

УДК 57.042.2 : 57.083.3

## Экспресс-тестовые методы определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров

Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин

*ГЕРМАН КОНСТАНТИНОВИЧ БУДНИКОВ — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: электрохимические методы анализа, создание биосенсоров для контроля биологически активных веществ.*

*ГЕННАДИЙ АРТУРОВИЧ ЕВТЮГИН — доктор химических наук, доцент, профессор кафедры прикладной экологии Казанского государственного университета. Область научных интересов: биохимическая диагностика загрязнения окружающей среды, электрохимические биосенсоры для эколого-аналитического контроля.*

420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет,  
E-mail Herman.Budnikov@ksu.ru, Gennady.Evtugyn@ksu.ru

### Ферментативные методы анализа в экологическом контроле

В современных условиях постоянно растущего антропогенного пресса на окружающую среду тестовые методы анализа занимают промежуточную нишу между индикаторными и количественными методами определения токсикантов, позволяя быстро оценить потенциально опасные уровни загрязнения для человека и биосферы в целом. Тем самым тест-методы заполняют тот разрыв, который возник между потребностью в информации и возможностью ее реального получения в силу постоянно растущего перечня контролируемых компонентов и ужесточения требований к их минимально определяемым содержаниям.

Ферментативные методы анализа как нельзя больше подходят для решения задач экспресс-диагностики загрязнения. С одной стороны, они могут рассматриваться как простейшие модели токсикации организма *in vitro*, с другой — в отличие от традиционных методов биохимического анализа они допускают количественное измерение и более объективную интерпретацию результатов, в том числе благодаря опоре на стандартное измерительное оборудование [1, 2]. С этой точки зрения ферменты могут рассматриваться как высокочувствительные органические реагенты, позволяющие в ряде случаев достичь предела обнаружения

токсикантов на уровне  $n \cdot (10^{-9} - 10^{-10})$  моль/л [3]. Все это определяет благоприятные перспективы применения ферментативных методов анализа в эколого-аналитическом контроле.

Тем не менее, практическое использование ферментативных методов контроля объектов окружающей среды на сегодняшний день остается весьма ограниченным. Помимо отсутствия нормативной базы их применения это связано с проблемами стабильности аналитического сигнала и низкой селективности определения ингибиторов, особенно в многокомпонентных средах.

В отличие от субстратных биосенсоров (определяемый компонент — субстрат фермента), успешно применяемых в медицине, фармацевтике, биотехнологии [4, 5], ингибиторные биосенсоры оставляют широкое поле для исследования взаимодействий в системе субстрат—эффектор—иммобилизованный фермент. Гетерогенный характер реакций, протекающих в данной системе, влияние процессов массопереноса вещества, существенно осложняют теоретическое описание закономерностей формирования сигнала. В случае эколого-аналитического контроля окружающей среды поведение ингибиторных биосенсоров дополнительно осложняется переменным составом объектов контроля, наличием многократных избытков природных эффекторов, синергическим и/или

антагонистическим действием нескольких ингибиторов, присутствующих в пробе и т.д. Как результат к середине 1990-х годов публикуемые работы в области ингибиторных биосенсоров в основном сводились к определению отдельных веществ-загрязнителей в модельных растворах, без учета влияния компонентов матрицы объекта контроля. Аналитические характеристики определения ингибиторов при этом различались в десятки раз даже в случае близких условий проведения ингибирования и измерения аналитического сигнала. Сформировалось направление, ориентированное на применение стандартных методов разделения ингибиторов, реализуемых, например, в хроматографическом анализе. Тем самым снижаются одни из основных преимуществ ферментативных тест-методов – простота и экспрессность измерения.

Дальнейшее развитие биосенсорных методов определения токсикантов настоятельно требует развернутых сравнительных исследований, которые позволили бы выделить вклад в формирование сигнала составляющей, обусловленной гетерогенностью индикаторной реакции, и установить факторы, влияющие на чувствительность и селективность определения ингибиторов с помощью биосенсоров на основе иммобилизованных ферментов. Такие исследования были начаты в цикле работ группы Казанского государственного университета. В рамках этой работы развиваются биосенсорные методы применительно к анализу токсикантов, ингибирующих ферменты из класса гидролаз (фосфорорганические пестициды, амины, ионы тяжелых металлов).

