

Інститут молекулярної біології та генетики
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АРХИПОВА ВАЛЕНТИНА МИКОЛАЇВНА

УДК 577.152.31+543.554+543.555

ДИСЕРТАЦІЯ
ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ
ЗАСТОСУВАННЯ ХОЛІНЕСТЕРАЗ В БІОСЕНСОРАХ

03.00.20 – Біотехнологія

091 – Біологія та біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело, під час написання тексту дисертації технології штучного інтелекту не використовувались

В.М. Архіпова

Науковий консультант Солдаткін Олексій Петрович, академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Архипова В. М. Фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» (091 – Біологія та біохімія).- Інститут молекулярної біології і генетики НАН України.- Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України.- Київ, 2025.

Представлена робота присвячена розробці фундаментальних та біотехнологічних основ аналітичного застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу. Основну увагу в роботі зосереджено на аналізі та систематизації різних варіантів біосенсорів на основі холінестераз з точки зору використання різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, а також враховуючи прикладні аспекти їхнього застосування.

Електрохімічні біосенсиори розглядаються сьогодні як успішна альтернатива традиційним методам аналізу з огляду на існуючі успіхи в розробці їх лабораторних прототипів і вихід на ринок ряду конкурентоспроможних вимірювальних приладів. Аналіз з використанням біосенсорів є більш простим і не потребує спеціальних навичок, тому орієнтований на звичайного користувача. Як інструменти експрес-скринінгу, біосенсиори можуть допомогти попередньо відібрати певне число сумнівних зразків, які надалі будуть додатково проаналізовані за допомогою традиційних методів, знижуючи таким чином загальну вартість і час аналізу.

Холінестераза – це ензим, що відповідає за функціонування нервової системи як тварин та комах, так і людей. Біосенсиори на основі холінестераз знайшли своє широке застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук різного походження, які є інгібіторами холінестераз. Увага до біосенсорів обумовлена їхніми певними перевагами перед традиційними методами аналізу. Це відсутність дорогого та громіздкого обладнання, портативність, простота, зручність, дешевизна та швидкість аналізу,

але одночасно з цим висока чутливість, відтворюваність, достатній діапазон та низька границя визначення необхідних речовин.

На сьогодні, більшість досліджень із застосування холінестераз в біосенсиориці є дещо фрагментарними і стосуються, в основному, тільки визначення органофосфорних пестицидів. В них відсутній ґрунтовний аналіз можливостей застосування різних систем перетворення сигналу, а також специфічних особливостей перетворювачів, використання холінестераз з різних джерел та методів їхньої іммобілізації, оцінки типу інгібування і реактивації холінестераз та застосування цих підходів до створення процедур визначення токсинів. Тому основні переваги застосування холінестераз як селективних елементів біосенсорів не завжди використовуються з максимальною ефективністю. До того ж тільки невелика кількість робіт стосується застосування розроблених біосенсорів на основі холінестераз для роботи з реальними зразками. Стандартною є ситуація, коли розроблені лабораторні прототипи досить добре працюють у модельних розчинах, однак при переході до аналізу реальних зразків виникають труднощі, які ускладнюють, а іноді навіть унеможливають практичне застосування створених систем.

Метою дисертаційної роботи була розробка фундаментальних та біотехнологічних основ застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

В результаті проведених досліджень науково обґрунтовано та розроблено фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу, які полягають в створенні загальної концепції мультифункціонального застосування холінестераз в біосенсорах, методики селективного аналізу токсинів різної природи завдяки використанню різних підходів до інгібування та реактивації холінестераз та детальної покрокової процедури розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз.

Розроблено дизайн та оптимізовано електрохімічні перетворювачі на основі рН-чутливих польових транзисторів та кондуктометричних металевих гребінчастих електродів, що враховували особливості роботи при електрохімічних вимірюваннях за участю холінестераз. Розроблено та виготовлено експериментальні вимірювальні системи (в тому числі портативні) різної конфігурації, вимірювальні кювети та комірки різних модифікацій для роботи з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів. Це також закладає основу для їхнього подальшого застосування з іншими ензимами як селективними елементами біосенсорів.

Розроблено, досліджено та оптимізовано метод іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів. Детально досліджено вплив модифікації поверхні на характеристики як самих перетворювачів, так і біосенсорів в цілому. Запропоновано декілька варіантів такої модифікації для покращення процедури іммобілізації, в тому числі з використанням наночастинок. Створення біосенсорів шляхом коіммобілізації холінестераз з наночастинами золота є перспективним підходом, причому даний варіант іммобілізації не поступався за ефективністю традиційній методиці іммобілізації холінестераз.

Вперше детально досліджено біохімічні параметри іммобілізованих на поверхні перетворювачів холінестераз, а саме констант Міхаеліса-Ментена та констант інгібування. Отримані величини певною мірою свідчать про відсутність значних конформаційних змін у холінестераз після процедури їхньої іммобілізації. Суттєва різниця в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсинами дозволяє адаптувати характеристики сенсорів під конкретні прикладні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази токсичними речовинами різної природи.

Вперше розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, яка повністю описує біохімічні реакції, що відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів. При цьому відповідні константи підібрані таким чином, щоб змодельований відгук максимально

співпадав з отриманим експериментально відгуком біосенсора. Ці підібрані константи були використанні в подальшому для моделювання відгуків біосенсора на додавання субстратів та інгібіторів. Використання математичного моделювання є корисним інструментом для кращого розуміння біохімічних процесів та може використовуватись для оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів. Отримані результати чисельного моделювання є особливо актуальними при роботі із токсичними речовинами та при створенні нових біосенсорів, коли біоселективний елемент є дуже дорогим чи дефіцитним.

Розроблено ряд електрохімічних біосенсорів на основі ензимів ацетил- та бутирилхолінестераза з використанням процесу інгібування їхньої активності, детально досліджено їхні аналітичні характеристики. Базуючись на цих дослідженнях, створено низку діючих лабораторних прототипів для визначення концентрацій фосфорорганічних пестицидів та карбаматних гербицидів, іонів важких металів та глікоалкалоїдів. Вперше розроблено низку нових ензимних біосенсорів для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах на основі кондуктометричного та потенціометричного методів аналізу, досліджено їхні аналітичні характеристики та продемонстровано особливості функціонування. Вперше розроблено ензимний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових та експрес-оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в зразках культури тканин раувольфії зміїної. Вперше продемонстровано можливість використання холінестераз в складі мультибіосенсора для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах. Для частини отриманих біосенсорів виконано ряд метрологічних досліджень, стандартизовані методики визначення токсинів затверджено в ДП «Укрметртестстандарт».

За допомогою розроблених біосенсорів проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі, вирощених на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Boigneville, Франція) та виведених методом традиційної селекції співробітниками Інституту картоплярства УААН, а також в комерційних сортах томатів, підібрано оптимальну

процедуру підготовки проб картоплі та томатів, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту глікоалкалоїдів. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора, з даними, які отримані за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (коефіцієнт кореляції $R = 0,93$).

Вперше за допомогою розроблених біосенсорів проведено кількісний аналіз афлатоксинів в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса, спеціально інфікованих мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus* в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України із залученням музею культур грибів-продуцентів мікотоксинів, підібрано оптимальну процедуру підготовки проб, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту афлатоксинів. Аналіз є простим, швидким та не потребує значного часу на його проведення.

Вперше запропоновано нову методику одночасного виявлення різних класів токсичних речовин за допомогою потенціометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази та проведено її апробацію при одночасному визначенні трихлорфону та афлатоксину.

Розроблені електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз та запропоновані їхні лабораторні прототипи в подальшому можуть бути використані для експрес-аналізу вмісту низки токсичних речовин в реальних зразках довкілля. Біосенсиори для визначення глікоалкалоїдів можуть успішно застосовуватись в різних сферах людської діяльності для контролю вмісту алкалоїдів у посівних лініях та потенційних комерційних сортах картоплі та томатів. Це дозволить уникнути перевищення небезпечних для споживання концентрацій алкалоїдів, вибирати відповідні умови вирощування та процедур транспортування та зберігання врожаю та проводити селекцію сортів картоплі, що володіють інсектицидною, антимікробною та фунгітоксичною активністю. Електрохімічний ензимний біосенсор для аналізу загального вмісту афлатоксинів у пробах зернових може бути застосований для контролю якості харчових продуктів за рахунок моніторингу наявності токсинів.

Створені лабораторні прототипи електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз можуть в подальшому бути основою комерційних пристроїв для експресного аналізу токсичних речовин різної природи, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Ключові слова: аналітична біотехнологія, ензими, електрохімічні біосенсиори, холінестерази, кондуктометричні датчики, рН-чутливі польові транзистори, наночастинки, інгібітори, екологічний моніторинг, експрес-аналіз, математичне моделювання.

SUMMARY

Arkhypova V. M. Fundamental and biotechnological bases of the application of cholinesterases in biosensors. – Qualifying scientific work in the form of manuscript.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology (specialty 03.00.20 "Biotechnology" (09 - Biology). - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine. - D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine. - Kyiv, 2025.

The presented work is devoted to the development of the fundamental and biotechnological bases of the analytical application of cholinesterases in electrochemical biosensors for practical application in agriculture and environmental monitoring. The main attention in the work is focused on the analysis and systematization of various variants of biosensors based on cholinesterases from the point of view of the use of various types of electrochemical transducers, enzyme immobilization procedures and measurement methods, as well as taking into account the applied aspects of their applications.

Today, electrochemical biosensors are considered as a successful alternative to traditional methods of analysis, given the existing successes in the development of their laboratory prototypes and the entry into the market of number of competitive measuring devices. Biosensor analysis is simpler and does not require special skills, therefore it is aimed at the average user. As screening tools, biosensors can help pre-select a certain

number of questionable samples that will later be further analyzed using traditional methods, thus reducing the overall cost and time of analysis.

Cholinesterase is an enzyme responsible for the functioning of the nervous system of both animals and insects, as well as humans. Biosensors based on cholinesterases have found their wide application precisely due to the possibility of their use to determine trace amounts of toxic compounds of various origins, which are cholinesterase inhibitors. Attention to biosensors is due to their certain advantages over traditional methods of analysis. This is the absence of expensive and cumbersome equipment, portability, simplicity, convenience, cheapness and speed of analysis, but at the same time high sensitivity, reproducibility, sufficient range and low limit of determination of the necessary substances.

To date, most studies on the application of cholinesterases in biosensing are somewhat fragmentary and mainly concern only the determination of organophosphorus pesticides. They lack a thorough analysis of the possibilities of using different signal transduction systems, as well as the specific features of the transducers, the use of cholinesterases from different sources and methods of their immobilization, the assessment of the type of inhibition and reactivation of cholinesterases, and the application of these approaches to the development of toxin detection procedures. Therefore, the main advantages of using cholinesterases as selective elements of biosensors are not always used with maximum efficiency. In addition, only a small number of works refer to the application of developed biosensors based on cholinesterases for working with real samples. A standard situation is when developed laboratory prototypes work quite well in model solutions, but when moving to the analysis of real samples, difficulties arise that complicate, and sometimes even make impossible, the practical application of the created systems.

The aim of the dissertation was to develop the fundamental and biotechnological bases of the application of cholinesterases in electrochemical biosensors for practical application in agriculture and environmental monitoring.

As a result of the research, the fundamental and biotechnological basis of the application of cholinesterases in electrochemical biosensors for practical use in

agriculture and environmental monitoring have been scientifically substantiated and developed, which consist in creation of general concept of multifunctional application of cholinesterases in biosensors, a method for selective analysis of toxins of various nature through the use of various approaches to inhibition and reactivation of cholinesterases, and a detailed step-by-step procedure for the development of electrochemical biosensors based on cholinesterases.

Electrochemical transducers based on pH-sensitive field-effect transistors and conductometric interdigitated electrodes were designed and optimized, taking into account the peculiarities of operation during electrochemical measurements involving cholinesterases. Experimental measuring systems (including portable ones) of various configurations, measuring cuvettes and cells of various modifications were developed and manufactured for further work with cholinesterases as selective elements of biosensors. This also lays the bases for their further application with other enzymes as selective elements of biosensors.

The method of cholinesterase immobilization on the surface of electrochemical transducers was developed, investigated and optimized. The effect of surface modification on the characteristics of both the transducers themselves and biosensors as a whole was studied in detail. Several variants of such modification have been proposed to improve the immobilization procedure, including the use of nanoparticles. Creating biosensors by co-immobilizing cholinesterases with gold nanoparticles is a promising approach, and this immobilization option was not inferior in efficiency to the traditional method of immobilizing cholinesterases.

For the first time, the biochemical parameters of surface-immobilized cholinesterase transducers, namely Michaelis-Menten constants and inhibition constants, have been studied in detail. The obtained values indicate the absence of significant conformational changes in cholinesterases after their immobilization procedure. The significant difference in the inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase by different toxins allows us to adapt the characteristics of the sensors to specific application needs due to the significant difference in the inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase by different toxic substances.

For the first time, a mathematical model of the work of a potentiometric biosensor based on butyrylcholinesterase for the inhibitor analysis of α -chaconine was developed, which fully describes the biochemical reactions that take place in the enzyme membrane of the biosensor with the participation of substrates and inhibitors. The corresponding constants were selected so that the simulated response matched the experimentally obtained biosensor response as closely as possible. These selected constants were subsequently used to model the biosensor responses to the addition of substrates and inhibitors. The use of mathematical modeling is a useful tool for better understanding biochemical processes and can be used to optimize the analytical characteristics of biosensors. The obtained results of numerical modeling are especially relevant when working with toxic substances and when creating new biosensors.

A number of electrochemical biosensors based on acetyl- and butyrylcholinesterase enzymes were developed using the process of inhibiting their activity, and their analytical characteristics were studied in detail. Based on these studies, a number of operational laboratory prototypes were created to determine the concentrations of organophosphorous pesticides and carbamate herbicides, heavy metal ions and glycoalkaloids. A number of new enzyme biosensors for the determination of surfactants in aqueous solutions based on conductometric and potentiometric methods of analysis have been developed for the first time, their analytical characteristics have been investigated and their operating features have been demonstrated. An enzyme potentiometric biosensor has been developed for the first time for the rapid analysis of aflatoxins in grain samples and for the rapid assessment of the total content of indole alkaloids in *Rauwolfia serpentina* tissue culture samples. The possibility of using cholinesterases as part of a multibiosensor for the determination of concentrations of toxic substances in aqueous solutions has been demonstrated for the first time. A number of metrological studies were performed for some of the obtained biosensors, and standardized methods for determining toxins were approved by the State Enterprise "Ukrmetrteststandard".

A quantitative analysis of glycoalkaloids in tubers of more than 60 different potato varieties grown at the ARVALIS Potato Experimental Station of the Plant Institute (Boigneville, France) and bred by traditional breeding by employees of the Potato

Institute of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, as well as in commercial tomato varieties, was carried out by using the developed biosensors, the optimal procedure for preparing potato and tomato samples was selected, and methods and protocols for measuring the content of glycoalkaloids were worked out. A high correlation of the results obtained using the biosensor with the data obtained using the high-performance liquid chromatography method (correlation coefficient $R = 0.93$) has been shown.

