

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИСТЕМЫ ДВУХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ ПЕСТИЦИДОВ

Р.М. Варламова, Э.П. Медянцева, Г.Р. Сахапова, Г.К. Будников

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Химический институт
им. А.М. Бутлерова, кафедра аналитической химии
420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.18
Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Поступила в редакцию 18 февраля 2013 г.,
после исправлений – 23 апреля 2013 г.

Для определения гербицидов триазинового ряда предложена система двух амперометрических биосенсоров на единой подложке на основе иммобилизованных ферментов – холинэстеразы и цистеиндесульфгидразы. Основой биосенсоров служило устройство, состоящее из 4 печатных электродов, на рабочую поверхность которых из платиносодержащей пасты иммобилизуется холинэстераза и цистеиндесульфгидраза. На примере пропазина показана возможность и оценены аналитические характеристики определения триазиновых гербицидов с помощью предлагаемой системы биосенсоров. Линейная зависимость между величиной тока и концентрацией пропазина наблюдается в интервалах концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л для холинэстеразного и $1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л для цистеиндесульфгидразного биосенсоров с погрешностью (S_r) не более 0.057. Нижняя граница определяемых концентраций для пропазина составляет $9 \cdot 10^{-11}$ моль/л для холинэстеразного и $7 \cdot 10^{-11}$ моль/л для ЦДГ биосенсоров.

Ключевые слова: биосенсор, холинэстераза, цистеиндесульфгидраза, платиновые screen-printed электроды, триазиновые гербициды.

Варламова Регина Марковна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) Федерального университета.

Область научных интересов: амперометрические биосенсоры, иммунохимический анализ, анализ объектов окружающей среды, пищевых продуктов, лекарственных препаратов.

Автор 30 опубликованных работ.

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) Федерального университета.

Область научных интересов: электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биосенсоры, электрокаталитические процессы, иммунохимический анализ.

Автор более 160 опубликованных работ.

Сахапова Гулина Ришатовна – студент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) Федерального университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор, академик МАНВШ, член-корреспондент РАЕН, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электрохимические методы анализа, биосенсоры, модифицированные электроды, экоаналитический контроль.

Автор более 800 опубликованных работ.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ литературных данных показывает, что методы количественного определения пестицидов постоянно находятся в поле зрения исследователей. В то же время все существующие методы их определения имеют определенные недостатки:

сложная пробоподготовка образцов, трудоемкость, высокие требования к квалификации персонала и значительная стоимость применяемого оборудования. Все это в полной мере относится, например, к наиболее распространенным методам идентификации пестицидов – различным вариан-

там хроматографии [1-3]. Один из путей решения этой проблемы – использование для определения таких веществ биосенсоров и иммуносенсоров [4, 5]. Возможность пестицидов по-разному влиять на ферменты, в плане активирующей или ингибирующей способности, позволяют оценить изменения каталитической активности ферментов под их действием, что может дать необходимую информацию об их содержании в исследуемых объектах, в том числе почвах, водах, продуктах питания.

В связи с этим определенные преимущества (доступность биологического материала, дешевизна и т.д.) могут иметь биосенсоры на основе тканей растений и животных [6]. Возможность в настоящее время получать системы планарных сенсоров на основе печатных технологий – еще один шаг в направлении развития более совершенных методов анализа.

Использование системы многоэлектродных биосенсоров, в частности биосенсоров на основе разных иммобилизованных ферментов, объединенных на одной подложке – один из современных подходов для решения задач открытия из одной пробы нескольких соединений или более надежного определения отдельного соединения.

