется с аналитическими характеристиками других вариантов иммуноанализа, в том числе с использованием аналогичных антител. Таким образом, предлагаемый способ регистрации иммунных взаимодействий носит универсальный характер и может быть использован в сочетании с антителами к различным гаптенам.

ВЫВОДЫ

1. Обосновано использование модификации графитовых электродов как способа улучшения операционных и аналитических характеристик ферментных сенсоров на основе пероксидазы и холинэстеразы для определения специфических субстра-

тов и ингибиторов. Установлено влияние условий иммобилизации и состава иммобилизационной среды на сигнал биосенсоров и их устойчивость при хранении и эксплуатации.

2. Покрытие электродов нафтоном и полипирролидином, а также включение в состав поверхностного слоя альбумина увеличивают время жизни и воспроизводимость сигнала ферментных сенсоров, в том числе при хранении в сухом виде и при иммобилизации ферментов на едином носителе. Разработанные сенсоры могут быть использованы для определения окисляющихся ароматических соединений, фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в микро- и наномолярном диапазоне концентраций, соответственно.

3. Предложен новый способ регистрации сигнала холинэстеразного сенсора при модификации печатного графитового электрода берлинской лазурью, отличающийся низким рабочим напряжением измерения сигнала, быстрым и устойчивым откликом и высокой чувствительностью в отношении ингибиторов фермента.

4. Разработаны методики определения остаточных количеств пестицидов антихолинэстеразного действия в растительной продукции, а также контроля разложения пестицидов в процессе сбраживания виноградного сока.

5. Изучение влияния полианилина и катекин[4]резорциноларенов на окисление промазина и хлоропромазина на модифицированном полимером электроде и пероксидазном сенсоре выявило вклад образования комплексов "гость-хозяин" в процесс медиаторного переноса электрона и формирование аналитического сигнала. Разработан метод определения указанных препаратов с пределами обнаружения 3 и 5 мкМ, соответственно.

6. Совместная иммобилизация пероксидазы и специфических антител против цефтазидима и нонилфенола позволяет регистрировать иммунные реакции на поверхности сенсора за счет изменений аллостерической регуляции активности фермента или стерического контроля доступа субстрата к ферменту. Пределы обнаружения цефтазидима и нонилфенола составили 0.1 нМ и 1 мкМ, соответственно. Оценена селективность сигнала иммуносенсора на цефтазидим в присутствии антибиотиков сульфонамидного и цефаллоспоринового ряда.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Габсабиров Р.Р. Экспресс-оценка органического загрязнения с помощью пероксидазного сенсора / Р.Р.Габсабиров, Е.В.Супрун, Г.А.Евтюгин, Г.К. Будников //Поволжская конференция по аналитической химии. Тез.докл. Казань, 20-22 ноября 2001 г. С.58.
2. Будников Г.К. Обобщенная оценка загрязнения сточных вод на основе пероксидазных и холинэстеразных одноразовых сенсоров / Г.К.Будников, Е.В.Супрун,

- Р.Р.Габсабирова, Г.А.Евтюгин, Ж.-Л.Марти, В.Г.Винтер //Всероссийский симпозиум "Тест-методы химического анализа". Москва, 28-30 ноября 2001 г. С64.
3. Гоголь Э.В. Определение остаточных количеств пестицидов в растительном материале с помощью планарных холинэстеразных сенсоров, модифицированных нафтоном / Э.В.Гоголь, Г.А.Евтюгин, Е.В.Супрун, Г.К.Будников, В.Г.Винтер // Журн.аналит.химии. 2001.- Т.56, № 10.- С.1097-1105.
 4. Евтюгин Г.А. Одноразовые амперометрические биосенсоры в эколого-аналитическом контроле / Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Иванов А.Н., Супрун Е.В // Микросистемная техника. 2001. №7.- С.56-59.
 5. Супрун Е.В. Оценка загрязнения сточных вод с помощью комбинированных ферментных сенсоров на основе печатных углеродных электродов / Е.В.Супрун, Р.Р.Габсабирова, Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников //Всерос. конф. "Актуальные проблемы аналитической химии". Москва, 11-15 марта 2002 г. М. Т.2. С.168-169.
 6. Suprun E.V. Bi-enzyme amperometric sensors for the monitoring of environmental pollution / E.V.Suprun, R.R.Gabsabirova, G.A.Evtugyn, H.C.Budnikov // Euroanalysis 12. Dortmund Sept.8-13. 2002. Book of Abstracts. P. 308.
 7. Стойкова Е.Е. ДНК-сенсоры с электрохимически активными индикаторами - производными фенотиазина / Стойкова Е.Е., Гольдфарб О.Э., Белякова С.В., Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Супрун Е.В. // Вестник ТО РЭА.- 2003.- Т.3.- С.51-55.
 8. Супрун Е. В. Пероксидазные сенсоры на основе модифицированных графитовых материалов / Е. В. Супрун, О. Э. Гольдфарб, С. В. Белякова, Р. Р. Габсабирова // III Научн.конф. мол. ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века. Тез.докл. Казань, 14-15 февраля 2003 г. С.83.
 9. Budnikov H.C. Phenothiazine derivatives as electrochemical indicators for DNA sensors / H.C.Budnikov, O.E.Goldfarb, S.V.Beljakova, G.A.Evtugyn, E.V.Suprun, A.V.Porfirjeva, V.G.Vinter // 17 Intern. Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Florence, Italy, June 19-24, 2003.- P.198.
 10. Suprun E.V. Two-enzyme sensors based on screen-printed carbon electrodes covered with electropolymerised tyramine / E.V.Suprun, H.C.Budnikov, G.A.Evtugyn // 7 Intern. Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Florence, Italy, June 19-24, 2003. P.199.
 11. Suprun E.V. Bi-enzyme sensor based on thick-film carbon electrode modified with electropolymerized tyramine / E.V.Suprun, H.C.Budnikov, G.A.Evtugyn, Kh.Z.Brainina // Bioelectrochemistry.- 2004.- V.63.- P.281-284.
 12. Suprun E. Prussian Blue modified acetylcholinesterase sensor for the detection of organophosphorus and carbamate pesticides / E.Suprun, G.Evtugyn, H.Budnikov, F.Ricci, D.Moscone, G.Palleschi // 8th Intern. Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry, Book of Abstracts July 8-10, 2004. P.40-41.
 13. Евтюгин Г.А. Амперометрические иммуносенсоры для определения сульфаметоксазола и цефтазидима / Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников, С.А.Еремин, Е.В.Супрун, А.Р.Исмаилова // Всерос.конф. "Аналитика России" 27 сентября - 1 октября 2004 г. С.193.