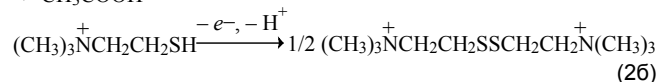
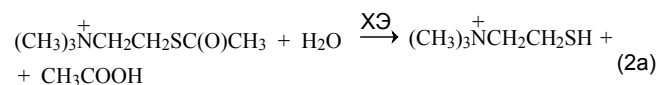
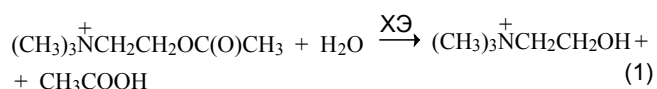
### Объекты исследования

Из гидролитических ферментов с целью создания биосенсоров были изучены коммерческие препараты ацетил- и бутирилхолинэстеразы из различных источников и различной удельной активности, а также препараты микробальной карбоксилэстеразы, щелочной фосфатазы, иммобилизованные на мембранах из нейлона (Hybond, Sartorius), нитрата целлюлозы (Sartorius), чертежной кальки, нанесенные непосредственно на поверхности измерительных сенсоров в пленках альбумина, желатина, тринитрата целлюлозы и без носителя. Иммобилизацию проводили кросс-сшивкой глутаровым альдегидом (в растворе и в парах). Модификацию получаемых ферментсодержащих мембран осуществляли разработанным нами методом послойной иммобилизации. Суть его состоит в последовательном закреплении на носителе слоев фермента, модификатора, субстрата фермента, ионообменных материалов с закреплением каждого такого слоя по отдельности. Поскольку условия иммобилизации для слоев могут различаться, такой методический прием позволяет значительно разнообразить состав и свойства получаемых мембран. Так, удалось модифицировать

мембраны модификаторами, не растворимыми в воде, например калликсаренами [6], путем их осаждения из органических растворителей.

Из других компонентов исследуемой индикаторной системы использовали стандартные наборы субстратов гидролитических ферментов (эфиры холина и тиохолина, инофенилацетат и *п*-нитрофенилфосфат) и их ингибиторов (фосфорорганические и карбаминатные пестициды, ионы тяжелых металлов, поверхностно-активные вещества).

В качестве преобразователей биохимического сигнала были использованы различные потенциометрические и амперометрические детекторы — стеклянный и сурьмяный pH-метрические электроды, эпоксидно-углеродные и металлические электроды. Аналитическим сигналом – откликом биосенсора служил максимальный сдвиг потенциала или тока окисления, регистрируемый после добавления субстрата. Так, для холинэстераз (ХЭ) — основного объекта исследований откликом биосенсора является количество кислоты, выделяющейся в ферментативной реакции гидролиза субстрата (ацетилхолина), или ток окисления тиохолина:



Всего разработано свыше 20 различных конструкций биосенсора, различающихся способом включения фермента, методом регистрации ферментной активности и геометрией электродов. Часть разработанных биосенсоров была также испытана в проточно-инжекционных условиях для оценки влияния нестационарного распределения компонентов реакций на характеристики определения ингибиторов.

Для оценки влияния гетерогенных факторов проводились сравнительные исследования в гомогенных условиях с теми же препаратами ферментов, стабилизированных включением в твердые водорастворимые пленки полисахаридов (N-фталилхитазан, полиглюкин, β-декстран). Мерой ферментативной активности служила скорость выделения кислоты, измеряемая потенциометрически или фотометрически.

Разработанные биосенсоры и предложенные методики пробоподготовки и измерения уровня загрязнения были испытаны при тестировании реальных объектов окружающей среды – природных (Волго-Ахтубинская пойма) и сточных вод, почв, осадков сточных вод.

## Выбор условий иммобилизации ферментов

Основное внимание в исследованиях поведения ингибиторных биосенсоров уделялось изучению влияния гетерогенных факторов (изменение субстрат-ингибиторной специфичности фермента в процессе его иммобилизации, влияние микроокружения фермента в мембране, торможение массопереноса реагентов в мембране, сорбционные эффекты) на аналитические характеристики определения ингибиторов различного механизма действия. Ингибирующее действие оценивали по относительному уменьшению сигнала биосенсора

(степени ингибирования).

Тионовые фосфорорганические пестициды (метафос, корал, карбофос и др.), проявляющие относительно слабое антихолинэстеразное действие, перед измерением окисляли до кислородных аналогов. С этой целью использовали оригинальную методику косвенного электрохимического окисления в гальваностатическом электролизере в присутствии избытка хлорида натрия [7]. В результате такой обработки ингибирующее действие тионовых пестицидов усиливается в 1000—10000 раз.

В табл. 1 приведены некоторые характеристики

Таблица 1

### Характеристики метода определения фосфорорганических пестицидов с помощью потенциометрических биосенсоров на основе бутирилхолинэстеразы, иммобилизованной без носителя, в пленке и на накладных мембранах.