Цель работы – оценить аналитические возможности определения некоторых биологически активных веществ (на примере пропазина как представителя гербицидов триазинового ряда) с помощью системы из двух амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованных холинэстеразы и цистеиндесульфгидразы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Основой холинэстеразных и цистеиндесульфгидразных биосенсоров служила система, состоящая из 4 рабочих электродов на основе платиносодержащей пасты, объединенных на единой керамической подложке (рис. 1, фирма BVT

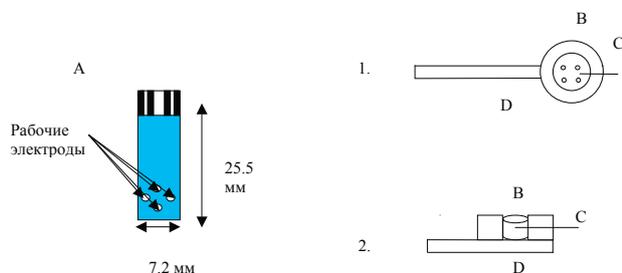


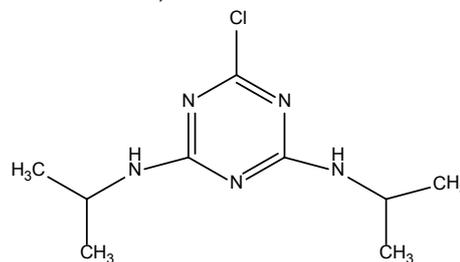
Рис. 1. Печатный электрод, являющийся основой биосенсоров (4 рабочие поверхности, компании BVT Technologies, Чехия): А. 1 - биосенсор с ячейкой, вид сверху; 2 – биосенсор с ячейкой, вид сбоку; В – ячейка; С - серебряный электрод сравнения; D – общий вид биосенсора с ячейкой

Technologies, Брно, Чехия). Электрод сравнения, изготовленный из серебра, входил в состав ячейки для измерения. Объем рабочей ячейки составлял 200 мкл. Для предварительных испытаний использовали одноэлектродную систему, состоящую из рабочей (платиносодержащая паста) поверхности, вспомогательного электрода (платина) и электрода сравнения (серебро), изготовленную той же фирмой. Все измерения с использованием этих электродов проводятся с помощью многоцелевого электрохимического детектора «МЕВ» с компьютеризированным управлением, обеспечивающим последовательное включение каждого биосенсора из 4-электродной системы.

В качестве субстратов использовали бутирилхолин хлорид (**БТХХ**) и L- цистеин (Sigma, Австралия), растворы которых готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более трех часов. Применяли бутирилхолинэстеразу (**ХЭ**) сыворотки крови лошади, активностью 30 АЕ/мг, изготовленную НПО «Биомед» (Россия, г. Пермь). Для получения чувствительной части цистеиндесульфгидразных биосенсоров использовали гомогенат из проростков зерновых культур или листьев огурца, как источник L-цистеиндесульфгидразы (**ЦДГ**) [6-8]. В качестве консерванта применяли сахарозу.

Использовали 1 %-й раствор глутарового альдегида фирмы «ICN» (Великобритания) как бифункциональный реагент для кросс-сшивки биологических препаратов и бычий сывороточный альбумин (**БСА**) фирмы «Reanal» (Венгрия) в качестве матричного материала для иммобилизации ферментов.

Использовали стандартный образец пропазина (0.1 мг/см³, ФГУП Уральский научно-исследовательский институт метрологии ГНУ НИИ РЕАКТИВ, Россия):



Пропазин (2-хлор-4,6-бис (изопропиламино)-симметриазин)

Водные растворы пропазина готовили путем их растворения в небольшом количестве этанола, а затем в бидистиллированной воде.

Применяли фосфатный (pH = 7.6 ± 0.05) буферный раствор. Значения pH водных растворов определяли pH-метром pH - 150, со стеклянным

электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

Получение гомогената из проростков пшеницы

Зерновую культуру (овес, пшеницу) выращивали из семени в почве для рассады. Высаживали на глубину 1.5-2 см. В теплице поддерживался постоянный режим: относительная влажность 60-70 %, температура воздуха 20-25 °С, освещенность 10 клк, фотопериод 14 ч.

Для приготовления гомогената растительный материал мелко нарезали и растирали пестиком в вымороженной ступке, заливали 0.1 М фосфатным буферным раствором с pH = 7.6 в соотношении 1 : 3, процеживали суспензию через двойной марлевый слой и добавляли 0.5 М раствор сахарозы [8, 9]. Полученный гомогенат использовали для получения биочувствительного слоя сенсоров.