For the first time, using the developed biosensors, a quantitative analysis of aflatoxins in samples of wheat, soybean, corn and millet, specially infected with fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* at the D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine with the involvement of the museum of mycotoxin-producing fungal cultures. The optimal procedure for sample preparation was selected, and methods and protocols for measuring aflatoxin content were developed. The analysis is simple, fast and does not require significant time to conduct.

For the first time, a new method for the simultaneous detection of different classes of toxic substances using a potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase was proposed and tested for the simultaneous determination of trichlorfon and aflatoxin.

The developed electrochemical biosensors based on immobilized cholinesterases and their proposed laboratory prototypes can be used in the future for rapid analysis of the content of a number of toxic substances in real environmental samples. Biosensors for the determination of glycoalkaloids can be successfully used in various areas of human activity to control the content of alkaloids in seed lines and potential commercial varieties. This will allow avoiding exceeding dangerous concentrations of alkaloids for consumption, choosing appropriate growing conditions and procedures for transporting and storing the crop, and selecting potato varieties with insecticidal, antimicrobial, and fungitoxic activity. An electrochemical enzyme biosensor for analyzing total aflatoxins content in grain samples can be used to control food quality by monitoring the presence of toxins.

Created laboratory prototypes of electrochemical biosensors based on cholinesterase can be the basis of commercial devices for rapid analysis of toxic substances of various nature, which can be produced both in Ukraine and abroad.

Keywords: analytical biotechnology, enzymes, electrochemical biosensors, cholinesterases, conductometric sensors, pH-sensitive field-effect transistors, nanoparticles, inhibitors, environmental monitoring, express analysis, mathematical modeling.

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* - особистий внесок здобувача)

Монографії (розділи монографій):

1. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Electrochemical enzyme biosensors. Kiev: Akademperiodika; 2006. 72 p. (* проаналізовано літературні джерела стосовно ензимних біосенсорів на основі потенціометричних датчиків).
2. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Conductometric enzyme biosensors. In: Marks RS, Lowe CR, Cullen DC, Weetall HH, Karube I, editors. Handbook of Biosensors and Biochips. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. p. 379–394. (* проаналізовано літературні джерела стосовно кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз).
3. Arkhypova V. Enzyme biosensor based on ISFETs for determination of glycoalkaloids content in potato. In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D, editors. Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. Rzeszow: University of Rzeszow; 2015. p. 99–112.
4. Shkotova L, Soldatkin O, Arkhypova V, Pyeshkova V, Saiapina O, Sergeyeva T, Soldatkin A, Dzyadevych S. Biosensors. Practical application. In: Stabnikova O, Shevchenko O, Stabnikov V, Paredes-López O, editors. Bioconversion of Food Industry Wastes: Transformation into Value-Added Products. Boca Raton: CRC

Press; 2023. p. 305–352. (** експерименти по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі та афлатоксинів в зернових*).

Статті у наукових фахових виданнях, що належать до бази даних Scopus

1. Arkhyova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Jaffrezic H, Martelet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta*. 2001;55:919–927. (** перевірено роботу іммобілізованої ацетилхолінестерази*). Q1
2. Архипова ВН, Дзядевич СВ, Щувайло ОН, Солдаткин АП, Ельская АВ, Жафрезик-Рено Н, Жафрезик Г, Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа. *Biopolym. Cell*. 2001;17(1):70–77. (** перевірено роботу іммобілізованих холінестераз*). Q4
3. Arkhyova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosens Bioelectron*. 2003;18:1047–1053. (** розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення глікоалкалоїдів*). Q1
4. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, Arkhyova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377:496–506. (** участь в експериментах по визначенню іонів важких металів*). Q2
5. Dzyadevych SV, Arkhyova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. *Anal. Letters*. 2004;37(8):1–14. (** розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення томатину*). Q2
6. Dzyadevych SV, Arkhyova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, El'skaya AV, Soldatkin AP. Potentiometric biosensors based on ISFETs and

- immobilized cholinesterases. *Electroanalysis*. 2004;16:1873–1882. (* *участь в експериментах по визначенню пестицидів*). Q2
7. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. *Sensors Actuators B*. 2004;103:416–422. (* *оптимізація роботи біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів*). Q1
 8. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Georgiou C, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for the environmental monitoring based on enzyme inhibition effect. *Sensors and Actuators B*. 2005;55:81–87. (* *участь в експериментах по визначенню токсинів різного походження*). Q1
 9. Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'Skaya AV, Gravouelle JM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*. 2005;66(1):28–33. (* *участь в експериментах по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі*). Q1
 10. Бенілова ІВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартлє К, Солдаткін ОП. Кінетика функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз та інгібуючий вплив на них стероїдних глікоалкалоїдів. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(2):131–141. (* *дослідження кінетики функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз*). Q4
 11. Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартлє К, Солдаткін ОП. Дослідження взаємодії основних глікоалкалоїдів картоплі за інгібування ними іммобілізованої бутирилхолінестерази. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(5):138–144. (* *дослідження інгібування іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестерази*). Q4
 12. Benilova IV, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Kinetics of human and horse sera cholinesterases inhibition with solanaceous glycoalkaloids: study by potentiometric biosensor. *Pesticide*

- Biochemistry and Physiology. 2006;86(3):203–210. (** дослідження впливу глікоалкалоїдів на іммобілізовані бутирилхолінестерази різного походження*). Q2
13. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon JM, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilised cholinesterases. International Journal of applied electromagnetics and mechanics. 2006;23(2–3):229–244. (** участь в експериментах по дослідженню інгібування холінестераз різними токсинами*). Q3
 14. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора. Biopolym. Cell. 2008;24(1):41–50. (** оптимізація роботи бутирилхолінестерази в складі мультибіосенсора*). Q3
 15. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Biosensors for assay of glycoalkaloids in potato tubers. Appl Biochem Microbiol. 2008;44(3):314–318. (** аналіз глікоалкалоїдів в картоплі*). Q3
 16. Pavluchenko AS, Kukla AL, Goltvianskyi YV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Investigation of stability of the pH-sensitive field-effect transistor characteristics. Sensor Letters. 2011;9:2392-2396. (** дослідження стабільності рН-чутливих польових транзисторів*). Q3
 17. Soy E, Arkhypova V, Soldatkin O, Shelyakina M, Dzyadevych S, Warzywoda J, Sacco AJr, Akata B. Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals. Material Science Engineering C. 2012;32:1835-1842. (** дослідження впливу бета-цеолітів на характеристики біосенсора на основі бутирилхолінестерази*). Q1
 18. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Novel biosensor method for surfactant determination based on acetylcholinesterase inhibition. Measurement Science and Technology. 2012;23:1–6. DOI:10.1088/0957-

- 0233/23/6/065801. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення поверхнево активних речовин*). Q2
19. Soldatkin OO, Burdak OS, Sergeyeva TA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. Sensors Actuators B. 2013;188:999–1003. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення афлатоксину B1*). Q1
 20. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Sergeeva TA, Arkhypova VN, Biloivan OA, Soldatkin OO, Shkotova LV, Zinchenko OA, Peshkova VM, Sayapina OY, Marchenko SV, El'skaya AV. Biosensors. A quarter of century of R&D experience. Biopolym. Cell. 2013;29(3):188–206. (** узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз*). Q3
 21. Stepurska KV, Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. Anal Chim Acta. 2015;854:161–168. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення токсинів різного походження*). Q1
 22. Soldatkin OO, Shelyakina MK, Arkhypova VN, Soy E, Kirdeciler SK, Ozansoy Kasap B, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Akata Kurç B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Nano- and micro-sized zeolites as a perspective material for potentiometric biosensors creation. Nanoscale Research Letter. 2015;10:59. DOI 10.1186/s11671-015-0768-8. (** дослідження впливу цеолітів на характеристики потенціометричного біосенсора на основі холінестерази*). Q2
 23. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. Development of novel enzyme potentiometric biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Talanta. 2015;144:1079–1084. (** розробка потенціометричного прототипу біосенсора для визначення афлатоксину B1*). Q1
 24. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Dzyadevych S. Identifying the inhibition type of the immobilized acetylcholinesterase by aflatoxin B1 within the potentiometric biosensor. Biopolym.

- Cell- 2016;32(4):271-278. (* дослідження типу інгібування ацетилхолінестерази афлатоксином B1). Q3
25. Nakonechnyi A, Martsenyuk V, Sverstiuk A, Arkhypova V, Dzyadevych S. Investigation of the Mathematical Model of the Biosensor for the Measurement of A-Chaconine Basing on the Impulsive Differential System. CEUR Workshop Proceedings. 2020;2762:209–217. (* участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсора для визначення α -чаконіну). Q3
 26. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Practical application of electrochemical enzyme biosensors. Biopolymers and Cell. 2022;38(2):71–92. (* узагальнення даних з практичного застосування біосенсорів на основі холінестераз). Q4
 27. Arkhypova V, Soldatkin O, Moghylevska L, Konvalyuk I, Kunakh V, Dzyadevych S. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for assessment of total indole alkaloids content in tissue culture of *Rauwolfia serpentine*. Electrochemical Science Advance. 2022;2(5):1–8. <https://doi.org/10.1002/elsa.202100152>. (* розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів). Q2
 28. Shkotova L, Zinchenko O, Arkhypova V, Dzyadevych S. Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. Applied Nanoscience. 2023;13(7):5133–5138. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02715-z>. (*участь в експериментах по застосування золотих наночастинок при іммобілізації холінестерази) Q2
 29. Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Dzyadevych S. Electrochemical biosensors based on enzyme inhibition effect. Chemical Records. 2024;24:e202300214.- <https://doi.org/10.1002/tcr.202300214>. (* узагальнення даних розробці біосенсорів на основі інгібування холінестераз) Q1
 30. Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Kucherenko IS, Velychko TP, Bakhmat VA, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Application of butyrylcholinesterase-based biosensor for simultaneous determination of different toxicants using inhibition and reactivation steps. Electroanalysis.

2024;36:e202300400. <https://doi.org/10.1002/elan.202300400>. (*участь в експериментах по реактивації активності бутирилхолінестерази). Q3

Статті у наукових фахових виданнях України категорії Б

1. Архипова ВМ, Бережецький АЛ, Шульга ОА, Шовелон Ж-М, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження та оптимізація кондуктометричних перетворювачів на основі планарної технології. Sensor Electronics and Microsystem Technologies. 2005;2:48–54. (* дослідження роботи кондуктометричних перетворювачів).
2. Кукла ОЛ, Павлюченко ОС, Голтвянський ЮВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Сенсорні масиви на основі диференційних ІСПТ-елементів для моніторингу токсичних речовин природного та штучного походження. Sensor Electronics and Microsystem Technologies. 2008;2:58–68. (* дослідження характеристик потенціометричних перетворювачів).
3. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Кукла ОЛ, Назаренко ОА, Осипчук АА, Єльська ГВ. Біосенсорний аналіз глікоалкалоїдів в картоплі. Biotechnologica Acta. 2009;2(3):64–73. (* проведення експериментів по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі).
4. Soy E, Pyeshkova V, Arkhylova V, Khadro B, Jaffrezic-Renault N, Sacco A, Dzyadevych S, Akata Kurc B. Potentialities of zeolites for immobilization of enzymes in conductometric biosensors. Sensor Electronics and Microsystem Technologies. 2010;1:27–34. (* участь в експериментах з використання цеолітів при іммобілізації холінестераз).
5. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази для визначення катіонних поверхнево-активних речовин в водних розчинах. Biotechnologica Acta. 2011;4(5):83–89. (* участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР).
6. Коробко МЮ, Степурська КВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Оптимізація процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів. Sensor Electronics and Microsystems Technologies. 2016;13(4):61–72.

(участь в експериментах з розробки процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів).*

7. Архипова ВМ, Степурська КВ, Циганенко КВ, Савчук ЯІ, Єльська ГВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2019;16(4):37–52. *(* проведення експериментів по визначенню афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції).*
8. Сверстюк АС, Архипова ВМ, Степурська КВ, Марценюк ВП, Бойко ІВ, Дзядевич СВ. Розробка та верифікація математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну. *Вісник Хмельницького національного університету*. 2020;281(1):230–237. *(* участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну).*
9. Солдаткін ОО, Солдаткіна ОВ, Архипова ВМ, Пилипонський ІІ, Рєзніченко ЛС, Грузіна ТГ, Дибкова СМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Використання наночастинок золота для покращення аналітичних характеристик кондуктометричних ферментних біосенсорів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(1):20–34. *(* участь в експериментах з використання наночастинок золота для кондуктометричних біосенсорів).*
10. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Можилевська ЛП, Конвалюк ІІ, Кунах ВА, Дзядевич СВ. Розробка ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina Benth. Ex Kurz*). *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(3):38–50. *(* розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів).*
11. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Кучеренко ІС, Кучеренко ДЮ, Дзядевич СВ. Адаптація процедури коїмобілізації ферментів з різними модифікаціями цеолітів на поверхню кондуктометричних перетворювачів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(4):11–26. *(* участь в експериментах з коїмобілізації холінестераз з різними модифікаціями цеолітів).*

12. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Жаффрезік-Рено Н. Фізична модель тимчасової нестабільності струму в іон-селективних польових транзисторах з діелектричними шарами оксиду/нітриду кремнію. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2023;20(3):79–91. (** участь в експериментах з дослідження стабільності перетворювачів*).
13. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Архипова ВМ, Еррашид А, Дзядевич СВ. Визначення впливу температурної та УФ обробки на характеристики диференційних ІСПТ електродів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2023;20(4):4–18. (** участь в експериментах з дослідження впливу температури на характеристики ІСПТ електродів*).

Статті в інших виданнях

1. Dzyadevych SV, Arkhylova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. *Current Topics in Analytical Chemistry*. 2001;2:179–186. (** участь в експериментах по визначенню пестицидів*).
2. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мартле К, Жаффрезік-Рено Н, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз для екологічного моніторингу. *Екологія і ноосфера*. 2004;15:5–17. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсинів*).
3. Павлюченко АС, Кукла АЛ, Голтвянский ЮВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткин АП. Исследование стабильности характеристик рН-чувствительных полевых транзисторов. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2010;45:90–99. (** досліджено стабільність та рН-чутливість польових транзисторів*).
4. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мельник ВГ, Ленков СВ. Метод експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин з використанням кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз. *Сучасна спеціальна техніка*. 2011;1(24):118–124. (** участь в експериментах з розробки методу для визначення токсинів різної природи*).