Для сравнения приведены данные для реакции с ферментом карбоксилэстераза в растворе

Пестицид	Носитель фермента	Предел обнаружения, моль/л	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	$k_{II}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>
Диазинон	—	$2 \cdot 10^{-8}$	$3,5 \cdot 10^{-8} - 2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^6$
	Бумага	$1 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9} - 6 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^6$
	Нейлон	$2 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9} - 6 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^6$
	Нитрат целлюлозы	$1 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-9} - 5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^7$
	Желатин	$1 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9} - 6 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^6$
Карбоксилэстераза в растворе		$3 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-7}$	
Фозалон	—	$9,5 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-8} - 7 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^6$
	Бумага	$2 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{6x}$
	Нейлон	$4 \cdot 10^{-9}$	$7 \cdot 10^{-9} - 4 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^6$
	Нитрат целлюлозы	$7 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^8$
	Желатин	$5 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^6$
Карбоксилэстераза в растворе		$2 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-7} - 7 \cdot 10^{-7}$	
Дихлорфос (ДДВФ)	—	$4 \cdot 10^{-7}$	$5,5 \cdot 10^{-7} - 4,5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^5$
	Бумага	$5 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^4$
	Нейлон	$2 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^4$
	Нитрат целлюлозы	$9 \cdot 10^{-8}$	$4,5 \cdot 10^{-7} - 9 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^5$
	Желатин	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^4$
Карбоксилэстераза в растворе		$3,5 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6} - 8,5 \cdot 10^{-6}$	
Метафос	—	$9,5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^5$
	Бумага	$1 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8} - 2 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^5$
	Нейлон	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8} - 6 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^5$
	Нитрат целлюлозы	$5 \cdot 10^{-9}$	$9 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^6$
	Желатин	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^6$
Карбоксилэстераза в растворе		$1,5 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	
Корал	—	$4 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-7}$	$7,5 \cdot 10^5$
	Бумага	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^5$
	Нейлон	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^6$
	Нитрат целлюлозы	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-7} - 3 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^6$
	Желатин	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^6$
Карбоксилэстераза в растворе		$7 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-5}$	

Примечание:  $k_{II}$  — бимолекулярная константа ингибирования, рассчитанная по изменению отклика биосенсора.

метода определения фосфорорганических пестицидов с помощью потенциометрических биосенсоров с накладными мембранами на основе коммерческих носителей. Для сравнения в ней же приведены характеристики, полученные с нативными ферментами. Как видно, применение в качестве носителя нитрата целлюлозы и в ряде случаев нейлона приводит к повышению чувствительности определения — пределы обнаружения пестицидов снижаются в 1,5—2 раза по сравнению с контролем в гомогенных условиях реакции, что позволяет в ряде случаев надежно идентифицировать токсикант. Природа фермента и материал мембраны влияют также на наклон градуировочного графика. Так, чувствительность холинэстеразного определения карбофоса, оцениваемая по наклону градуировочной зависимости, в 26 раз выше, а хлорофоса — в 24 раза ниже, чем при использовании микробальной карбоксилэстеразы. По тому же показателю чувствительность определения корала выше на нейлоновых мембранах, дихлорфоса — на нитратцеллюлозных, а чувствительность определения метафоса вообще не зависит от природы носителя фермента [8].

Биосенсоры обеспечивают контроль фосфорорганических пестицидов на уровне 0,1—5 ПДК, найденные пределы обнаружения пестицидов находятся в хорошем соответствии с их относительной токсичностью, выражаемой ПДК:

фозалон < диазинон < карбофос < метафос < хлорофос.

Прямое нанесение ферментов на поверхности

электродов без носителя незначительно меняет аналитические характеристики метода определения ингибиторов по сравнению с реакцией с использованием нативных ферментов. В аналитической практике это считается дополнительным преимуществом биосенсоров, поскольку в этом случае изменение сигнала (отклика биосенсора) прямо соотносится с состоянием биологической мишени — фермента, взаимодействующего с ингибитором [9—11]. Однако такие биосенсоры отличаются низкой селективностью по отношению к ингибиторам, что свойственно ферментативным методам анализа в целом. Кроме того, наличие на поверхности биосенсоров сверхтонких пленок существенно сокращает возможности варьирования аналитических характеристик данного метода определения загрязнителей окружающей среды. Ухудшаются операционные характеристики биосенсоров (сокращается время хранения биосенсоров без снижения ферментативной активности, возрастает погрешность измерения отклика, увеличивается дрейф сигнала при хранении и использовании). В результате даже в оптимальных условиях время жизни подобных биосенсоров не превосходит несколько недель по сравнению с 6—10 месяцами для накладных холинэстеразных мембран.

Нами предложены различные способы модификации (табл. 2), позволяющие существенно улучшить аналитические и операционные характеристики биосенсоров с иммобилизованными ферментами. Модификаторы наносятся на поверх-