Изготовление холинэстеразного и цистеиндесульфгидразного биосенсоров на основе планарных платиновых электродов

Для получения биочувствительной части сенсоров на поверхность рабочего электрода наносили ХЭ сыворотки крови лошади или гомогенат из проростков пшеницы, содержащий ЦДГ. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента с концентрацией 20 нкат/мкл или раствор гомогената (10 мкл), раствор БСА (50 мг/мл), фосфатный буфер (50 мМ, pH = 7.0), 100 мкл дистиллированной воды и 1 %-й раствор глутарового альдегида. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь, и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставлялись на ночь в закрытой чашке Петри при $t = +4$ °С. На следующий день их промывали водой, оставляли для высушивания на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

Используемую систему биосенсоров получали нанесением на две рабочие поверхности электродов смесь компонентов, содержащую ХЭ, а на две другие – смесь на основе раствора гомогената из проростков пшеницы.

Обработка экспериментальных результатов

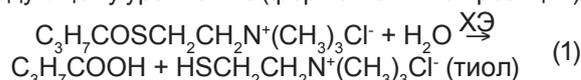
Процент (степень) ингибирования рассчитывали как отношение величины тока в присутствии эффектора (I_p) к току в отсутствие эффектора (I_0):
% ингибирования = $(I_p / I_0) \cdot 100$ %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка аналитических возможностей холинэстеразного и цистеиндесульфгидразного биосенсоров в определении некоторых гербицидов

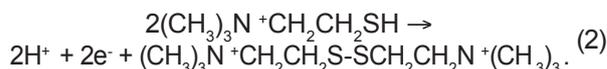
Природа формирования аналитического сигнала холинэстеразного биосенсора

Известно, что ХЭ катализирует реакцию гидролиза тиохолиновых эфиров [10]. Один из специфичных субстратов бутирилхолинэстеразы – БТХХ – подвергается холинэстеразному гидролизу по следующему уравнению (ферментативная реакция)



Продукт ферментативной реакции – тиол – электрохимически активен.

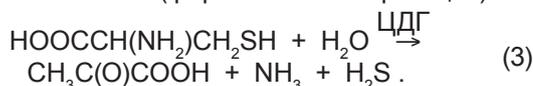
На печатном платиносодержащем электроде тиол подвергается процессу электроокисления (электрохимическая реакция)



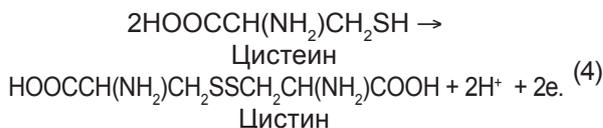
Наибольшее значение тока наблюдается при потенциале +0.55 В. Ток окисления, регистрируемый в потенциостатическом режиме, достигал постоянного значения через 2 мин. Величину этого стабилизировавшегося отклика биосенсора использовали в качестве аналитического сигнала.

Природа формирования аналитического сигнала цистеиндесульфгидразного биосенсора

Цистотионин- γ -лиаза (цистиндесульфгидраза) – фермент класса лиаз, содержащийся, согласно литературным данным, в растительном материале огурца [7]. В состав его активного центра входит пиридоксальфосфат. Фермент катализирует распад L-цистеина с образованием пировиноградной кислоты, аммиака и сероводорода, а также распад L-цистина с образованием тиоцистеина, пировиноградной кислоты и аммиака (ферментативная реакция)



Изучение электрохимического поведения цистеина на платиновом планарном электроде показало, что на фоне фосфатного буферного раствора с pH = 7.6 наблюдается пик при потенциале 0.70 В, который относится к окислению цистеина до цистина (реакция 4 – реакция электроокисления)



Величина наблюдаемого аналитического сигнала зависит от концентрации цистеина в интервале $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Несмотря на то, что в составе гомогената может содержаться несколько растительных ферментов, цистеин служит субстратом только для цистеиндесульфгидразы и поэтому все изменения величины тока окисления цистеина относятся только к процессам, связанным с влиянием эффекторов на систему L-цистеин-L-цистеиндесульфгидраза. Установлено, что удобный для измерения аналитический сигнал, наблюдается при использовании концентрации цистеина $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 2).