Патенти

1. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Мультибіосенсор для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 27284. Подано: 08.06.2007. Опубліковано: 25.10.2007; бюл. № 17. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення фосфорорганічних пестицидів*)
2. Солдаткін ОО, Кучеренко ІС, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 52437. Подано: 05.03.2010. Опубліковано: 25.08.2010; бюл. № 16. (** участь в експериментах з розробки кондуктометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
3. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ. Ферментний біосенсор для визначення аніонних поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 55939. Подано: 16.07.2010. Опубліковано: 27.12.2010; бюл. № 24. (** участь в експериментах з розробки потенціометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
4. Степурська КВ, Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Циганенко КС, Савчук ЯІ, Зайченко ОМ. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових. Патент України на корисну модель № 106062. Подано: 12.11.2015. Опубліковано: 11.04.2016; бюл. № 7. (** розробка біосенсорів для визначення афлатоксинів у пробах зернових*).
5. Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Кунах ВА, Можилевська ЛП, Пороннік ОО. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфія зміїна. Патент України на корисну модель № 118762. Подано:

06.04.2017. Опубліковано: 28.08.2017; бюл. № 16. (** розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів*).

6. Солдаткін ОО, Пешкова ВМ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Рєзніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїмобілізованої ацетилхолінестерази з наночастинками золота для інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148725. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах*).
7. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Рєзніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїмобілізованої бутирилхолінестерази з наночастинками золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148726. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах*).

Методичні вказівки

1. Архипова ВМ, Степурська КВ, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення глікоалкалоїдів у картоплі : методичні рекомендації до виконання лабораторної роботи. Київ: ВПЦ "Київський університет"; 2018. 30 с. (** розробка методичних рекомендацій до виконання лабораторної роботи для визначення глікоалкалоїдів*).

Матеріали і тези доповідей наукових конференцій і з'їздів

1. Korpan Y, Arkhyova V, Nazarenko E, El'skaya A, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A. Novel electrochemical biosensors for stearoidal glycoalkaloids detection based on butyrylcholinesterase. Book of 1st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry; 2001 September 11-15; Odessa, Ukraine. 2001. P. 38-39.

- (*участь в експериментах з розробки лабораторного прототипу електрохімічного біосенсора для визначення стероїдних глікоалкалоїдів).*
2. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Arkhipova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical microbiosensors based on cholinesterases for environmental and food toxins analysis. Proc. of Journees Maghreb-Europe "Les Matériaux et leurs Applications aux Dispositifs Capteurs. Physiques, Chimiques et Biologiques "MADICA 2001"; 2001 October 29-31; Hammamet, Tunisie. 2001. P. 29. *(* участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсинів різної природи).*
 3. Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensors for detection of glycoalkaloids in potatoes and their application for studying the enzyme inhibition mechanisms. Proc. of Eurosensors XVI; 2002 September 15-18; Prague, Czech Republic. 2002. P. 677-678. *(* участь в експериментах з дослідження механізмів інгібування холінестераз).*
 4. Soldatkin AP, Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensor for detection of potato glycoalkaloids. Book of abstract of International Conference "Functionalized materials: synthesis, properties and application"; 2002 September 24-29; Kyiv, Ukraine. 2002. P. 280-281. *(* розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі).*
 5. Dzyadevych SV, Arkhipova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Chovelon J-M, Georgiou C, Soldatkin AP. Early-warning system in the environment based on electrochemical biosensors and enzyme inhibition effect. Proc. of 3rd Aegean Analytical Chemistry Days; 2002 September 29–October 3; Polihnitos, Lesvos, Greece. 2002. P. 425. *(* участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення пестицидів).*
 6. Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of biosensors based on ISFETs for fast detection of total solanaceous glycoalkaloids in potatoes samples.

- 17th European Conference on Solid-State Transducers; 2003 September 21-24; Guimaraes, Portugal. 2003. P. 592-593. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі*).
7. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, Soldatkin AP. Application of conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. 3rd International Conference of Instrumental Methods of Analysis; 2003 September 23-27; Thessaloniki, Greece. 2003. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення інгібіторів ферментів*).
 8. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring; 2003 October 9-11; Marrakech, Morocco. 2003. P. 32. (** розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів томатів*).
 9. El'skaya AV, Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors: 15 years of experience. 8 World Congress "Biosensors' 2004"; 2004 May 24-26; Granada, Spain. 2004. P3.7.60. (** узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз*).
 10. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Development of enzyme biosensors based on pH-sensitive field effect transistors for tomatine determination in tomatoes. International Conference on Sensors Electronics and Microsystem technology; 2004 June 1-5; Odessa, Ukraine. 2004. P. 217. (** розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів томатів*).
 11. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Cholinesterase-based biosensor for glycoalkaloids analysis in potatoes and tomatoes. VIIIth International Meeting on Cholinesterases; 2004 September 26-30; Perugia, Italy. 2004. P. 9. (** розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі і томатів*).
 12. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Cholinesterases-based potentiometric biosensors.

- MADICA 2004; 2004 November 29–December 1; Tunise, Tunis. 2004. P. 137. (* узагальнення даних з розробок потенціометричних біосенсорів на основі холінестераз).
13. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical enzyme biosensors based on cholinesterases. Second International Symposium on Intelligent Artifacts and Bio-systems; 2005 January 27-28; Lyon, France. 2005. P. 61. (* узагальнення даних з розробок кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз).
 14. Gravouelle J-M, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs: a rapid method. 16th Triennial Conference of the European Association for potato research; 2005 July 17-22; Bilbao, Spain. 2005. (* проведення експериментів по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі).
 15. Архипова ВН, Мартле К, Жаффрезик-Рено Н, Солдаткін АП. Биосенсоры на основе иммобилизованных холинестераз. 2-а Міжнародна науково-технічна конференція „Сенсорная електроніка та мікросистемні технології”; 26-30 червня 2006 р.; Одеса, Україна. 2006. С. 187. (* узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз).
 16. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Electrochemical biosensors based on cholinesterases. Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology; 2006 December 14-16; Kyiv, Ukraine. 2006. P. 52. (* узагальнення даних з розробок кондуктометричних біосенсорів на основі ацетилхолінестерази).
 17. Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Архипова ВМ, Кукла ОЛ, Єльська ГВ. Ферментні біосенсори на основі іон-селективних польових транзисторів. 4-а Міжнародна науково-технічна конференція „Сенсорна електроніка та мікросистемні технології”; 28 червня - 2 липня 2010 р.; Одеса, Україна. 2010. С.12-13. (* узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз та іон-селективних польових транзисторів).

18. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Шелякіна МК, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Розробка кондуктометричного біосенсора на основі ацетилхолін естерази для визначення поверхнево-активних речовин в водних розчинах. III міжнародна наукова конференція “Фізичні методи в екології, біології та медицині”; 9-12 вересня 2010 р.; Львів-Шацьк, Україна. 2010. С. 61-63. (** участь в експериментах з розробки кондуктометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
19. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Enzyme-based sensor for surfactant determination. International Conference “Functional Materials”; 2011 October 3-8; Partenit, Crimea, Ukraine. 2011. P. 388. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР*).
20. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Kirdeciler SK, Galioglu S, Akata B, Lagarde F, Dzyadevych SV. The application of the nanosized zeolites for optimization of the acetylcholinesterase based biosensors for determination of the aflatoxin B1. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials”; 2014 August 23-30; Yaremche-Lviv, Ukraine. 2014. P. 61. (** участь в експериментах з використання цеолітів при іммобілізації холінестераз*).
21. Stepurska K, Soldatkin OO, Arkhypova V, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych S. Potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of aflatoxin B1 in real samples. 6 International scientific and technical conference “Sensor electronics and microsystems technologies”; 2014 September 29 - October 3; Odessa, Ukraine. 2014. P. 81. (** проведення експериментів по визначенню афлатоксину B1 в сільськогосподарській продукції*).
22. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Novel acetylcholinesterase biosensor for aflatoxin B1 determination. EMRS 2015 Spring Meeting; 2015 May 11-15; Lille, France. 2015. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів*).

23. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Journee de Printemps de la SCF en Rhone Alpes; 2015 Juin 11; Villeurbanne, France. 2015. P. 51. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів в реальних зразках*).
24. Stepurska KV, Arkhypova VM, Soldatkin OO, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV Application of potentiometric biosensor based on acetyl cholinesterase for detection of aflatoxin B1. International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition PPM 2015; 2015 September 15-18; Cesme Izmir, Turkey. 2015. P. 25. (** участь в експериментах з застосування біосенсорів для визначення афлатоксинів*).
25. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Lagarde F, Dzyadevych S. Application of a potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase inhibition for the determination of toxic compound of different types. Vème Journée Rhône-Alpes des Biomolécules; 2016 Juin 7; Villeurbanne, France. 2016. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсичних компонент різної природи*).
26. Архипова ВМ, Циганенко КВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 у зразкаї зернових. XII Український біохімічний конгрес; 30 вересня-4 жовтня 2019 р; Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. 2019; 21(3):260. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів у зразках зернових*).
27. Soldatkin OO, Soy E, Arkhypova V, Pyeshkova V, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych S. Using zeolites for improvement of performance of biosensor based on ISFET for inhibitory determination of toxic compoinds. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. P.259. (** участь в експериментах з коїмобілізації холінестераз з різними модифікаціями цеолітів*).

28. Shkotova LV, Zinchenko OA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV. Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. (* *участь в експериментах з коїмобілізації холінестераз з різними золотими наночастинками*).
29. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Electrochemical enzyme biosensors and their practical application. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche-Comté; 2022 Novembre 24-25; Dijon, France. 2022. P. 26. (* *участь в експериментах по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі та афлатоксинів в зернових*).
30. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Жаффрезік-Рено Н, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Ензимні біосенсори на основі ефекту інгібування. IX з'їзд Українського біофізичного товариства; 30 жовтня - 2 листопада 2023 р.; Київ, Україна. 2023. С. 153-154. (* *узагальнення даних розробці біосенсорів на основі інгібування холінестераз*)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	35
ВСТУП	36
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	47
1.1 Вступ	47
1.2 Холінестерази як потенційний біоселективний елемент біосенсорів	48
1.3 Електрохімічні датчики як фізичні перетворювачі біосенсорів	52
1.3.1 Амперометричні біосенсиори	53
1.3.2 Кондуктометричні біосенсиори	57
1.3.3 Потенціометричні біосенсиори	63
1.4 Загальні положення про інгібітори ензимів	70
1.5 Біосенсиори на основі інгібіторного ензимного аналізу для визначення токсичних сполук	77
1.6 Біосенсиори на основі ацетилхолінестерази	79
1.7 Висновки	80
1.8 Література	81
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	87
2.1 Матеріали та реактиви	87
2.2 Конструкція перетворювачів	93
2.2.1 Конструкція датчика на основі рН-чутливих польових транзисторів виробництва НДІ "Мікроприлад" (Київ, Україна) ...	93
2.2.2 Конструкція потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів виробництва Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (Київ, Україна)	95
2.2.3 Конструкція кондуктометричних перетворювачів виробництва Інституту хемо- та біосенсорики (Мюнстер, Німеччина)	100

2.2.4	Конструкція кондуктометричних перетворювачів виробництва Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України (Київ, Україна)	100
2.3	Схеми та конструкції експериментальних установок та приладів для роботи з біосенсорами	102
2.3.1	Схема експериментальної установки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"	102
2.3.2	Портативний прилад для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"	104
2.3.3	Портативний прилад для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова	106
2.3.4	Вимірювальні комірки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова	109
2.3.5	Схема експериментальної стаціонарної установки для кондуктометричних вимірювань	115
2.3.6	Портативний прилад для роботи з кондуктометричними перетворювачами	116
2.4	Виготовлення біоселективних елементів	118
2.4.1	Імобілізація ензимів в насичених парах глутарового альдегіду	118
2.4.2	Імобілізація ензимів в краплі глутарового альдегіду	120
2.4.3	Імобілізація ензиму після модифікації поверхні перетворювача сіланізацією	120
2.5	Методики проведення вимірювань	120
2.5.1	Загальні методи проведення вимірювань	120
2.5.2	Методика дослідження рН-чутливості ІСПТ за допомогою біосенсорного приладу	121
2.5.3	Методика дослідження вольт-амперних характеристик ІСПТ	122

2.6	Методики приготування розчинів токсичних сполук	123
2.6.1	Приготування зразків, що містять афлатоксини	123
2.6.2	Приготування розчинів глікоалкалоїдів	124
2.6.3	Приготування зразків індольних алкалоїдів	124
2.7	Хроматографічний аналіз	124
2.8	Література	125
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА, ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ		
МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ХОЛІНЕСТЕРАЗ НА ПОВЕРХНЮ		
ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ		
		127
3.1	Вступ	127
3.2	Відпрацювання процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів	128
3.3	Дослідження процесу іммобілізації холінестераз після силанізації поверхні	135
3.4	Застосування наноматеріалів для покращення процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів	139
3.5	Дослідження біохімічних параметрів іммобілізованих холінестераз	146
3.6	Дослідження взаємодії глікоалкалоїдів при інгібуванні іммобілізованої бутирилхолінестерази	153
3.7	Математичне моделювання	158
3.8	Висновки	170
3.9	Література	171
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ		
ХОЛІНЕСТЕРАЗ В СКЛАДІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ТА		
СТВОРЕННЯ ЇХНІХ ЛАБОРАТОРНИХ ПРОТОТИПІВ		
		175
4.1	Вступ	175
4.2	Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення пестицидів та гербіцидів	176

4.3	Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення глікоалкалоїдів	187
4.4	Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення афлатоксинів	199
4.5	Використання холінестераз в біосенсорах для визначення поверхнево активних речовин	209
4.6	Використання холінестераз в біосенсорах для визначення індольних алкалоїдів	219
4.7	Висновки	228
4.8	Література	228
РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ		
ХОЛІНЕСТЕРАЗ ДЛЯ АНАЛІЗУ РЕАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА		
	ВЕРИФІКАЦІЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	234
5.1	Вступ	234
5.2	Застосування біосенсора на основі бутирилхолінестерази для визначення глікоалкалоїдів в зразках картоплі та томатів	234
5.2.1	Вступ	234
5.2.2	Розробка вимірювальних протоколів аналізу глікоалкалоїдів у зразках різних сільськогосподарських культур	236
5.2.3	Вимірювання глікоалкалоїдів в різних сортах картоплі	245
5.2.4	Застосування біосенсорів для дослідження картоплі	249
5.2.5	Застосування біосенсорів для дослідження томатів	251
5.2.6	Застосування біосенсорів для дослідження глікоалкалоїдів в різних овочах та фруктах	253
5.2.7	Висновки	254
5.3	Застосування біосенсора на основі ацетилхолінестерази для визначення афлатоксинів в зразках зернових	255
5.3.1	Вступ	255
5.3.2	Вибір розчинника для екстракції АФВ1	257