Таблица 2

Модификаторы поверхности холинэстеразных биосенсоров

Модификатор	Влияние на операционные характеристики	Влияние на аналитические характеристики	Механизм действия	Ссылка
Каликсарены, каликсрезорциноларены	Снижение потенциометрического отклика на субстрат на 30—15%, увеличение длительной стабильности отклика	Расширение круга определяемых веществ: детектирование холина, бензойной кислоты, глицина по относительному снижению отклика биосенсора	Изменение проницаемости мембраны и ее заряда вследствие образования комплекса типа «гость-хозяин»	[6, 12]
Альбумин	Увеличение потенциометрического отклика на субстрат на 10—20% и времени отклика на 30—50%	Увеличение чувствительности и селективности определения фосфорорганических пестицидов в присутствии неорганических эффекторов холинэстеразы (фториды, ионы металлов)	Торможение переноса продуктов ферментативной реакции из мембраны в раствор	[13]
Нафион	Снижение амперометрического отклика на субстрат на 15—25%, увеличение длительной стабильности отклика, снижение рабочего потенциала	Увеличение чувствительности определения и снижение предела обнаружения фосфорорганических пестицидов	Ионообменное концентрирование электроактивных продуктов ферментативной реакции на поверхности	[14]
Полианилин	Увеличение потенциометрического отклика на 40—80%	Увеличение чувствительности определения и снижение предела обнаружения фосфорорганических пестицидов	Торможение переноса продуктов ферментативной реакции из мембраны в раствор	[15]

ность электрода совместно с ферментом или на сформированный ферментсодержащий слой.

Установлены два механизма действия модификатора. Первый механизм включает влияние модификатора на процессы массопереноса реагентов на границе мембрана/раствор. За счет электростатических взаимодействий (в случае модификаторов нафийон, полианилин) или торможения диффузии (альбумин) происходит накопление продуктов ферментативной реакции (кислоты для потенциометрического детектирования и тиохолина для амперометрических сенсоров) непосредственно на поверхности электрода. Благодаря этому достигается усиление относительно небольших сдвигов потенциала или тока окисления при действии низких концентраций ингибиторов. Поэтому изменение поверхностной концентрации реагентов, т. е. отклика биосенсора, превосходит фактические изменения скорости ферментативной реакции вследствие взаимодействия с компонентами пробы. В результате модифицированные мембраны проявляют повышенную чувствительность к ингибиторам ферментов, а также отличаются улучшенными операционными характеристиками, чем в случае нанесения фермента без носителя традиционными методами. Например, использование покровных сверхтонких слоев альбумина повышает в 1,5—2,0 раза абсолютные значения отклика биосенсоров при сохранении или некотором увеличении наклона градуировочной зависимости (биосенсоры на основе сурьмяного рН-метрического и планарного эпоксидно-углеродного электрода). Покровные слои модификаторов способствуют стабилизации активности фермента при хранении и эксплуатации биосенсоров. Так, биосенсоры, модифицированные нафийоном, сохраняли 50% исходной активности иммобилизованного фермента при хранении в сухом состоянии в течение более 8 месяцев при 4 °С и до двух месяцев — при хранении в условиях комнатной температуры.

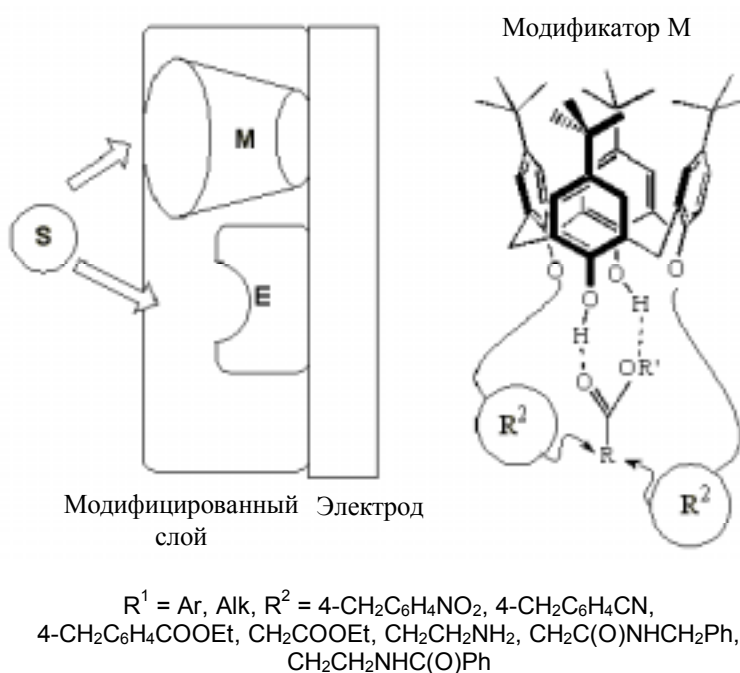
Второй механизм реализуется при использовании в качестве модификаторов каликсаренов. В этом случае в мембране помимо иммобилизованного фермента появляется второй центр связывания, который взаимодействует либо с субстратом фермента (эфиры холина), либо с эффектором. В результате такого взаимодействия меняется микроокружение фермента и как следствие его активность. Например, взаимодействие каликс[4]резорциноларена с холином или органическими аминами приводит к формированию положительного заряда на поверхности ферментсодержащей мембраны. Как результат происходит торможение переноса одноименно заряженного субстрата и снижение отклика биосенсора, формально соответствующего

обратимому конкурентному ингибированию [6].