В литературе имеются сведения [7, 8] о наличии L-цистеиндесульфгидразы в листьях огурца. Однако нами было экспериментально установлено, что достаточное количество L-цистеиндесульфгидразы содержится и в проростках зерновых культур – пшеницы, овса. В то же для получения проростков зерновых культур требуется гораздо меньше времени, чем получение третьего и четвертого листьев огурца, пригодных для получения соответствующего фермента. Поэтому в работе использовали гомогенат, полученный из проростков пшеницы. Стандартизация условий получения проростков пшеницы обеспечивает воспроизводимость значений каталитической активности фермента в пределах погрешности не более 2-3 %.

Использование системы двух биосенсоров для определения гербицида пропазина

Для решения задач совместного определения из одной пробы нескольких соединений и более надежного открытия отдельного соединения в сложной по составу смеси перспективно в настоящее время использование многоэлектродных биосенсоров, в частности биосенсоров на единой подложке, на основе нескольких иммобилизованных ферментов.

Первоначально была исследована возможность определения пропазина индивидуальными биосенсорами: холинэстеразным и цистеиндесульфгидразным. Ранее было показано, что триазиновые гербициды (атразин, симазин) можно определять с помощью холинэстеразного биосенсора [9, 10].

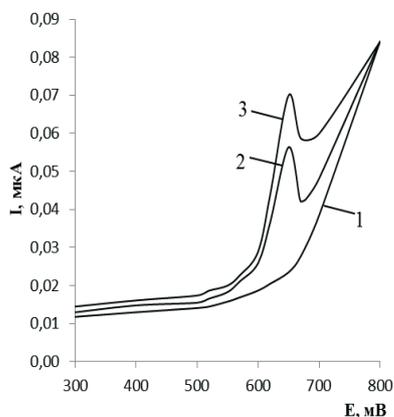


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления раствора $1 \cdot 10^{-3}$ М цистеина на фоне фосфатного буферного раствора с pH = 7.6 (1), в присутствии ЦДГ (2) и в отсутствии ЦДГ (3) проростков пшеницы

Изученное ранее действие гербицидов атразина и симазина на иммобилизованную холинэстеразу (ИХЭ), входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора на основе печатных платиновых электродов показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение величины аналитического сигнала при потенциале +0.55 В, т.е. эти гербициды оказывают ингибирующее действие в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л для атразина и $1 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-12}$ моль/л для симазина [10, 11].

Эффект неспецифического ингибирования, возможно, связан с взаимодействием молекул гербицида с гидрофобными участками, расположенными вблизи активного центра фермента и, как следствие, со стерическими препятствиями для подхода молекул субстрата к активному центру фермента.

Действие же триазиновых гербицидов на цистеиндесульфгидразу ранее не рассматривалось. Сведения о влиянии других эффекторов, за исключением ионов металлов – свинца и кадмия [8, 12], на каталитическую активность данного фермента в литературе также отсутствуют. Единичные упоминания о практическом использовании этого фермента относятся к количественному определению субстрата (L-цистеина) или с помощью амперометрического [12] или потенциометрического, чувствительного к изменению сульфид-ионов (ион-селективный электрод с мембраной из сульфида серебра) [13], биосенсоров.

На вольтамперограммах электроокисления раствора цистеина на платиновом электроде без иммобилизованной ЦДГ наблюдается пик при потенциале 0.7 В (рис. 2, крив. 1), причем ток в этом случае имеет наибольшее значение, по сравнению с другими случаями. В присутствии же иммобилизованной ЦДГ (при использовании соответствующего биосенсора) наблюдается меньшее значение тока (рис.2, крив. 3) по сравнению со значением тока окисления цистеина при том же потенциале в отсутствие иммобилизованного фермента. Это связано с тем, что часть субстрата распадается под действием фермента (см. реакцию (3)). Это наименьшее значение тока, которое может наблюдаться при использовании цистеиндесульфгидразного биосенсора в отсутствие ингибиторов фермента. В присутствии же пропазина наблюдается ток (крив. 2), меньший по величине тока окисления цистеина по сравнению с присутствием в растворе только одного иммобилизованного фермента. Это указывает на ингибирующее действие пропазина на иммобилизованную ЦДГ при потенциале 0.7 В.