5.3.3 Вирощування продуценту АФВ1 на зразках зернових та процедура його екстракції	267
5.3.4 Відпрацювання протоколу вимірювання АФВ1 в реальних зразках	269
5.3.5 Аналіз АФВ1 в реальних зразках	273
5.3.6 Висновки	280
5.4 Процедура роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів	280
5.4.1 Вступ	280
5.4.2 Відпрацювання оптимальної процедури інгібування трихлорофоном	281
5.4.3 Відпрацювання процедури реактивації ферменту після інгібування	285
5.4.4 Відпрацювання оптимальної процедури інгібування афлатоксином В1	287
5.4.5 Дослідження синергізму дії трихлорофону та афлатоксину В1 при інгібуванні іммобілізованої ацетилхолінестерази	289
5.4.6 Аналіз трихлорофону та афлатоксину В1 в суміші	290
5.4.7 Висновки	291
5.5 Можливість визначення токсичних сполук різної природи	292
5.6 Висновки	295
5.7 Література	296
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	
6.1 Можливості аналітичного застосування холінестераз для створення біосенсорів	303
6.2 Процедура створення біосенсорів на основі холінестераз	305
6.3 Методика селективного аналізу токсичних речовин різної природи за допомогою біосенсора на основі холінестераз	307
6.4 Метрологічні дослідження	309

6.4.1 Відпрацювання методик приготування калібрувальних розчинів аналітів, концентрація яких визначається біосенсорами на основі холінестераз	310
6.4.2 Відпрацювання методик градуювання різних варіантів лабораторних прототипів біосенсорів на основі холінестераз ...	311
6.5 Висновки	313
ВИСНОВКИ	314
ДОДАТКИ	317

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АцХЕ – ацетилхолінестераза

АцХХ – ацетилхолінхлорид

БуХЕ – бутирихолінестераза

БуХХ – бутирилхолінхлорид

ГА – глутаровий альдегід

PVA/SbQ – фотополімер полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин

БСА – сироватковий альбумін бика

ПАМ-2 – піридин-2-альдоксимметилйодид

МДН – метал/діелектрик/напівпровідник

ПТ – польовий транзистор

ІСПТ – іон-селективний польовий транзистор

ЕНПТ – ензимний польовий транзистор

ВЕРХ високоефективна рідинна хроматографія

АЦП – аналого-цифровий перетворювач

ПАР – поверхнево-активні речовини

ДМСО – диметилсульфоксид

НЧЗ – наночастинки золота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогодні біосенсорні технології, які є частиною аналітичних біотехнологій, відносяться до ключових світових експоненціальних технологій, параметри яких покращуються на десятки чи навіть сотні процентів на рік, при тому ж рівні базової вартості. А якщо при цьому вони дозволяють спільне використання з іншими технологіями, наприклад нанотехнологіями, то відбувається запрограмований технологічний вибух. Наприклад, ринок різноманітних сенсорів за 10 років починаючи з 2007 р. виріс в тисячу разів, а їхня вартість зменшилась в тисячу разів, беручи до уваги функціональні можливості таких систем [1]. Це найкращим чином демонструє успіхи в розвитку цієї галузі.

Електрохімічні біосенсори розглядаються сьогодні як успішна альтернатива традиційним аналітичним методам з огляду на існуючі в світі успіхи в створенні їхніх лабораторних прототипів та наявності на ринку низки нового вимірювального обладнання, що робить їх конкурентоспроможними. Інтерес до біосенсорів обумовлено, перш за все, рядом їхніх певних переваг перед традиційними аналітичними методами. Застосовуючи біосенсори відпадає необхідність у використанні громіздких та дорогих приладів. Аналіз з використанням біосенсорів є більш простим і не потребує спеціальних навичок, тому орієнтований на звичайного користувача. Таким чином біосенсорний аналіз загалом є дешевшим та зручнішим. Як інструменти скринінгу, біосенсори можуть допомогти попередньо відібрати певне число сумнівних зразків, які надалі будуть додатково проаналізовані за допомогою традиційних методів, знижуючи таким чином загальну вартість і час аналізу.

Холінестераза – це один із багатьох ензимів, що відповідають за функціонування нервової системи як тварин та комах, так і людей. У випадках, коли кількість цього ензиму знижується до критичного рівня, нервові імпульси, що йдуть до м'язів, не можуть контролюватися протягом довгого часу. Це може призвести до серйозних наслідків, в тому числі смерті [2]. Деякі класи хімічних токсинів, такі як глікоалкалоїди, карбаматні та органофосфорні пестициди, деякі

іони важких металів, проявляють себе як інгібітори холінестераз. Попадаючи в організм, вони зменшують кількість активних молекул холінестераз, що необхідна для нормального функціонування організму.

Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє широке застосування саме завдяки можливості їхнього використання для визначення слідових кількостей деяких токсичних сполук, які є інгібіторами холінестераз [3, 4]. Розроблено ряд різних біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних джерел ензимів, методів іммобілізації та схем детекції, серед яких можна виділити електрохімічні [5, 6], оптичні [7, 8] та п'єзоелектричні [9]. Але більшість із цих досліджень є дещо фрагментарними і стосуються, в основному, тільки визначення органофосфорних пестицидів. В них відсутній ґрунтовний аналіз можливостей застосування різних систем перетворення сигналу, а також специфічних особливостей перетворювачів, використання холінестераз з різних джерел та методів їхньої іммобілізації, оцінки типу інгібування і реактивації холінестераз та застосування цих підходів до створення процедур визначення токсинів. Тому основні переваги застосування холінестераз як селективних елементів біосенсорів не завжди використовуються з максимальною ефективністю, що робить це дослідження актуальним для аналітичної біотехнології.

До того ж зовсім невелика кількість робіт доведена до стадії застосування розроблених біосенсорів на основі холінестераз для роботи з реальними зразками. Досить часто розроблені лабораторні прототипи біосенсорів добре працюють у модельних розчинах, однак при переході до аналізу реальних зразків виникають труднощі, які ускладнюють, а іноді й унеможливають роботу створених систем [10]. Це підтверджується відсутністю комерційних біосенсорних систем для застосування в сільському господарстві та екології. Також повністю відсутні експериментальні роботи по розробці біосенсорів на основі холінестераз для оцінки якості мікробних препаратів, що використовуються для очистки навколишнього середовища від забруднення пестицидами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомолекулярної електроніки Інституту

молекулярної біології і генетики НАН України та відповідає основному плану робіт бюджетних тем № 2.2.4.22 “Електрохімічні мультибіосенсиори та сенсорні масиви: фундаментальні основи створення та функціонування” (№ держ. реєстрації 0107U003346, 2008 – 2012 рр.) та «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018 – 2022 рр.), а також проектів «Мультибіосенсор для визначення загальної токсичності розчинів та окремих токсичних речовин» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб» (№ держ. реєстрації 0107U003133, 2007 – 2009 рр.), «Розробка та дослідна експлуатація портативного приладу на основі ферментних потенціометричних біосенсорів для аналізу алкалоїдів та інших природних токсинів в сільськогосподарських культурах і продуктах» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002504, 2013 – 2017 рр.), «Розробка та оптимізація портативного приладу на основі ферментних електрохімічних біосенсорів для аналізу мікотоксинів в сільськогосподарських культурах і продуктах» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005165, 2018 – 2022 рр.), «Дослідження особливостей формування сучасних біоселективних елементів на основі наноматеріалів різної природи для електрохімічних біосенсорів та сенсорних масивів із заданими та керованими властивостями» грантової підтримки Національного фонду досліджень України у межах конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ держ. реєстрації 0120U104529, 2020 – 2023). Частину роботи виконано в рамках міжнародних проектів FP7-PEOPLE-IRSES-2008 проекту «Nanosensors based on nanomaterials» № 230802 (2009 – 2011), STCU Project No 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins» (2010 – 2012), FP7-PEOPLE-IRSES-2012 проекту «Integrated nanomaterials and nanodevices» № 318524 (2013 – 2015), Horizon-2020

WIDESPREAD-05-2020 проекту “Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on “smart” nanomaterials” No 951887 (2020 – 2024).

Мета і завдання. Метою дисертаційної роботи є розробка фундаментальних та біотехнологічних основ аналітичного застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

Для досягнення вказаної мети було поставлено ряд завдань:

1. Розробити дизайн та оптимізувати електрохімічні перетворювачі та експериментальні вимірювальні системи для подальшої роботи з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів.
2. Розробити, дослідити та оптимізувати методи іммобілізації холінестераз на поверхнях електрохімічних перетворювачів.
3. Дослідити можливість використання іммобілізованих холінестераз в складі електрохімічних біосенсорів з використанням інгібіторного аналізу та проаналізувати особливості їхнього функціонування.
4. Розробити електрохімічні біосенсиори на основі ацетил- та бутирилхолінестераз для інгібіторного визначення різноманітних токсичних речовин, створити їх лабораторні прототипи та запропонувати технологічні схеми та методики виготовлення таких пристроїв.
5. Провести апробацію розроблених біосенсорів на основі холінестераз в аналізі реальних зразків та виконати верифікацію отриманих результатів традиційними методами.

Об’єкт дослідження: ензиматичні реакції за участі холінестераз, іммобілізованих на поверхнях електрохімічних перетворювачів.

Предмет дослідження: кондуктометричні перетворювачі, рН-чутливі польові транзистори, схеми електрохімічного аналізу, електрохімічні біосенсиори на основі холінестераз.

Методи дослідження: методи іммобілізації ферменту; визначення активності ферментів; електрохімічні методи досліджень (кондуктометричний,

потенціометричний); високоефективна рідинна хроматографія; електронна мікроскопія; статистичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше проаналізовано, систематизовано та розроблено низку біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, враховуючи прикладні аспекти їхнього застосування в сільському господарстві та екології.

Детально досліджено та визначено біохімічні параметри іммобілізованих на поверхні перетворювачів холінестераз (K_M , V_{max} , K_i , $i_{0,5}$) та вперше ідентифіковано типи інгібування в залежності від природи токсинів, що дозволяє моделювати взаємодію ензимів з інгібіторами на молекулярному рівні та дає змогу адаптувати характеристики біосенсорів під конкретні прикладні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсичними речовинами.

Вперше розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, яка повністю описує біохімічні реакції, що відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інігібіторів.

Вперше розроблено низку нових ензимних біосенсорів для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах на основі кондуктометричного (Патент України № 52437) та потенціометричного (Патент України № 55939) методів аналізу, досліджено їхні аналітичні характеристики та продемонстровано особливості функціонування.

Вперше розроблено ензимний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових (Патент України № 100062) та сумарного вмісту індольних алкалоїдів (Патент України № 118762) в зразках культури тканин раувольфії зміїної.

Вперше продемонстровано можливість використання холінестераз в складі мультибіосенсора для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах (Патент України № 27284).

Запропоновано нову методику одночасного виявлення різних класів токсичних речовин за допомогою потенціометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази та проведено її апробацію при одночасному визначенні трихлорфону та афлатоксину.

Створені лабораторні прототипи розроблених біосенсорів на основі холінестераз вперше успішно апробовано при інгібіторному аналізі реальних зразків (сік картоплі та томатів, екстракти зернових та бобових культур, водні зразки довкілля тощо) та показано високу кореляцію отриманих результатів з даними традиційних методів аналізу.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Розроблено фундаментальні та біотехнологічні основи аналітичного застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу, які полягають в створенні загальної концепції мультифункціонального застосування холінестераз в біосенсорах, методики селективного аналізу токсинів різної природи завдяки використанню різних підходів до інгібування та реактивації холінестераз та детальної покрокової процедури розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз.

Розроблено дизайн кондуктометричних перетворювачів, рН-чутливих польових транзисторів (потенціометричні перетворювачі), електрохімічних комірок, оптимізовано електрохімічні вимірювальні системи та схеми, що дозволяє їхнє подальше застосування не тільки з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів, але і з іншими ензимами.

Розроблені електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз та запропоновані їхні лабораторні прототипи в подальшому можуть бути використані для експрес-аналізу вмісту низки токсичних речовин в реальних зразках довкілля. Для частини отриманих біосенсорів виконано ряд метрологічних досліджень, стандартизовані методики визначення токсинів затверджено в ДП «Укрметртестстандарт».

Розроблені біосенсиори для визначення глікоалкалоїдів можуть успішно застосовуватись в різних сферах людської діяльності для контролю вмісту

алкалоїдів у посівних лініях та потенційних комерційних сортах. Це дозволить уникнути перевищення небезпечних для споживання концентрацій алкалоїдів, вибирати відповідні умови вирощування та процедур транспортування та зберігання врожаю та проводити селекцію сортів картоплі, що володіють інсектицидною, антимікробною та фунгітоксичною активністю.

Електрохімічний ензимний біосенсор для аналізу загального вмісту афлатоксинів у пробах зернових може бути застосований для контролю якості харчових продуктів за рахунок експрес моніторингу наявності токсинів.

Запропонований новий підхід для одночасного селективного вимірювання декількох токсинів різних класів за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази дозволяє аналізувати складні мультикомпонентні зразки, в складі яких є як афлатоксини, так і пестициди.