Аналогичным образом при образовании на поверхности комплексов каликсаренов с ионами серебра или меди удается снизить потенциал окисления тиохолина — продукта холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина. Взаимодействие с модификатором приводит к селективному концентрированию электрохимически активных компонентов на поверхности электрода, что выражается в увеличении абсолютной величины сигнала и некотором уменьшении рабочего потенциала измерения амперометрического отклика холинэстеразного биосенсора.

Варьируя заместители в структуре каликсарена, можно менять прочность его связывания и как следствие — перечень определяемых соединений. Так, 1,3-дизамещенные каликс[4]арены, содержащие в нижнем ободе заместители с эфирными, амидными и аминогруппами, способны координировать субстраты холинэстеразы (рис. 1). В результате наблюдается конкурентное ингибирование нативного и в меньшей степени иммобилизованного фермента. Вещества, конкурирующие с субстратами фермента за центр связывания каликсарена (бензойная и щавелевая кислоты, глицин), снимают ингибирующее действие модификатора. Подобный эффект можно использовать для высокочувствительного определения ряда органических кислот и их эфиров.

Разработанные способы модификации иммобилизованного фермента открывают широкие возможности изменения свойств поверхности электрохимических биосенсоров, что позволяет направленно варьировать селективность и чувствительность определения как традиционных специ-



**Рис. 1.** Схема, иллюстрирующая конкурентное взаимодействие субстрата (S) с каликсареном (M) и ферментом (E) в мембране, сформированной на поверхности электрохимического сенсора

фических ингибиторов холинэстеразы (пестициды, соли тяжелых металлов, фториды), так и веществ, непосредственно не действующих на активность фермента.

### Кинетика ингибирования и массоперенос реагентов

Знание кинетики ингибирования иммобилизованных ферментов является важным инструментом оптимизации условий определения ингибиторов, поскольку позволяет судить об относительном вкладе стадий массопереноса и о возможном влиянии диффузии компонентов пробы. Применительно к определению субстратов теория функционирования биосенсоров разработана детально [16, 17]. В то же время оценка кинетических параметров ингибирования проведена лишь для биосенсоров с высокоактивными сверхтонкими ферментсодержащими мембранами, когда диффузионным торможением переноса реагентов можно пренебречь [18, 19]. Что касается биосенсоров с накладными ферментсодержащими мембранами, то для них определение параметров ингибирования представляет особый интерес, поскольку в этом случае влияние диффузионных процессов на экспериментально определяемые параметры ингибирования несомненно. Это выражается в первую очередь в отклонении поведения биосенсоров от уравнения Олдриджа [20], описывающего, в частности, необратимое ингибирование холинэстеразы фосфорорганическими соединениями:

$$\ln(v_0/v_t) = k_{II} C_I \tau$$

где  $v_0$  и  $v_t$  — начальные скорости ферментативной реакции до и после контакта фермента с ингибитором, соответственно;  $C_I$  — концентрация ингибитора;  $\tau$  — продолжительность взаимодействия фермента и ингибитора (стадии инкубирования).

Градуировочная кривая определения фосфорорганических пестицидов имеет S-образный характер. Это объясняется следующим образом. По мере увеличения концентрации пестицида его ингибирующее действие растет медленнее, чем это следует из уравнения Олдриджа, что может быть связано с компенсирующим влиянием замедленности массопереноса. Продукты ферментативного гидролиза субстрата, определяющие отклик биосенсоров, диффундируют из мембраны в раствор в соответствии с градиентом их концентрации. Ингибирование фермента ведет к уменьшению концентрационного градиента и увеличению доли продукта, остающегося в мембране. Поэтому отклик биосенсора в результате ингибирования снижается медленнее, чем скорость ферментативной реакции.

Подтверждением данного механизма является то обстоятельство, что градуировочные графики определения пестицидов линеаризуются в коорди-