Установлено, что пропазин оказывает ингибирующее действие не только на ИХЭ, но и на иммобилизованную ЦДГ в составе соответствующего биосенсора в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л. Это связано с тем, что пропазин, очевидно, может оказывать влияние на катали-

Таблица 1

Аналитические возможности системы биосенсоров – холинэстеразного и цистеиндесульфгидразного – в определении пропазина

| Биосенсор | Область рабочих концентраций, моль/л | Уравнение градуировочной зависимости | | | % ингибирования |
|-----------|--------------------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | | $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$ | $A \pm \delta$ | $(B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$ | |
| ХЭ | $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-10}$ | (9.9 ± 0.9) | $(2.2 \pm 0.2) \cdot (-\lg C)$ | 0.9974 | $(50.0 \pm 0.5) - (70.0 \pm 0.8)$ |
| ЦДГ | $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-10}$ | (17.0 ± 1.0) | $(3.4 \pm 0.2) \cdot (-\lg C)$ | 0.9950 | $(55.0 \pm 0.6) - (76.0 \pm 0.8)$ |

тическую активность ЦДГ, влияя на протекание реакции ферментативного превращения (реакция (3)). При этом количество цистеина, способного к электроокислению, уменьшается за счет действия остаточной каталитической активности фермента после действия ингибитора, что отражается в уменьшении величины аналитического сигнала. Эффект ингибирования, возможно, связан с взаимодействием молекулы пропазина с гидрофобными участками, расположенными вблизи активного центра фермента и, как следствие, с возникающими стерическими препятствиями для подхода молекул субстрата к активному центру фермента.

Проведенные исследования показали, что для определения пропазина оптимальным является использование фосфатного буферного раствора с pH = 7.5. Исследовано влияние pH на величину отклика биферментного сенсора в фосфатных буферных растворах (50 мМ) в диапазоне значений pH от 6.5 до 8.0. Установлено, что иммобилизованные ферменты (ХЭ и ЦДГ) при pH = 7.5 ± 0.05 проявляют достаточную активность в отсутствие гербицида именно в слабощелочной среде. При этом pH наблюдается достаточная активность как иммобилизованной ХЭ, так и ЦДГ, также это значение pH входит в соответствующий диапазон pH химической устойчивости триазиновых гербицидов.

Установлено, что максимальный аналитический сигнал, наблюдаемый на электродах 4-х электродной системы биосенсоров, достигается через 8-10 мин. Именно это время необходимо для инкубации раствора пропазина с соответствующими биосенсорами.

Рассмотрена возможность использования системы из четырех амперометрических биосенсоров на основе двух иммобилизованных ферментов разных классов: цистеиндесульфгидразы и холинэстеразы для чувствительного и надежного определения пропазина в пробах.

Изучение действия пропазина на систему рассматриваемых амперометрических биосенсоров показало, что в его присутствии наблюдаются практически те же процессы, что и при использовании индивидуальных биосенсоров, т.е. обратимое неспецифическое ингибирование, выражающееся в уменьшении (ИХЭ) или увеличении (ИЦДГ) величины аналитического сигнала по сравнению с действием самого фермента в отсутствие эффектора. Установлено, что нижняя граница определяемых содержаний C_n составляет в этих условиях $9 \cdot 10^{-11}$ моль/л для холинэстеразного и $7 \cdot 10^{-11}$ моль/л для цистеиндесульфгидразного биосенсоров.

Градуировочная зависимость между током и концентрацией пропазина для ХЭ сенсора в составе многоэлектродной системы выражается уравнением:

$$I = (9.9 \pm 0.9) + (2.2 \pm 0.2) \cdot (-\lg C), r = 0.9974,$$

для ЦДГ сенсора: $I = (17.0 \pm 1.0) + (3.4 \pm 0.2) \cdot (-\lg C), r = 0.9950.$

Градуировочные зависимости между током и концентрацией пропазина для холинэстеразного и цистеиндесульфгидразного биосенсоров в составе многоэлектродной системы приведены в табл. 1.

Аналитические характеристики холинэстеразного и цистеиндесульфгидразного биосенсоров представлены в табл. 1.