Створені лабораторні прототипи електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз можуть бути основою комерційних пристроїв для експресного аналізу токсичних речовин різної природи, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі в Навчально-науковому інституті високих технологій Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу сплановано і виконано здобувачем, в основному, самостійно. Особистий внесок здобувача є визначальним на всіх етапах дослідження. Вся експериментальна робота проводилась дисертанткою особисто, або за її безпосереднього керівництва та участі в проведенні експериментів. Основні напрямки дослідження, мету роботи, положення та висновки сформульовано разом із науковим консультантом - академіком НАН України, д.б.н., проф. О.П. Солдаткіним. Основні результати експериментальних досліджень із розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу отримано автором особисто. Частина експериментальних робіт із оптимізації біосенсорів та їхньої апробації при роботі

з реальними зразками проведено у тісному співробітництві з д.б.н., пров.н.с. Солдаткіним О.О., PhD Степурською К.В., PhD Беніловою І.В., к.б.н., н.с. Кучеренко І.С., professor Jaffrezic-Renault N. (CNRS Lyon, France), professor Martelet C. (Ecole Centrale de Lyon, France), professor Chovelon J.-M. (Claude Bernard University Lyon 1, France), professor Akata B. (METU Ankara, Turkey), студентами Інституту високих технологій Київського національного університету ім. Тараса Шевченка Коробко М.Ю. та Шелякіною М.К. та студентами Середньо-Східного Технічного Університету м.Анкара (Туреччина) E.Soy, S.K.Kirdeciler, B. Ozansoy Kasap, результати досліджень опубліковано в спільних публікаціях. Обговорення та аналіз результатів досліджень проведено з науковим консультантом академіком НАН України, д.б.н., проф. Солдаткіним О.П., академіком НАН України, д.б.н., проф. С.В. Дзядевичем, академіком НАН України, д.б.н., проф. Єльською Г.В., яким здобувач висловлює вдячність за надану допомогу та велику увагу до дисертаційної роботи. Також дисертант щиро вдячний співробітникам Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України д.ф-м.н., с.н.с. Куклі О.Л. та н.с. Павлюченко О.С. за допомогу в розробці вимірювальних систем та корисні поради стосовно електрохімічних методів вимірювання, співробітникам Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України к.б.н., с.н.с. Циганенко К.С. та к.б.н., с.н.с. Савчуку Я.І. за підготовку інфікованих зразків та участь у проведенні вимірювань традиційними методами аналізу, співробітникам Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського д.т.н., проф. Марценюку В.П. та д.т.н., проф. Сверстюку А.С. за допомогу в математичному моделюванні.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на наступних фахових конференціях: 1st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Odesa, Ukraine, 2001), Міжнародна конференція «MADICA» (Tunisie 2001, 2004), Eurosensors XVI (Prague, Czech Republic, 2002), 16th European Conference on Solid-State Transducers (Prague, Czech Republic, 2002), International Conference “Functionalized materials: synthesis, properties and application” (Kyiv, Ukraine, 2002), 3rd Aegean Analytical Chemistry Days (Polihnitos,

Lesvos, Greece, 2002), 17th European Conference on Solid-State Transducers (Guimaraes, Portugal, 2003), 3rd International Conference of Instrumental Methods of Analysis (Thessaloniki, Greece, 2003), International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring (Marrakech, Morocco, 2003), Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2004, 2006, 2010, 2014), World Congress "Biosensors" (Granada, Spain, 2004), VIIIth International Meeting on Cholinesterases (Perugia, Italy, 2004), Second International Symposium on Intelligent Artifacts and Bio-systems (Lyon, France, 2005), 16th Triennial Conference of the European Association for potato research (Bilbao, Spain, 2005), Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology (Kyiv, Ukraine, 2006), International Conference "Functional Materials" ICFM (Партеніт, 2007, 2011), III міжнародна наукова конференція "Фізичні методи в екології, біології та медицині" (Львів-Шацьк, Україна, 2010), Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, Україна, 2011), Thirty-fourth AMOP technical seminar on environmental contamination and response (Alberta, Canada, 2011), III Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія:звершення та надії» (Київ, Україна, 2014), International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (Yaremche-Lviv, Ukraine, 2014), EMRS 2015 Spring Meeting (Lille, France, 2015), Journee de Printemps de la SCF en Rhone Alpes (Villeurbanne, France, 2015), International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition (Cesme Izmir, Turkey, 2015), V^{ème} Journée Rhône-Alpes des Biomolécules (Villeurbanne, France, 2016), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), Scientific Meeting «Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on "smart" nanomaterials» (Lyon, France, 2020), International Conference «Information-Communication Technologies & Embedded Systems» (Mykolaiv, Ukraine, 2020), International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021) (Львів, Україна, 2021), Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche-Comté (Dijon, France, 2022), IX з'їзд Українського біофізичного товариства (Київ, Україна, 2023).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 47 наукових статтях у фахових наукових журналах (із них 30 із бази даних Scopus, в.т.ч. 25 статей у виданнях, віднесених до кuartилів Q1—Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), 4 монографіях та розділах монографій, 1 методичному посібнику, 30 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 7 патентів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, 6 розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, експериментальні результати та їх обговорення, аналіз і узагальнення), висновків, списку використаних джерел (267 найменувань) та додатків А-Г. Дисертація викладена на 357 сторінках тексту, проілюстрована 169 рисунками і 13 таблицями.

Література

1. Sezgintürk MK (ed). Commercial Biosensors and Their Applications: Clinical, Food, and Beyond. Amsterdam: Elsevier; 2020. 374 p.
2. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog Neurobiol. 1993;41:31-91.
3. Singh AK, Flounders AW, Volponi JV, Ashley CS, Wally K, Schoeniger JS. Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports. Biosens Bioelectron. 1999;14:703-713.
4. Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Clechet P, Nyamsi Hendji A-M, Shul'ga AA, Dzyadevitch SV, Netchiporouk LI, Soldatkin AP Comparison of two transduction modes for design of microbiosensors applicable to detection of pesticides. Sensors Materials. 1996;8(6):161-167.
5. Dzyadevich SV, Shul'ga AA, Soldatkin AP, Nyamsi Hendji AM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Application of conductometric for sensitive detection of pesticides biosensor based on the cholinesterases. Electroanalysis. 1994;6:752-758.

6. Ivanov AN, Evtugyn GA, Gyurcsányi RE, Tóth K, Budnikov HC Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. *Anal Chim Acta*. 2000;404:55-65.
7. Xavier M, Vallejo B, Marazuela M, Moren-Bondi M, Baldini F, Falai A. Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. *Biosens Bioelectron*. 2000;14:895-905.
8. Pogačnik L, Franko M. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor // *Biosens Bioelectron*. 2003; 18:1-9.
9. Makower A, Halámek J, Skládal P, Kernchen F, Sheller FW. New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezoelectric biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2003;18:1329-1337.
10. Dzyadevych SV, Soldatkin AP Solid-State electrochemical enzyme biosensors. Kyiv: Akadempriodika; 2008. 222 p.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вступ

На сьогодні біосенсорні технології, що є частиною аналітичних біотехнологій, відносяться до ключових світових експоненціальних технологій, параметри яких покращуються на десятки чи навіть сотні процентів на рік, при тому ж рівні вартості. А якщо при цьому вони спільно використовуються з іншими технологіями, наприклад нанотехнологіями, мікроелектронікою, то відбувається стрімкий технологічний ріст. Наприклад, ринок сенсорів за 10 років з 2007 р. виріс в тисячу разів, а їхня вартість зменшилась в тисячу разів, беручи до уваги функціональні можливості таких систем.

Електрохімічні біосенсори розглядаються сьогодні як успішна альтернатива традиційним аналітичним методам з огляду на існуючі в світі успіхи в створенні їхніх лабораторних прототипів та наявності на ринку низки нового вимірювального обладнання, що робить їх конкурентоспроможними. Інтерес до біосенсорів обумовлено, перш за все, рядом їхніх певних переваг перед традиційними аналітичними методами. Застосовуючи біосенсори, відпадає необхідність у використанні громіздких та дорогих приладів. Аналіз з використанням біосенсорів є більш простим і не потребує спеціальних навичок, тому орієнтований на звичайного користувача. Таким чином біосенсорний аналіз загалом є дешевшим та зручнішим. Як інструменти скринінгу, біосенсори можуть допомогти попередньо відібрати певне число сумнівних зразків, які надалі будуть додатково проаналізовані за допомогою традиційних методів, знижуючи таким чином загальну вартість і час аналізу.

На сьогоднішній день опубліковано ряд оглядів [1-3], монографій [4-6], велику кількість експериментальних робіт, в яких описано різні типи біосенсорів.

Біосенсори являють собою автономні пристрої, які складаються з двох основних компонентів: біоселективний елемент або біорецептор, який становить сенсорну частину біосенсора, а також фізичний перетворювач, що є інструментальною частиною [7]. Біосенсори здатні до реєстрації змін фізичних або

хімічних властивостей за рахунок специфічної взаємодії біорецепторів з цільовим аналітом, що призводить до електричного сигналу, безпосередньо пов'язаним з концентрацією аналізованої речовини (рис.1.1.).



Рисунок 1.1 – Схематичне зображення біосенсора

В даному розділі велика увага приділяється питанням, пов'язаним з описом холінестераз як потенційних біоселективних компонентів біосенсорів, електрохімічних датчиків як перетворювачів в біосенсорах, опису розроблених на даний час біосенсорів на основі інгібіторного аналізу, аналізу їхніх недоліків та можливих шляхів подолання проблем застосування холінестераз в біосенсориці.

1.2 Холінестерази як потенційний біоселективний елемент біосенсорів

Біологічні компоненти біосенсорів можна розділити на дві основні групи: каталітичні та некаталітичні (рис. 1.2). Каталітична група включає в себе ферменти, тканини та мікроорганізми, в той час як некаталітична - антитіла, антигени, рецептори, ДНК та нуклеїнові кислоти.

Холінестерази – група ферментів класу гідролаз карбонових кислот, субстратами яких є складні ефіри холіну з оцтовою, пропіоновою чи масляною кислотами. Вони розподіляються на:

- Ацетилхолін-ацетилгідролазу (шифр фермента 3.1.1.7) чи ацетилхолінестеразу (АцХЕ), яка гідролізує ацетилхолін до холіну та оцтової кислоти.
- Ацетилхолін-ацилгідролазу (шифр фермента 3.1.1.8) чи псевдохолінестеразу, серинову гідролазу, бутирилхолінестеразу (БуХЕ), яка гідролізує бутирилхолін, пропіонілхолін, тощо, до відповідних продуктів.

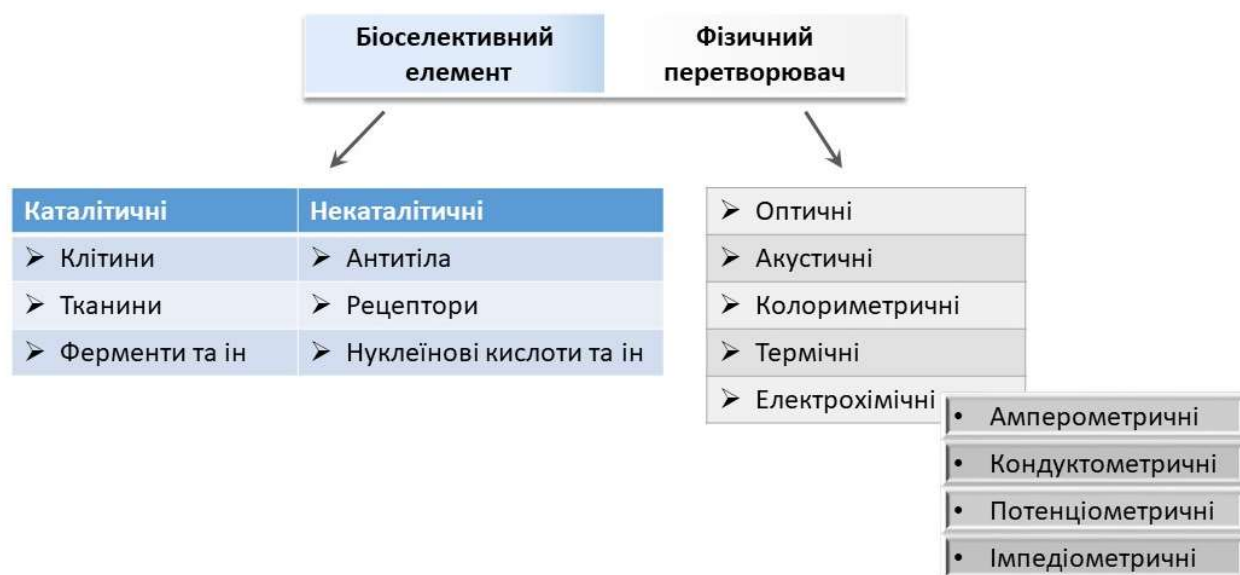


Рисунок 1.2 – Основні можливі компоненти біосенсорів

Ацетилхолінестераза синтезується переважно в нервах та м'язах [8]. Це один з найактивніших ферментів, число обертів, якого становить понад 25000/секунду. Ацетилхолінестераза каталізує розпад ацетилхоліну та інших холінових естерів внаслідок перенесення молекули води на естерний зв'язок, в результаті чого утворюються холін та певна кислота, наприклад, у випадку ацетилхоліну, який є основним субстратом - оцтова кислота. Даний процес є надзвичайно важливим для припинення імпульсної передачі ацетилхоліну в холінергічних синапсах. Чисельні інгібітори ацетилхолінестерази, використовуються для лікування таких хвороб, як Альцгеймера, глаукома тощо.

Ацетилхолінестераза (рис.1.3) містить більш ніж 600 амінокислот, проте характеризується досить стабільною тривимірною структурою з низьким рівнем гнучкості [9]. Першим, хто визначив тривимірну структуру білка був Джол С'юзман, який використав для дослідження фермент взятий з *Torpedo californica* - модельний організм для дослідження ацетилхолінестерази. Визначення кристалічної структури ферменту з *Torpedo californica* вперше дозволило візуалізувати при атомному розширенні "карман" для зв'язування ацетилхоліну. Дослідження також виявило активний центр ферменту, розташованого в щілині, яка оточена гідрофобними ароматичними залишками амінокислот [10].

Кристалічна структура рекомбінантної ацетилхолінестерази людини загалом подібна до структури фермента *Torpedo californica*, однак її унікальне пакування формує послідовність, яка блокує доступ до активного сайту.

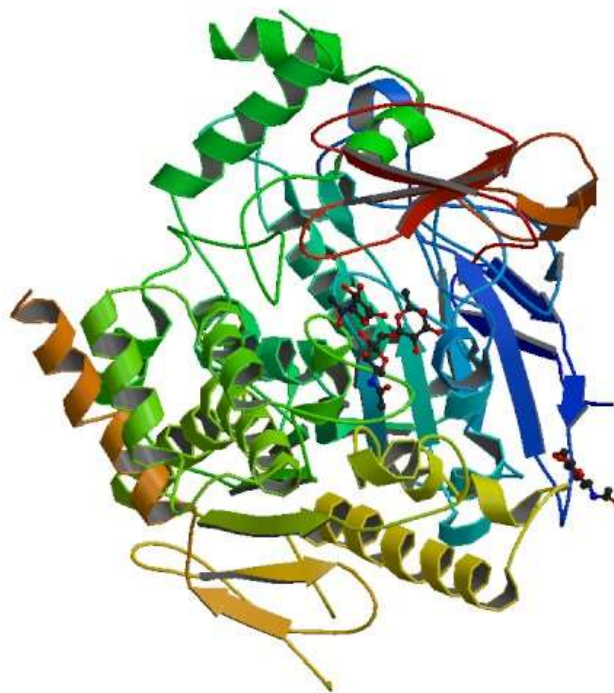


Рисунок 1.3 – Тривимірна модель молекули ацетилхолінестерази

Ранні кінетичні дослідження виявили два субсайти активного центру фермента [11]: “аніонний”, який здатний взаємодіяти з різними позитивно зарядженими молекулами, зокрема із четвертинною групою холіну та різними інгібіторами гідролази, такими як едропоніум і N-метилакридініум та “естерний” сайт, котрий власне відповідає за каталіз реакції гідролізу естерного зв'язку ацетилхоліну. Даний сайт за будовою подібний до серинових протеаз, що сприяло виникненню хибної думки, щодо наявності протеазної активності, як неklasичної функції ферменту. Окрім вище описаних активних сайтів, було виявлено кілька периферичних “аніонних” центрів зв'язування для холіну та інших заряджених четвертинних лігандів. Розенберрі та його співробітники [12] показали, що ацетилхолін тимчасово зв'язується з периферичним активним сайтом як перший крок його каталітичного шляху, і що таке зв'язування при більш високих концентраціях ацетилхоліну спричиняє інгібування ензиму. Однак при менших концентраціях ацетилхоліну зв'язування субстрату з периферичним активним

сайтом може фактично прискорити етап ацилювання в каталітичному шляху.