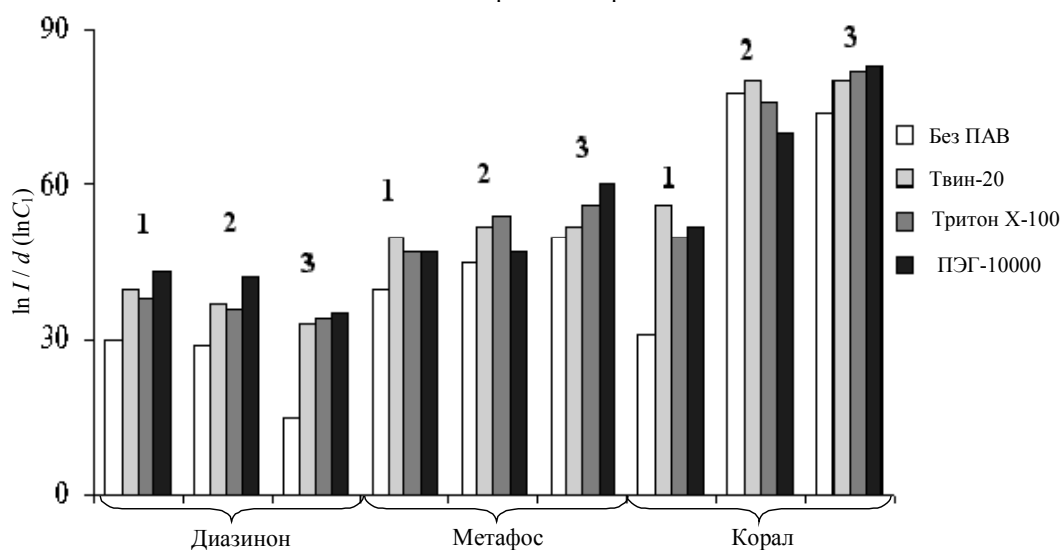
натах Олдриджа  $C_I - \ln 100/(100 - I)$  (где  $I$  — относительное изменение отклика биосенсора в %) только для малых концентраций ингибиторов ( $I \leq 30\%$ ), когда условия массопереноса реагентов можно считать постоянными.

Как показали модельные эксперименты с нативными ферментами, градуировочные зависимости в координатах Олдриджа определения пестицидов позволяют достаточно точно рассчитать константы ингибирования по величине угла наклона начального линейного участка. Полученные экспериментальные значения  $k_{II}$ , приведенные в табл. 1, совпадают с данными независимых спектрофотометрических измерений. Наблюдаемое увеличение экспериментальных значений констант ингибирования в случае иммобилизации холинэстеразы на нейлоне и нитрате целлюлозы обусловлено дополнительным неспецифическим сорбционным накоплением гидрофобных и плохо растворимых в воде фосфорорганических пестицидов. В подтверждение этого добавки неионогенных ПАВ (полиэтиленгликоли, Тритон X-100, Твин-20, Твин-80), усиливающие сорбционную способность носителя фермента, увеличивают чувствительность биосенсоров к действию необратимых ингибиторов (рис. 2). Напротив, действие обратимых ингибиторов — гидрофильных ионов (соли металлов, фториды) в присутствии ПАВ подавляется. Таким образом, появляется возможность повышения селективности определения различных пестицидов и дифференциации отклика в многокомпонентных средах путем варьирования природы носителя фермента и ПАВ.

Сходное влияние на определение фосфорорганических пестицидов оказывают и другие факторы, воздействующие на процесс переноса веществ на границе мембрана/раствор. Так, в присутствии насыщающих концентраций  $CCl_4$ , гидрофобизирующих поверхность мембраны, предел обнаружения фосфорорганических пестицидов снижается в 5—10 раз при сохранении или некотором уменьшении чувствительности их определения. Ацетон и этанол, смешивающиеся с водой, в концентрациях 10—20% снижают и отклик биосенсоров, и чувствительность определения пестицидов, а в больших концентрациях — необратимо инактивируют холинэстеразу. Действие полярных органических растворителей может быть частично компенсировано полисахаридами (N-фталилхитазан, крахмал, полиглюкин), добавляемыми в рабочий буферный раствор.

Для этого мы использовали проточную ячейку сверхмалого объема (30 мкл). Концентрированию способствует большое отношение площади поверхности мембраны к объему ячейки, а также условие постоянного обновления раствора пестицида в процессе его прокачки [21]. Накопление гидрофобных пестицидов на нейлоновой и нитрат

Другой способ увеличения сорбционного накопления определяемых веществ — проведение стадии инкубирования в проточном режиме.



**Рис. 2. Зависимость чувствительности определения пестицидов (наклон  $dI/d(\ln C)$  градуировочного графика) от присутствия ПАВ.**

Потенциометрический холинэстеразный биосенсор, субстрат бутирилхолин, носители фермента: 1 — бумага; 2 — нейлон; 3 — нитрат целлюлозы

целлюлозной мембранах выражается в увеличении абсолютных значений степени ингибирования (при сохранении наклона градуировочного графика) и в снижении в 2—5 раз предела обнаружения. Напротив, чувствительность к гидрофильным обратимым ингибиторам вследствие нестационарных условий массопереноса снижается. Таким образом, поточно-инъекционный режим обеспечивает повышение чувствительности определения остаточных количеств пестицидов в сложных по составу матрицах, содержащих в значительных концентрациях природные эффекторы холинэстеразы. Electrodes на основе эпоксидно-углеродных композиций с холинэстеразой, иммобилизованной на поверхность электрода совместно с альбумином, позволяют проводить измерения в постоянном потоке в течение 6—8 часов без замены ферментосодержащего слоя. Возможно также использование планарных угольно-пастовых электродов, модифицированных нафтоном или полианилином.