Полученные результаты показывают, что коэффициенты чувствительности для обоих биосенсоров практически одинаковы, хотя ингибирующий эффект наблюдается в более широкой области концентраций пропазина и выражен несколько более сильнее для иммобилизованной ЦДГ.

Правильность определения пропазина в указанных диапазонах концентраций с помощью системы двух биосенсоров оценена способом «введено-найдено» (табл. 2).

Таблица 2

Результаты определения пропазина с помощью биферментного сенсора ($n = 6, P = 0.95$)

| Биосенсор | Введено, моль/л | Найдено, моль/л | S_r |
|-----------|-------------------|-------------------------------|-------|
| ХЭ | $5 \cdot 10^{-7}$ | $(4.8 \pm 0.1) \cdot 10^{-7}$ | 0.039 |
| | $5 \cdot 10^{-8}$ | $(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ | 0.042 |
| | $7 \cdot 10^{-9}$ | $(6.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$ | 0.057 |
| ЦДГ | $5 \cdot 10^{-7}$ | $(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ | 0.040 |
| | $3 \cdot 10^{-8}$ | $(3.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ | 0.031 |
| | $5 \cdot 10^{-9}$ | $(5.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$ | 0.057 |

Определение пропазина в пищевых продуктах холинэстеразным и цистеиндисульфгидразным биосенсорами в составе многоэлектродной системы

Пестициды триазинового ряда являются одними из наиболее эффективных и потому широко применяемых гербицидов. В России триазиновые гербициды разрешены к использованию, в основном, только на посевах кукурузы, но спектр сельскохозяйственных культур, на посевах которых они применяются во всем мире, довольно широк – овощи, фрукты, ягоды и т.д. В то же время ПДК пропазина, установленные для этих пищевых продуктов, довольно низкие: для хозяйственно-питьевых вод – 2 мкг/дм³, для зерновых – 0.2 мг/кг, в моркови его содержание не допускается. Такие жесткие требования обусловлены тем, что пропазин характеризуется длительным периодом сохранения своих свойств в почве [14, 15].

Для определения пропазина были разработаны методики его определения в соке с предварительным разбавлением образцов в 10 раз. Данная процедура проводилась для того, чтобы уменьшить возможные влияния матричных компонентов.

Методом «введено-найденно» (табл. 3) установлено, что определение гербицидов триазинового ряда в образцах сока возможно с использованием градуировочных графиков, полученным для его определения в воде. Это говорит о том, что в исследуемых условиях влияние матричных компонентов образца практически не сказывается. В качестве модельных образцов использовали виноградный сок с введенными в определенной концентрации триазиновыми гербицидами. Модельные образцы были приготовлены на основе стерилизованных соков «Я» (г. Лебедянь, Липецкая область) и соков «Добрый» (г. Щелково, Московская область), изготовленных из концентрированного виноградного

сока. Используемые соки, согласно материалам аттестации, не содержали триазиновых гербицидов.

Методика определения

Определение пропазина с помощью системы двух биосенсоров можно проводить двумя способами.

А) В ячейку на 200 мкл с холинэстеразным и цистеиндисульфгидразным биосенсорами вносили последовательно тот или иной субстрат (БТХХ или цистеин), чтобы его концентрация в ячейке составляла $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, фосфатный буферный раствор (178-196 мкл) и 20-2 мкл раствора сока. Измеряли значение тока при потенциале 0.55 В или 0.7 В соответственно.

Б) В ячейку на 200 мкл с холинэстеразным и цистеиндисульфгидразным биосенсорами вносили сначала субстрат ХЭ – БТХХ, чтобы его концентрация в ячейке составляла $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, фосфатный буферный раствор (178-196 мкл) и 20-2 мкл раствора сока. Измеряли значение тока при потенциале 0.55 В.

Затем в этот же раствор вносили 2 мкл раствора цистеина с концентрацией 0.1 моль/л – субстрата ЦДГ, чтобы концентрация в ячейке была такой, как и в первом случае, и через 10 мин измеряли значение тока при потенциале 0.7 В соответственно.