При інгібуванні АцХЕ звільнення рецепторів від ацетилхоліну відбувається дуже повільно, і передача нервових імпульсів блокується. Це викликає дезорганізацію багатьох процесів в організмі.

Бутирилхолінестераза - глікопротеїд з молекулярною масою близько 300 кДа (рис.1.4), який забезпечує гідроліз як ацетилхоліну, так і естерів холіну з різними аліфатичними та ароматичними кислотами та виконує в організмі захисні функції. БуХЕ характеризується високою реакційною здатністю зв'язувати різноманітні токсини, що інгібують ацетилхолінестеразу. Вона утворюється в печінці і, надходячи в кров, легко руйнує сполуки, які є низькомолекулярними складними ефірами, в тому числі ацетилхолін та деякі ліки, наприклад новокаїн, дикаїн, дитилін, атропін, тощо. Взаємодія ацетилхоліну з холінорецепторами змінює проникність постсинаптичних мембран для іонів. Іони натрію входять у клітину, а іони калію виходять з неї, мембранний потенціал знижується (деполяризація), клітина збуджується. У нейроні збудження у вигляді потенціалу дії поширюється аксоном. Майже одночасно ацетилхолін руйнується і рецептори звільняються, полярність мембрани відновлюється (реполяризація), і нормалізується вміст натрію та калію – за рахунок функції натрієво-калієвого насоса надмірна кількість натрію виводиться з клітини в обмін на калій.

Інгібітори холінестераз - це потужні токсини, вплив яких у великих концентраціях на організм людини може призвести до смерті від судом дихальної мускулатури. В якості інгібіторів холінестераз можуть виступати отруйні речовини нервово-паралітичні дії (зарин, зоман, табун, VX), деякі ліки від хвороби Альцгеймера (галантамін, гуперзін, донепезил, ривастигмін), пестициди (карбофуран, хлорофос, параоксон, малаоксон), а також природні токсини (афлатоксини, глікоалкалоїди, тощо).

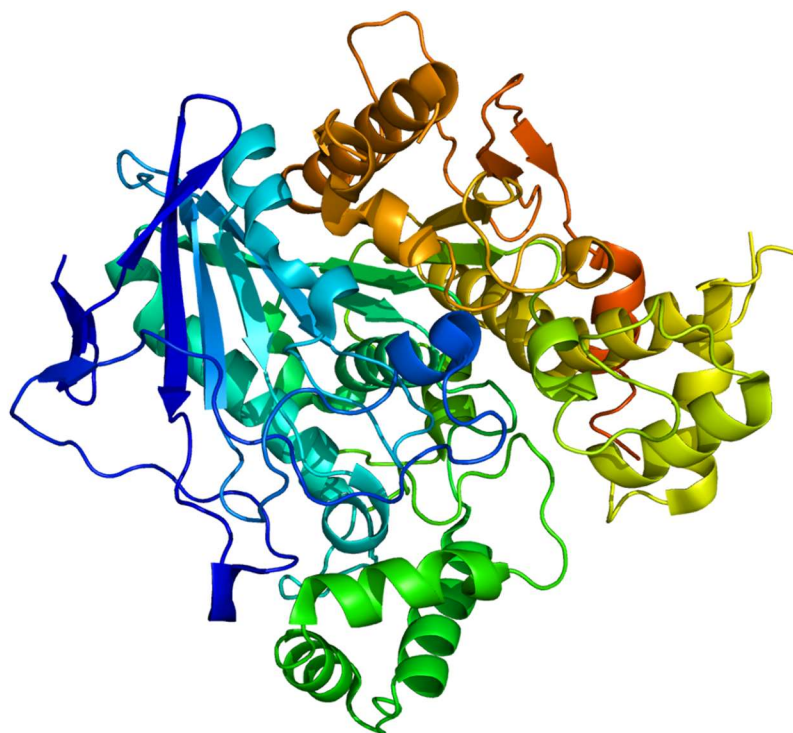


Рисунок 1.4 – Тривимірна модель молекули бутирилхолінестерази

1.3 Електрохімічні датчики як фізичні перетворювачі біосенсорів

Всі перетворювачі, що використовуються при розробці біосенсорів можна розділити на такі основні групи (рис. 1.2):

- електрохімічні, які вимірюють зміни електричного сигналу [13];
- оптичні - вимірюють зміну оптичних властивостей [14];
- калориметричні - вимірюють невеликі зміни температури [15];
- акустичні - вимірюють зміни акустичних властивостей сенсора [16].

Серед можливих способів детектування, електрохімічна детекція забезпечує високу чутливість та специфічність, а також можливість мініатюризації, що дає змогу створювати компактні та портативні пристрої для аналізу [13].

Прогрес в області нанотехнологій, мікроелектроніки і мікрофлюїдики дозволили мініатюризацію електрохімічних біосенсорів та виготовлення масивів з високою щільністю, що є особливо цікавим для паралельного моніторингу декількох хімічних речовин або параметрів в реальному часі, чи моніторингу одного параметра в декількох зразках [17]. Мініатюризація чутливих платформ

може забезпечити ряд переваг: зменшення як біорецептора, так і кількості зразку, що аналізується, збільшення чутливості та пропускну здатності аналізу. Крім того, невеликий розмір добре підходить для проектування портативних біосенсорів, особливо для потреб аналізу в польових умовах. В останні роки, для розробки електрохімічних біосенсорів, особлива увага приділялась інтеграції наноматеріалів, зазвичай це наночастинки золота або наноматеріали на основі вуглецю (наприклад карбонові нанотрубки та графен) [18].

Як правило, електрохімічні методи організовані в три основні категорії відповідно до того, що саме реєструється: струм, потенціал або провідність [4]. Амперометричні - вимірюється протікаючий струм при сталій напрузі [19]; потенціометричні - вимірюється зміна потенціалу при сталому струмові [20]; кондуктометричні - вимірюється зміна провідності між двома електродами [21].

1.3.1 Амперометричні біосенсиори

Амперометричні біосенсиори – самий великий та успішний в плані комерціалізації клас приладів біомолекулярної електроніки. Перші дослідження в галузі амперометричних біосенсорів, були ініційовані Кларком, який опублікував у 1956 році роботу по кисневому електроду [22]. Базуючись на цих експериментах, він разом з Ліонсом зробив доповідь на симпозіумі Нью-Йоркської Академії Наук, де запропонував як „зробити електрохімічний сенсор більш розумним”, додавши до нього „ензимний перетворювач у вигляді мембранного сендвічу”. Ця концепція була ілюстрована експериментами, в яких глюкозооксидаза розміщувалася на чутливій поверхні кисневого „електроду Кларка”, покритій напівпроникною діалізною мембраною, та відділяли від вимірюваного розчину додатковою діалізною мембраною [23]. В цій же роботі Кларк і Ліонс вперше ввели поняття „ензимний електрод”, яке помилково приписується багатьма авторами Апдайку і Хіксу [24], які в подальшому розвили цю концепцію і застосували для створення біосенсора включений в гель ензим. Вони ж першими детально описали ензимний глюкозний електрод, що виявився більш простим за кларківський, та мав більш

високу операційну стабільність. Ці перші роботи і заклали основи успішного розвитку амперометричних біосенсорів.

В загальному випадку амперометричний метод базується на вимірюванні струму, що тече через електрохімічну комірку при постійно прикладеному потенціалі. Амперометричний перетворювач частіше за все складається з трьох електродів. Двохелектродні системи також використовуються і навіть бувають кращими у прикладних аспектах застосування і комерціалізації (рис. 1.5).

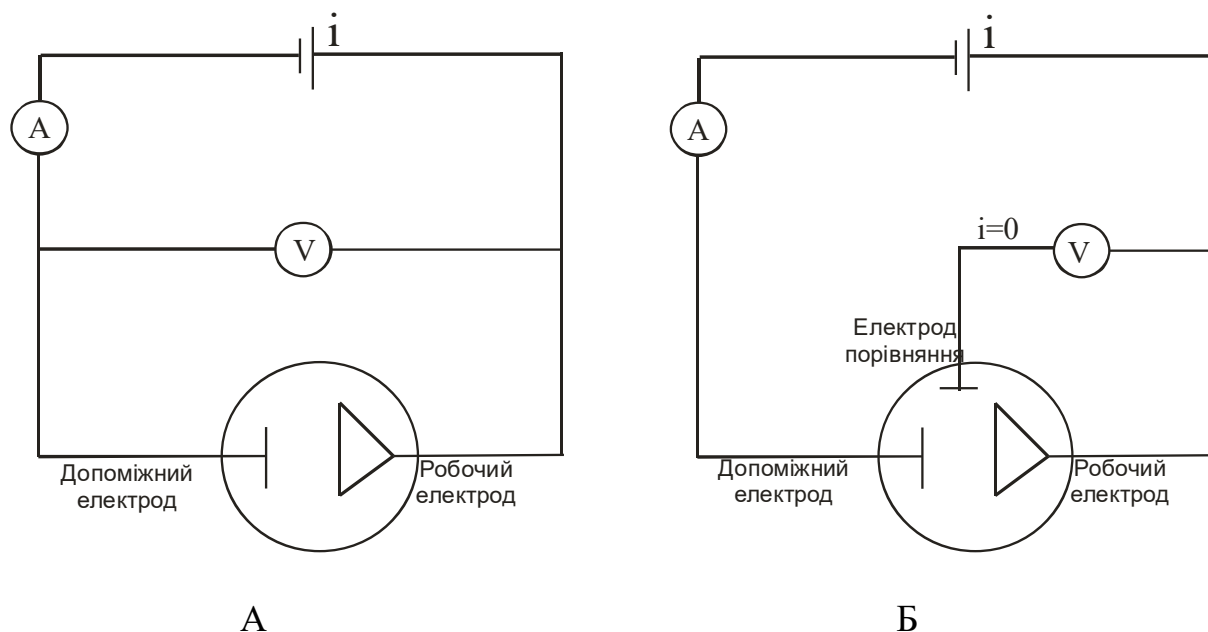


Рисунок 1.5 – Схематичне зображення двухелектродної (А) та трьохелектродної (Б) схем підключення для амперометричних вимірювань

Один із електродів – це робочий електрод, на який наноситься біологічно чутливий шар. Коли прикладається позитивний потенціал, то всі молекули, які окислюються на поверхні електроду, віддають свої електрони електроду. Таким чином відбувається перехід електронів із розчину до електроду. При відсутності другого електроду генерувалася б велика різниця потенціалів із-за стехіометричного розбалансу системи. Допоміжний електрод таким чином виконує функцію завершення ланцюга, і електрони під дією прикладеної напруги через зовнішній ланцюг повертаються назад в розчин (рис. 1.5А). Очевидно, що це призводить до процесу відновлення на допоміжному електроді, еквівалентному по величині процесу окислення на робочому електроді. Такий потік електронів і

формує струм амперометричного перетворювача. Найбільш придатними електродними матеріалами для амперометричних перетворювачів є різні форми вуглецю та благородні метали. Але двохелектродна схема підключення має один суттєвий недолік. Коли між двома електродами прикладається напруга, то, як було відмічено раніше, струм генерується одразу на двох межах розподілу електрод/розчин. Тобто ми не знаємо точно, який електрод пари є визначним у вимірюванні струму, і яка частина потенціалу губиться на поверхні кожного з двох електродів. Цей струм також можна визначити як баланс між двома електродами. Але для цього необхідно, щоб допоміжний електрод не лімітував загального струму, і щоб на його поверхні дуже швидко проходила реакція. Досягається це при використанні для допоміжного електроду поверхні значно більшої площі у порівнянні з робочим електродом.

Цей недолік зникає, якщо ми використовуємо трьохелектродну схему підключення (рис. 1.5Б). В цьому випадку третій електрод системи – це електрод порівняння, який повинен мати в своєму складі матеріал відомого хімічного складу, що включає обидві форми редокс-пари. Зазвичай це насичений каломельний електрод (Hg/HgCl_2) чи хлор-срібний електрод (Ag/AgCl). Таким чином прикладений потенціал є фіксованим, і електрод порівняння приймає стабільну точку, відносно якої вимірює робочий електрод. Тобто прикладений потенціал підтримується між робочим електродом і електродом порівняння, а струм вимірюється між робочим і допоміжним електродами.

Амперометричні біосенсори розділяються на три основних класи, які відповідають різним генераціям пристроїв.

В основі першої генерації лежить електроактивність субстратів і продуктів ферментативної реакції. Під час ензиматичної реакції відбувається поглинання субстратів та утворення продуктів. Якщо вони електроактивні, то відповідно їх концентрація може безпосередньо вимірюватись за допомогою амперометричного електрода. Класи ензимів, що, в більшості, каталізують такого типу реакції, - це оксидази та дегідрогенази. Також можуть застосовуватись гідролітичні ензими, якщо під час реакції продукуються електроактивні частинки (наприклад лужна

фосфатаза). До цієї ж групи амперометричних біосенсорів відносяться сенсори, на поверхні яких коїмобілізовано одночасно кілька ферментів. В такій системі продукт однієї ензиматичної реакції є субстратом для наступної реакції. Але кінцевим продуктом реакцій завжди повинна бути електроактивна речовина.

Головні недоліки цієї групи сенсорів – це високий прикладений до електродів робочий потенціал, та інтерференція з електроактивними неспецифічними частинками, що знаходяться в зразках. До того ж, амперометричний метод неможливо застосувати при використанні холінестераз, тому що в ході ензиматичної реакції не відбувається утворення електроактивних частинок. Це можливо при використанні додаткового ензиму холіноксидази, коли в ході ензиматичної реакції утворюється електроактивний перекис водню.

Друга генерація приладів основана на використанні медіаторів як переносників електронів. Це дозволяє працювати з більш низькими потенціалами, тим самим зменшуючи вплив кисню на відгук (випадок оксидаз) і, в деякій мірі, вирішуючи питання впливу різних інтерферуєчих часток. Медіатори можна добавляти у вимірювальний розчин чи іммобілізувати на поверхню електроду. Перший варіант більш простий, але не є технологічним. До того ж низка органічних барвників, таких як фталоціанін, метиленовий синій чи фіолетовий, є нестабільними у відновленні, токсичними, рН-залежними і здатними до самоокислення. Оптимальний варіант – це іммобілізовані медіатори, який до того ж є більш технологічним.

При виборі медіаторів завжди необхідно враховувати такі фактори: потенціал, що прикладається, повинен бути меншим потенціалу відновлення кисню; електронний перенос між відновленим медіатором і ферментом повинен бути дуже швидким; відновлений медіатор не повинен реагувати з киснем; медіатор не повинен залежити від рН та повинен бути нетоксичним. Якщо задовольнити всім цим умовам, то ми отримаємо амперометричний біосенсор з аналітичними характеристиками, що дозволять працювати в реальних умовах протягом довгого часу.