#### Аспекты применения биосенсоров для экологического контроля объектов окружающей среды

Разработанные биосенсоры позволяют проводить оценку загрязнения объектов окружающей среды веществами антихолинэстеразного действия. Экспресс-анализу способствует предложенный нами комплекс простых методик пробоподготовки, включающий экстракцию токсикантов органическими растворителями с последующим определением ингибирующего эффекта разбавленного

экстракта без трудоемкой и продолжительной операции испарения экстрагента. С помощью данной индикаторной системы можно быстро и эффективно тестировать присутствие остаточных количеств пестицидов в почве, зерне пшеницы, ячменя, сорго, ржи, комбикормах, салате, груше, перце на уровне 0,05—1,0 мг/кг.

Условия пробоподготовки и измерения сигнала позволяют максимально снизить влияние матрицы, в том числе «защитный эффект» эффекторов холинэстеразы. Он проявляется в уменьшении необратимого ингибирующего действия пестицидов, наблюдаемого в случае, если инкубирование проводится в присутствии эффекторов обратимого действия или субстрата [22]. Введением ПАВ и регулированием продолжительности стадий экстракции, инкубирования, электрохимического окисления можно выделить вклад необратимого ингибирования, полностью исключив мешающее влияние ионов металлов и природных ингибиторов холинэстеразы — катехоламинов и других биогенных аминов. Степень экстракции по данным ВЭЖХ составляет 75—85% для фосфорорганических и 35—70% для карбаминатных пестицидов. Разработанные методики анализа требуют небольшой объем пробы (1 г для зерна и почвы и 1 мл для природных и сточных вод) и отличаются простотой пробоподготовки и низкой себестоимостью. Биосенсоры с накладными мембранами позволяют проводить до 40 измерений антихолинэстеразной активности проб при ингибировании до 30%. Использование специфических реактиваторов холинэстеразы ТМБ-4 или ПАМ-2 полностью вос-

становливают активность фермента, что обеспечивает возможность проведения последующих измерений ингибирующего действия пестицидов без потери чувствительности определения. Для биосенсоров с ферментом, иммобилизованным на поверхности электрода, реактивация не столь важна, поэтому их целесообразнее использовать для однократного измерения ингибиторов.

Многообразие факторов, от которых зависит отклик холинэстеразных биосенсоров, позволяет находить все новые направления использования биосенсоров в системе эколого-аналитического контроля. Само изменение отклика биосенсора рассматривается как общая мера загрязнения (мера антихолинэстеразной активности) объектов контроля безотносительно его качественного и количественного состава, т.е. снижение отклика холинэстеразного биосенсора выступает в качестве обобщенного показателя уровня загрязнения, подобно показателям смертности тест-объектов в методах биотестирования [23]. Так, на основании выборки из более чем 250 проанализированных образцов сточных вод промышленных предприятий г. Казани и прикамского региона предложена экспертная система оценки загрязнения, позволяющая выделить отдельные классы сточных вод по преимущественному характеру загрязнения [24—26]. По этой системе с помощью нейросетевых методов классификации можно идентифицировать сточные воды машиностроительных предприятий, загрязненные преимущественно тяжелыми металлами, воды предприятий машиностроительного и нефтехимического комплексов, а также воды предприятий пищевой промышленности, ливневой сток, воды небольших предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции, содержащие в основном легко разлагающиеся органические соединения. Экспертная система включает обязательные показатели химического и биохимического анализа — ХПК и БПК<sub>5</sub>, результаты тестов на острую токсичность (смертность инфузорий *Paramecium caudatum* при экспозиции 1 ч), а также показатель антихолинэстеразной активности. Последний измеряют дважды — до и после электрохимической обработки пробы, что дает возможность учесть вклад легко разлагающихся загрязнителей, как правило, не оказывающих влияние на длительные последствия загрязнения. Для классификации используются искусственные нейронные сети прямого распространения и Fuzzy ART Map. Экспертная система обеспечивает получение правильного прогноза класса загрязнения на 80% при обучении на полной выборке данных и до 70% — при проверке обучения на контрольной выборке.

Аналогичным образом можно оценить загрязнение подвижными формами тяжелых металлов осадков сточных вод. В этом случае дифференциация сигнала достигается путем использования различных способов экстракции и электрохимической обработки экстрактов. Особенность данного

объекта исследования состоит в том, что влияние ионов металлов опосредуется обменными процессами с органическим веществом осадка. При этом высвобождаются природные эффекторы холинэстеразы и в результате может наблюдаться не ингибирование, а активация фермента, проявляющаяся и в гомогенных, и в гетерогенных условиях проведения реакции.