Следует отметить, что в присутствии второго субстрата аналитический сигнал окисления цистеина выражен менее четко, поскольку в этом случае имеет место влияние диффузионного шлейфа от сигнала окисления тиола - продукта ферментативного превращения БТХХ.

Полученные в рамках этой работы результаты показывают, что использование системы из нескольких электродов на единой подложке как основы биосенсоров может быть успешно использовано для определения триазиновых гербицидов. В то же время такие многоэлектродные биосенсоры позволяют повысить надежность определения искомым компонентов.

Таблица 3

Определение пропазина в виноградных соках с помощью биферментного сенсора ($n = 6$, $P = 0.95$)

| Виноградный сок | Биосенсор | Введено, моль/л | Найдено, моль/л | S_r |
|-----------------|-----------|-------------------|-------------------------------|-------|
| «Я» | ХЭ | $7 \cdot 10^{-7}$ | $(6.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ | 0.029 |
| | | $5 \cdot 10^{-8}$ | $(5.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ | 0.055 |
| | | $3 \cdot 10^{-9}$ | $(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$ | 0.084 |
| | ЦДГ | $7 \cdot 10^{-7}$ | $(6.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-7}$ | 0.014 |
| | | $5 \cdot 10^{-8}$ | $(5.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ | 0.057 |
| | | $3 \cdot 10^{-9}$ | $(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$ | 0.064 |
| «Добрый» | ХЭ | $7 \cdot 10^{-7}$ | $(6.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ | 0.030 |
| | | $5 \cdot 10^{-8}$ | $(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ | 0.042 |
| | | $3 \cdot 10^{-9}$ | $(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$ | 0.090 |
| | ЦДГ | $7 \cdot 10^{-7}$ | $(7.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ | 0.027 |
| | | $5 \cdot 10^{-8}$ | $(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ | 0.041 |
| | | $3 \cdot 10^{-9}$ | $(2.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$ | 0.071 |

Применение материалов растительных тканей в качестве биочувствительной части биосенсоров, т.е. гомогенатов, содержащих интересующий нас в плане биохимической реакции фермент, имеет определенные преимущества. Ткани растений можно использовать практически почти без обработки [8]. Вообще в тканях находится множество ферментов и поэтому по сравнению с очищенными препаратами они не столь специфичны. В то же время ферменты в тканях находятся в естественном для них окружении и поэтому более устойчивы. В связи с этим срок эксплуатации таких биосенсоров больше. Действительно, срок хранения гомогената практически без потери каталитической активности ЦДГ (контроль осуществляли по величине тока окисления субстрата при одной и той же его концентрации в одних и тех же условиях), составляет практически несколько месяцев (не менее двух). Ткани растений более дешевы, чем очищенные ферменты. Благодаря естественному окружению, ферменты в них меньше подвержены инактивации под действием pH, температуры и других факторов.

Следует отметить, что согласно предыдущим исследованиям [10-12], предлагаемые биосенсоры можно использовать и для определения других гербицидов триазинового ряда. Кроме того, благодаря высокой чувствительности определения такие биосенсоры весьма выгодно использовать для скрининговых исследований, а также в качестве детектирующего устройства при тест-определениях, основанных на определении пропазина после его, например, иммунохимического выделения и концентрирования [12, 16].

ВЫВОДЫ

Впервые отмечено ингибирующее действие пропазина как представителя гербицидов сим-1,3,5-триазинового ряда, на каталитическую активность L-цистеиндесульфгидразы в широком диапазоне концентраций.

Предложена система амперометрических биосенсоров на основе двух иммобилизованных ферментов – холинэстеразы и цистеиндесульфгидразы – для определения пропазина.

Подобраны условия функционирования предлагаемых биосенсоров: фосфатный буферный раствор с $\text{pH} = 7.5 \pm 0.05$, время отклика биосенсоров 8-10 мин, потенциал регистрации аналитических сигналов – для холинэстеразного биосенсора +0.55 В, для цистеиндесульфгидразного биосенсора +0.7 В.

Область линейной зависимости между величиной тока и концентрацией пропазина (ингибирующий эффект) для системы биосенсоров наблюдается в области концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-10}$ для холинэстеразного и $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л для цистеиндесульфгидразного биосенсоров. C_n (пропазина) составляет $9 \cdot 10^{-11}$ моль/л для холинэстеразного и $7 \cdot 10^{-11}$ моль/л для ЦДГ биосенсоров.