В основі третьої генерації амперометричних біосенсорів лежить прямий перенос електронів між ензимом і електродом. Цей процес також часто називають біоелектрокаталізом. Основні властивості, що характеризують амперометричні біосенсиори на основі прямого переносу електронів та відокремлюють їх від інших амперометричних сенсори в окремий клас, пов'язані з каталітичною природою процесу в цілому, коли перенос електрону з електрода на молекулу субстрата і навпаки має місце безпосередньо через активний центр ензиму при відсутності всяких переносників електронів.

Електрохімічна активація редокс-ензимів і наступний прямий перенос електронів між ензимом і електродом є особливо важливими при розробці та створенні амперометричних біосенсори. Ці сенсори мають наступні важливі переваги: висока чутливість завдяки високій щільності струму, яка може дозволити мініатюризацію електродів; значне зменшення інтерферуючих неспецифічних відгуків завдяки ефективній активації редокс-ферменту, що може призвести до створення високоселективних чутливих біосенсори.

При виборі матеріалів і технологій для виготовлення амперометричних перетворювачів необхідно враховувати дизайн датчика, особливості його конструкції, необхідні матеріали, метод подальшої іммобілізації біоселективного матеріалу і методику роботи з готовим приладом.

Але амперометричний метод неможливо застосувати при використанні холінестераз напряду, тому що в ході ензиматичної реакції не відбувається утворення електроактивних частинок. Це можливо при застосуванні додаткових ензимів, які каталізують ензиматичні реакції за участю продуктів першої реакції. Таким ензимом, наприклад, може бути холіноксидаза, яка каталізує ензиматичну реакцію за участі холіну, що утворюється в ході реакцій за участі холінестераз.

1.3.2 Кондуктометричні біосенсиори

Кондуктометрія - це метод, при якому електрохімічні електродні реакції не проходять зовсім, чи є допоміжними і ними нехтують. В зв'язку з цим в кондуктометричному методі величезне значення має така властивість розчинів

електролітів як провідність, а до зміни провідності призводить дуже широкий клас ензиматичних реакцій.

Провідність рідин - результат дисоціації розчиненої речовини (електроліту) на іони та міграції їх під дією електричного поля. При проходженні електричного струму через електроліти, останні розкладаються на групи атомів чи атоми, що представляють собою частини молекули розчиненої речовини, а саме іони.

При накладанні різниці потенціалів на електроди в середині електроліту утворюється електричне поле. При цьому на хаотичний рух іонів накладається упорядкований рух іонів різних знаків в протилежні напрямки: негативно-заряджені рухаються до аноду, позитивно-заряджені - до катоду. Струм в електроліті, таким чином, обумовлений рухом іонів до електродів, на яких відбувається їх нейтралізація та утворення нейтральних атомів (чи молекул).

Провідність розчину електроліту залежить від концентрації та рухливості його іонів. Під час біоспецифічної реакції можуть утворюватись нові іони, може змінюватись концентрація іонів, а також - їх рухливість. Все це приводить до зміни провідності розчину, що і реєструється кондуктометричним датчиком.

Кондуктометричний перетворювач являє собою двоелектродний мініатюрний пристрій для вимірювання провідності тонкого шару електроліту, який прилягає до поверхні електрода. В комплексі з нанесеною на його поверхню біологічно активною мембраною датчик перетворюється в кондуктометричний біосенсор [25].

В найбільш загальному вигляді тонкоплівчастий кондуктометричний біосенсор схематично може бути представлений, як зображено на рис. 1.6.

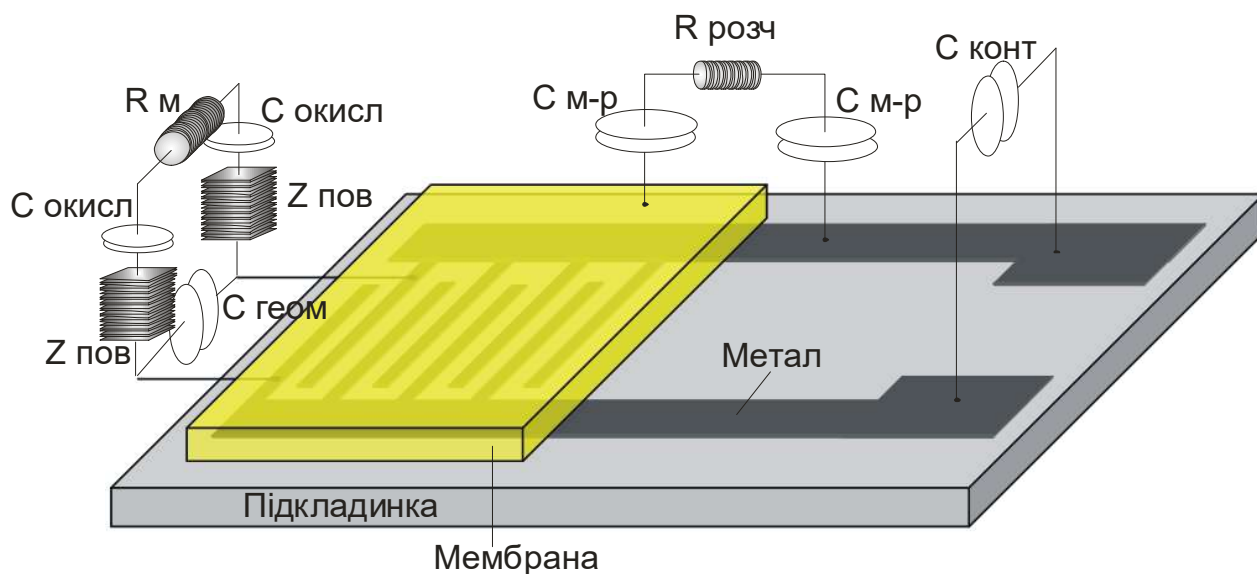


Рисунок 1.6 – Схематичне представлення кондуктометричного біосенсора

Фізико-хімічні процеси, що протікають в електрохімічній комірці з кондуктометричним біосенсором, моделюються такою еквівалентною схемою (рис. 1.7).

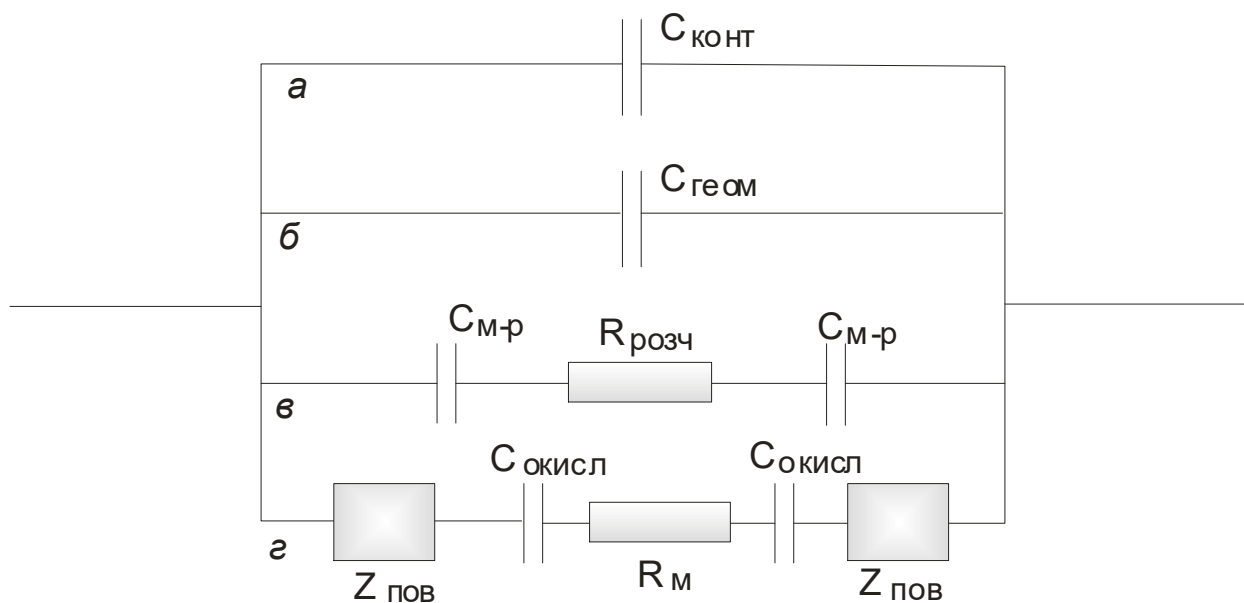


Рисунок 1.7 – Еквівалентна схема, що моделює фізико-хімічні процеси в електрохімічній комірці з кондуктометричним біосенсором

Розберемо представлену схему.

Ланцюг a - $C_{\text{конт}}$ - ємність контактних площин та дротів, за допомогою яких здійснюється з'єднання електродів з вимірювальною системою. Ця величина, як

правило, залежить від матеріалу площин та дротів і змінюється від 0,1 до 1 пФ, тобто в цій системі цим ланцюгом можна знехтувати.

Ланцюг b - $C_{\text{геом}}$ - геометрична ємність самих металевих гребінок перетворювача. Ця величина, як правило, залежить від матеріалу гребінок, їх геометрії та розмірів і змінюється від 0,1 до 1 пФ, тобто в цій системі цим ланцюгом теж можна знехтувати.

Ланцюг v - електрохімічний імпеданс системи, що описує область поза мембраною. Він складається з двох однакових ємностей $C_{\text{м-р}}$, що відповідають за межу розподілу мембрана/розчин, та опору $R_{\text{розч}}$, що моделює провідність розчину в області поза мембраною.

Ланцюг z - електрохімічний імпеданс системи, що описує область всередині мембрани. Він складається з двох однакових поверхневих імпедансів $Z_{\text{пов}}$, що моделюють межу розподілу електрод/розчин, двох однакових ємностей $C_{\text{окисл}}$, що моделюють окис матеріалу електродів та опору $R_{\text{м}}$, що моделює провідність розчину всередині мембрани.

У випадку біосенсорів товщина мембрани після набухання у розчині складає близько 200 мкм, а активна електрична область електродів має величину трьох характеристичних розмірів електродів, вона менше 210 мкм, тому що максимальна характеристична величина електродів, що використовували в роботі - 70 мкм. Тобто для кондуктометричного ферментного біосенсора ланцюгом v теж можна знехтувати.

У випадку експериментів з кондуктометричними перетворювачами без нанесеної мембрани тим більш можна знехтувати ланцюгом v .

Таким чином досить складна еквівалентна схема, що моделює процеси в комірці з кондуктометричним перетворювачем, перетворюється на простішу, яка складається тільки з одного ланцюга z , тобто основний внесок в формування відгуку сенсора вносить електрохімічний імпеданс системи металевий електрод в розчині (рис. 1.8).

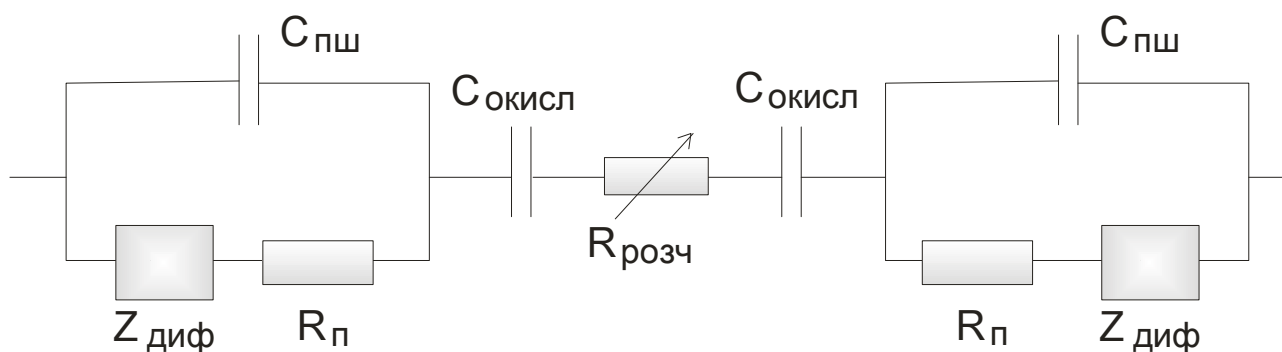


Рисунок 1.8 – Спрощена еквівалентна електрична схема, що моделює фізико-хімічні процеси в комірни з кондуктометричним перетворювачем

Таким чином електрохімічний імпеданс системи кондуктометричний перетворювач в розчині формується з:

1. $C_{\text{пш}}$ - ємності подвійного електричного шару, яка, як правило, складає 10 - 20 мкФ/см^2 , є кількісним визначенням орієнтованих диполів на поверхні електроду та не залежить від частоти змінного струму [26];
2. $R_{\text{п}}$ - опору перетину, який відповідає за хімічну поляризацію, яка спричиняється електрохімічними реакціями на поверхні електроду та не залежить від частоти змінного струму [27].
3. $Z_{\text{диф}}$ - дифузійного чи «варбурговського» імпедансу, який відповідає за концентраційну поляризацію, яка спричиняється за рахунок дифузії іонів з границі розділу в об'єм електроліту та залежить від частоти змінного струму [28].
4. $C_{\text{окисл}}$ - ємності окислу матеріалу електродів.
5. $R_{\text{розч}}$ - опору електроліту, що моделює провідність розчину всередині мембрани.

Якщо вимірювання проводяться при частоті більше 10 кГц, то тоді значенням дифузійного імпедансу можна знехтувати, і основний вклад в загальний електрохімічний імпеданс системи дають опір розчину, ємність подвійного шару та опір перетину [29].

Були випробувані різні матеріали для виготовлення електродів [30]: платина, золото, алюміній, нікель, мідь, титан, хром, срібло та вуглець. Всі ці матеріали придатні для виготовлення кондуктометричних електродів. Для виготовлення

перетворювачів, як правило, використовують мікроелектронні методики, такі як фотолітографія та вакуумне напилення [31].

Перший кондуктометричний біосенсор для визначення сечовини було описано в роботі [32]. Експерименти було проведено як в лабораторних так і в клінічних дослідженнях і відгук біосенсора на сечовину був в діапазоні 0,1 - 10 мМ в 5 мМ імідазольному буфері, рН 7,5. Результати лабораторних досліджень за допомогою біосенсору було порівняно з загальноприйнятими клінічними експериментами та показано добре співвідношення між ними (коефіцієнт кореляції більше 0,99).

Подібний кондуктометричний біосенсор було використано також як мультисенсор [33]. На поверхню однієї пари електродів датчика в шарі гелю було іммобілізовано уреазу, другої пари - L-аспарагіназу, а на поверхню третьої пари електродів - трьох-ферментну систему уреазу - креатіназу - креатініназу. Такий мультисенсор було використано для визначення сечовини, L-аспарагіну та креатініну відповідно. Сенсор було тестовано як з кожним субстратом поодиноці, так і в мультирежимі, отримано кінетичні та калібровочні криві.