## Заключение

Развитие биосенсорных методов является наглядным примером того, как решение фундаментальных междисциплинарных проблем способствует появлению прикладных разработок, перспективных для использования в самых широких областях знания. Оптимизация конструкции биосенсоров и выявление факторов, определяющих чувствительность и селективность сигнала, потребовали изучения тонких деталей механизма функционирования биосенсоров. Выявленные закономерности, связанные с процессами массопереноса и сорбционного накопления токсикантов на полимерных мембранах, вносящими вклад в формирование аналитического сигнала, никак не связаны с природой используемого биологического материала и имеют общетеоретическое значение. Не случайно результаты исследований вызвали особый интерес со стороны зарубежных ученых, приведший к ряду совместных инициативных работ. Исследованиям по влиянию ПАВ на поведение биосенсоров посвящен целый ряд публикаций в зарубежных журналах, охватывающих в том числе имплантируемые в организм человека биосенсоры для определения глюкозы и лактата. Понимание принципов детектирования позволяет также осознанно выбирать способы модификации ферментсодержащих мембран, что ведет не только к улучшению операционных и аналитических характеристик биосенсоров, но и существенно расширяет круг определяемых соединений.

Ряд разработок, выполненных в рамках данного проекта, прошел апробацию в региональных лабораториях Минэкологии РФ, где получил положительную оценку. Можно надеяться, что при условии адекватного развития нормативной базы будут созданы предпосылки для широкого внедрения биосенсоров в область эколого-аналитического контроля.

\*\*\*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-03-33210). Исследования в этом направлении продолжаются в рамках проекта «Разработка электрохимических биосенсоров на основе планарных модифицированных электродов для диагностики загрязнения окружающей среды».



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Evans G.P., Briers M.G., Rawson D.M.* Biosensors., 1986, v. 2, № 5, p. 287—300.
2. *Rogers K.R., Gerlach C.L.* Environ. Sci. Technol., 1996, v. 30, p. 486A—491A.
3. *Michel H.O., Gordon E.C., Epstein J.* Ibid., 1973, v. 7, № 11, p. 1045—1049.
4. *Scheper T., Hitzmann B., Stark E. e. a.* Anal. Chim. Acta, 1999, v. 400, p. 121—134.
5. *Turner A.P., Chen B., Piletsky S.A.* Clin. Chem., 1999, v. 45, № 9, p. 1596—1601.
6. *Евтюгин Г.А., Муслинкина Л.А., Будников Г.К., Казакова Э.Х.* Ж. аналит. химии, 1999, т. 54, № 4, с. 418—423.
7. *Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е., Искандеров Р.Р. и др.* Там же, 1997, т. 52, № 1, с. 6—10.
8. *Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А., Искандеров Р.Р., Латыпова В.З.* Там же, 1996, т. 51, № 5, с. 561—565.
9. *Skladal P., Fiala M., Krejci J.* Inter. J. Environ. Anal. Chem., 1996, v. 65, p. 139—148.
10. *Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet P. e. a.* Sensors Materials, 1996, v. 8, № 3, p. 161—167.
11. *Palchetti I., Cagnini A., Delcarlo M. e. a.* Anal. Chim. Acta, 1997, v. 337, p. 315—321.
12. *Ivanov A.N., Stoikova E.E., Stoikov I.I. e. a.* 11 Russian-Japan Analytical Symposium on Analytical Chemistry. Moscow, 21—24 Aug. 2000, L 31.
13. *Ivanov A.N., Evtugyn G.A., Gyurcsanyi R.E. e. a.* Anal. Chim. Acta, 2000, v. 404, № 1, p. 55—65.
14. *Gogol E.V., Evtugyn G.A., Marty J.-L. e. a.* Talanta, 2000, v. 53, № 2, p. 379—389.
15. *Ivanov A.N., Evtugyn G.A., Lukachova L.V. e. a.* Analyst, 2001 (в печати).
16. *Сорочинский В.В., Курганов Б.И.* Прикл. биохим. микробиол., 1995, т. 31, № 1, с. 27—35.
17. *Решетилов А.Н.* Там же, 1996, т. 32, № 1, с. 78—93.
18. *Adeyoju O., Iwuoha E.I., Smyth M.R.* Talanta, 1994, v. 41, № 9, p. 1603—1608.
19. *Adeyoju O., Iwuoha E.I., Smyth M.R.* Electroanalysis, 1995, v. 7, № 10, p. 924—929.
20. *Aldridge W.N.* Biochem. J., 1950, v. 46, № 451—456.
21. *Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Gogol E.V. e. a.* Anal. Chim. Acta, 1999, v. 385, p. 13—21.
22. *Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е., Никольская Е.Б., Будников Г.К.* Ж. аналит. химии, 1997, т. 52, № 2, с. 188—192.
23. *Экологический мониторинг. Ч. 1. Методы биомониторинга.* Н. Новгород: Изд-во Нижегород. ун-та, 1995, 190 с.
24. *Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Stepanova N.Ju., Petrov A.M.* Environ. Radiology Applied Ecology, 1997, v. 3, № 1, p. 7—12.
25. *Евтюгин Г.А., Савельев А.А., Ризаева Е.П. и др.* Экологическая химия, 2000, т. 9, № 2, с. 106—114.
26. *Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Stoikova E.E., Budnikov H.C.* Electroanalysis, 1997, v. 9, № 14, p. 1124—1128.