Показана возможность определения пропазина в соках с помощью разработанного биферментного сенсора.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (проект № 13-03-01101-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dömötöröva M., Matisova E. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1207, № 1-2. P. 1-16.
2. Search on ruggedness of fast gas chromatography–mass spectrometry in pesticide residues analysis / M. Kirchner et [al.] // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1084, № 1-2. P. 63-70.
3. Koesukwiwat U., Lehotay S.J., Leepipatpiboon N. Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218, № 39. P. 7039-7050.
4. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor / N.F. Starodub et [al.] // Anal. Chim. Acta. 2000. V. 424. P. 37-43.
5. Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bienzyme immunoassay / B.B. Dzantiev et [al.] // Sens. Actuat. B. 2004. V. 98. P. 254-261.
6. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры: Пер. с англ. М.: Техносфера, 2005. 336 с.
7. Биосенсоры: основы и приложения / [Под ред. Э.Тернера]: Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 614 с.
8. Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis / O. Fatibello-Filho et [al.] // Compr. Anal. Chem. 2006. V. 49, № 17. P. 357-377.
9. Амперометрический биосенсор на основе листьев огурца в определении свинца и кадмия / Н.В. Кремлева и [др.] // Ж. аналит. химии. 1999. Т. 54, № 2. С. 166-170.
10. Иммунохимический анализ гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора / Э.П. Медянцева и [др.] // Агрехимия. 2000. № 3. С. 72-80.
11. Иммуноэкстракция остаточных количеств пестицидов различных классов с амперометрическим детектированием / Н.Ю. Ильичева и [др.] // Ж. аналит. химии. 2003. Т. 58, № 7. С. 718-719.
12. Применение тканей растений для оценки загрязненности почвы некоторыми тяжелыми металлами / Н.В. Кремлева и [др.] // Вест. Российск. акад. сельскохозяйствен. наук. 1997. № 6. С. 52-54.
13. Hassan S.S.M., El-Baz F.A., Abd-Rabboh H.S.M. A novel potentiometric biosensor for selective L-cysteine determination using L-cysteine-desulfhydrase producing *Trichosporon jirovecii* yeast cells coupled with sulfide electrode // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 602. P. 108-113.

14. Санитарно-гигиенические методы исследования пищевых продуктов и воды: Справочное пособие / [Под ред. Г.С. Яцулы]. Киев: Здоровье, 1991. 288 с.
15. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ: Справочное издание. Приложение к журналу «Защита и карантин растений». М. 2002. № 6. 392 с.

16. Иммуноэкстракционное концентрирование и определение симазина как представителя гербицидов группы сим-1,3,5 – триазинов / Э.П. Медянцева и [др.] // Ж. прикл. химии. 2005. Т. 78. Вып. 7. С. 1122-1126.

ANALYTICAL CAPABILITIES OF THE ARRAY OF TWO AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF SOME PESTICIDES

R.M. Varlamova, E.P. Medyantseva, G.R. Sahapova, H.C. Budnikov

*Kazan (Volga Region) Federal University
Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry
420008, Kazan, Kremlin street, 18
Elvina.Medyantseva@ksu.ru*

The array of two amperometric biosensors based on the immobilized enzymes cholinesterase and cysteindesulfgidrase was proposed for the determination of triazine herbicides. The array is composed of 4 screen-printed electrodes made of platinum paste with the immobilized cholinesterase and cysteindesulfgidrase. The analytical characteristics of the determination of triazine herbicide propazine using the proposed biosensing system are evaluated. The linear concentration range is $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-10}$ mol/l for cholinesterase and $1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-10}$ mol/l for cysteindesulfgidrase biosensor, and RSD does not exceed 0.057. Lower limit of detection for propazine is $9 \cdot 10^{-11}$ mol/l for cholinesterase and $7 \cdot 10^{-11}$ mol / l for cysteindesulfgidrase biosensors.

Key words: biosensor, cholinesterase, cysteindesulphhydrase, platinum screen-printed electrodes, triazine herbicides.