В роботі [34] описано кондуктометричний біосенсор для визначення вмісту сечовини в складі мультисенсору разом з амперометричним для визначення концентрації глюкози. Прилад характеризувався високою селективністю і простотою у використанні. Його було використано для клінічних досліджень. Міккельсеном та співавторами було охарактеризовано кондуктометричні біосенсиори для визначення сечовини та D-амінокислот [35]. Біосенсор було виготовлено з використанням ферментів уреазу та оксидази D-амінокислот. Сенсор показував стабільні результати протягом 33 днів. Два типи кондуктометричних товстоплівчастих біосенсорів для визначення сечовини описано в роботі [36]. Перший тип сенсорів виготовлено друкуванням двох гребінчастих електродів на Al_2O_3 підкладинці використовуючи платинову пасту, другий - за технологією „green tape”. Було показано можливість використання такого типу приладів у медичному аналізі.

Кондуктометричний біосенсор на основі інгібіторного аналізу для визначення фосфорорганічних пестицидів вперше описано в роботі [37]. Як чутливий елемент використовували ензими ацетилхолінестеразу та бутирилхолінестеразу. В роботі вивчено залежність величини відгуку біосенсору від часу інкубації сенсора в розчині пестицидів, а також показано можливість відновлення активності ферменту в мембрані, використовуючи реактиватор пірідин-2-альдоксим метйодид, зроблено висновок про можливість використання описаних біосенсорів для аналізу органофосфорних пестицидів у розчинах.

Кондуктометричні біосенсори також демонструють ряд переваг у порівнянні з іншими типами сенсорів. Це, перш за все, використання недорогої стандартної тонкоплівчастої технології для їхнього виготовлення, яка разом з застосуванням методики іммобілізації біологічного матеріалу, оптимізованої для умов технологічного процесу, дозволяє значно зменшити вартість аналізу завдяки зменшенню собівартості таких пристроїв. Також для інтегральних біосенсорів легко забезпечити диференційний режим вимірювань, що дозволяє значно підвищити точність вимірювань завдяки компенсації зовнішніх впливів на систему.

1.3.3 Потенціометричні біосенсори

У потенціометричному методі детекції вимірюється потенціал на поверхні сенсора (зазвичай в мембрані). Традиційно при вимірюваннях використовується малий або нульовий струм [38]. Потенціометричні біосенсори використовують іон-селективні електроди з метою отримання потенціального сигналу для конкретних іонів, таких як H^+ , K^+ та Ca^{2+} . Біосенсори на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) є типовим представником потенціометричних біосенсорів.

Перший ІСПТ (ISFET в англійському варіанті) був коротко описаний Бергвельдом в роботі [39], де його використовували для електрофізіологічних вимірювань іонного складу в нервових тканинах. В 1972 р. в роботі [40] ця ідея була втілена в життя і детально описана. Сьогодні більшість вчених цитує її як першу публікацію в галузі розробки потенціометричних сенсорів. Перший

описаний ІСПТ складався із традиційного транзистора на основі МДН (метал/діелектрик/напівпровідник), затвор якого було замінено розчином. Десь в той же час Мацуо і Вайс застосували як чутливий підзатворний шар нітрід кремнію, що призвело до значного покращення характеристик отриманого датчика [41]. Саме ці перші роботи і поклали початок інтенсивним дослідженням в галузі розробки ІСПТ.

В цілому за 50-річний період досліджень в галузі розробки іон-селективних польових транзисторів опубліковано більш ніж 1000 статей, що стосуються різних аспектів їх створення. Таку увагу даним сенсорам можна пояснити перш за все тим, що для їх виготовлення завжди використовується напівпровідникова технологія, що в свій час забезпечила стрімкий прогрес в мікроелектроніці. Останні досягнення у виготовленні планарних і непланарних структур мікрометрових і субмікронних розмірів на базі монокристалічного кремнію, глибокі знання про механічні і електричні властивості останнього дозволили придати імпульс цьому новому напрямку аналітичної біотехнології [42, 43]. Історія використання кремнію при створенні широкого спектру сенсорів добре описана в огляді [44].

Крім того, групова технологія інтегральних схем (ІС) є найкращим засобом зниження собівартості окремого приладу при налагодженому їх масовому виробництві. Вона забезпечує можливість інтеграції і суміщенню на одному чипі обчислювальних і детектуючих засобів з буферною електронною схемою обробки і довгочасного зберігання інформації.

Іон-селективний польовий транзистор представляє з себе класичний МДН польовий транзистор з затвором у вигляді електроду порівняння, який відділено від самої структури, і з'єднується з затворною областю через водний розчин (рис. 1.9).

У кремнієвій підкладинці з дірковою провідністю (p-Si) створено області з електронною провідністю (n^+ -області, а саме n^+ -витік та n^+ -стік). Над каналом між ними розміщено управляючий електрод-затвор, який відділено від підкладинки шаром підзатворного діелектрика.

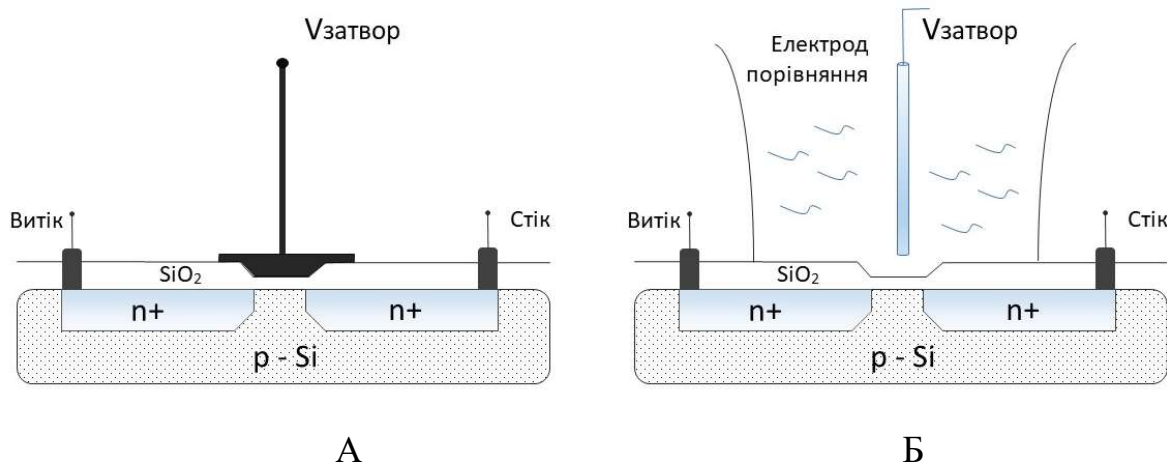


Рисунок 1.9 – Схематичний вигляд МДН ПТ (А) та ІСПТ (Б)

Більшість матеріалів, чутливих до H^+ , є одночасно і ефективними бар'єрами, що чинять протидію дифузії іонів і води. Тому їх часто використовують одночасно як верхній шар підзатворного діелектрика ІСПТ і як капсулюючу речовину, проводячи нанесення на стадії обробки кремнієвої пластини методом хімічного осадження із газової фази чи окислення у сукупності з літографією. Для того ж, щоб придати ІСПТ властивість розрізняти інші хімічні речовини, застосовують іон-селективні мембрани та біоматриці, які наносяться зверху підзатворного діелектрику і прикріплюються до нього фізико-хімічною адгезією. В цьому випадку саме такі додаткові біологічні мембрани є селективними до необхідної речовини і відповідають за утворення продукту, який можна зареєструвати. Ці датчики перетворюються в біосенсиори за рахунок приєднання до них біологічного елемента, такого як фермент, який каталізує реакцію, яка формує певні іони.

Основні технології, що застосовуються при створенні ІСПТ, - це класичні мікроелектронні технології інтегральних схем. Інтегральні схеми будуються із тонких шарів (звичайно їх товщина не перевищує 1 мкм) металів, напівпровідників і діелектриків різної форми на підкладинці, як правило, кремнієвій. Ключовими при їх виготовленні є виробництво шаблонів, формування малюнку і етапи (фото)хімічної обробки пластини. Отримання інтегральних структур (ІС) може

включати до 10 і більше процесів (фото)літографії. Загальна кількість технологічних операцій при виготовленні, наприклад, польового транзистора складає біля 30. Сюди входять термоокислення кремнію, іонна імплантація поверхні пластини через маску, іонна дифузія, осадження діелектричних шарів із газової фази, напилення металу, проміжні обробки.

Оскільки ІСПТ є в принципі МДН ПТ, то при їх виробництві застосовують ті ж технології. Різниця стосується тільки затворної області. Більшість ІСПТ мають стік, витік і затвор на одній стороні чипу, однак існують ІСПТ з рознесеними по різні боки підкладинки стік-витіком і затвором [45]. Дуже важливим елементом є вибір зовнішнього затворного діелектрика, який розміщується зверху оксиду кремнію. Цей матеріал повинен бути чутливим і селективним до іонів, що тестуються, бути добрим пасиватором поверхні кремнію і захищати від гідратації і міграції іонів до поверхні напівпровідника. Перш за все досліджували класичні матеріали мікроелектроніки, такі як Si_3N_4 [46], Al_2O_3 [47, 48], Ta_2O_5 [47, 49], ZrO_2 [50].

Найбільш розповсюдженим і простим та зручним діелектричним матеріалом з практичної точки зору є оксид кремнію (SiO_2) [42]. Існує цілий ряд технологічних методів створення плівок SiO_2 , що мають невеликі величини концентрації поверхневих станів та малу кількість рухливих зарядів, і відрізняються високою якістю. Але отримання дуже якісних плівок SiO_2 пов'язано з технічними та технологічними труднощами, що не завжди економічно виправдано. В зв'язку з цим як діелектрик часто використовують нітрид кремнію (Si_3N_4). Цей матеріал має ряд переваг у порівнянні з SiO_2 - більш високу величину діелектричної проникності та, відповідно, вищу електричну міцність. Це дозволяє використовувати більш тонкі шари діелектрика, що дуже важливо для мікроелектроніки, тому що при методі фотолітографії дає кращу роздільну здатність. Важливою перевагою Si_3N_4 є його непроникність для іонів натрію, а основним недоліком - велика густина поверхневих станів. Спроба використати переваги обох матеріалів (SiO_2 , Si_3N_4) призвела до створення двошарового діелектрика ("сендвіча"). Кремній покривається спочатку шаром оксиду кремнію, а потім - нітриду кремнію.

Нестабільність структур з плівкою SiO_2 при цьому значно зменшується. Все це відноситься як до структур з тонким шаром оксиду кремнію (50-100 Å), так і з товстим шаром (700-1000 Å). Нанесення шару нітриду кремнію призводить також до зменшення густини поверхневих станів до величин $<10^{12} \text{ см}^{-2} \cdot \text{eV}^{-1}$. При цьому на вольт-фарадних характеристиках цих структур гістерезис практично відсутній аж до величини напруженості поля $\geq (3-4) \cdot 10^6 \text{ В см}^{-1}$, при якій вже з'являється гістерезис іонного типу.

Такі діелектричні плівки в біосенсорах, які наносяться на напівпровідник, грають як роль рН-чутливої мембрани, так і роль пасивного елемента (власне діелектрика). Це призводить до досить жорстких вимог до їхньої якості. До того ж важливим є той факт, що площа контакту сенсора з електролітом може бути відносно великою (від одиниць до десятків мм^2). Для оптимізації якості таких діелектричних плівок було досліджено ряд багат шарових матеріалів, що використовують шари Ta_2O_5 , Si_3N_4 та SiO_2 . Було досліджено шар Ta_2O_5 , отриманого термічним окислюванням у середовищі кисню при температурі 400°C і шар Si_3N_4 , отриманого в реакторі атмосферного тиску [51]. Характерний вид залежності струмів збігання через багат шаровий діелектрик від напруги, що прикладається, показаний на рис. 1.10. Видно, що при катодній поляризації напівпровідника щодо електроліту в районі від -1 В до -1,5 В спостерігається різке збільшення струму (під мікроскопом помітні бульбашки газу, що виділяється), що свідчить про наявність мікропор у цих матеріалах. Для різних типів дво шарових діелектричних плівок на поверхні кремнію за допомогою методу електролітичного осадження міді в порах захисного матеріалу було проведено дослідження по визначенню пористості матеріалів.

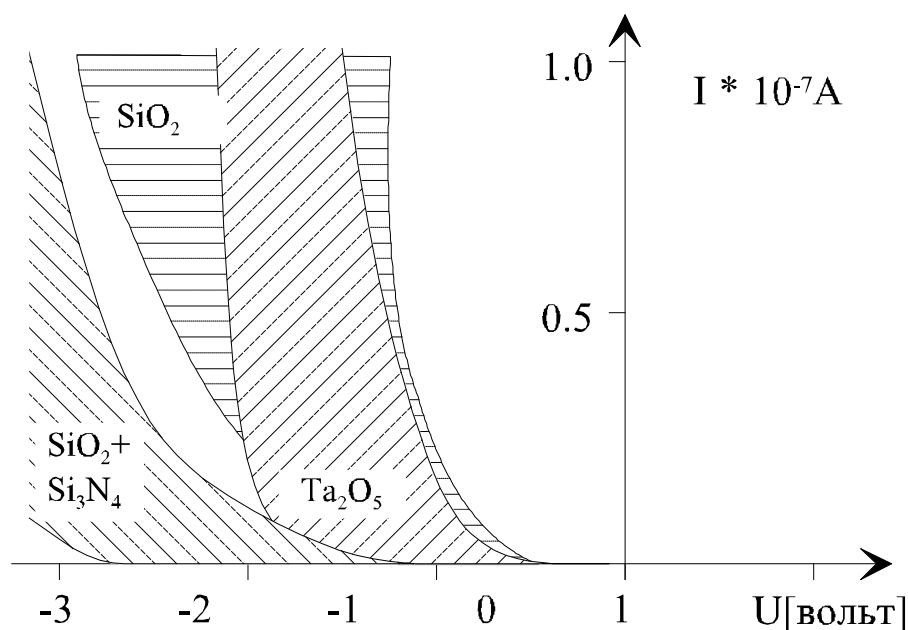


Рисунок 1.10 – Залежність струму збігання від напруги для різних типів діелектричних шарів

Найкращі значення були отримані для діелектричного матеріалу, що складається з термічної плівки оксиду кремнію товщиною 40 нм, отриманої “сухим” окислюванням, і плівки нітриду кремнію товщиною 100 нм, отриманої в реакторі зниженого тиску за температури 850 °С. Ця сендвіч структура і була вибрана для подальших експериментів. Але відбракування діелектричних матеріалів за принципом відсутності пор в реальних умовах дає досить малий вихід зразків для датчиків.

Необхідно також відмітити, що хоча вольт-фарадні характеристики знімаються при прикладанні позитивної напруги, а різке збільшення струму збігання спостерігається при від’ємних значеннях напруги, то ці недоліки діелектричних матеріалів в цілому впливають на загальну стабільність системи, збільшуючи дрейф аналітичних характеристик. Це призводить до неможливості проведення багаточасових досліджень. На рис. 1.11 зображено дрейф напівпровідникових структур з різними діелектриками, який отримано методом розрахунку точки найбільшого перегину вольт-фарадних характеристик при вимірюванні значень поверхневого потенціалу [51].

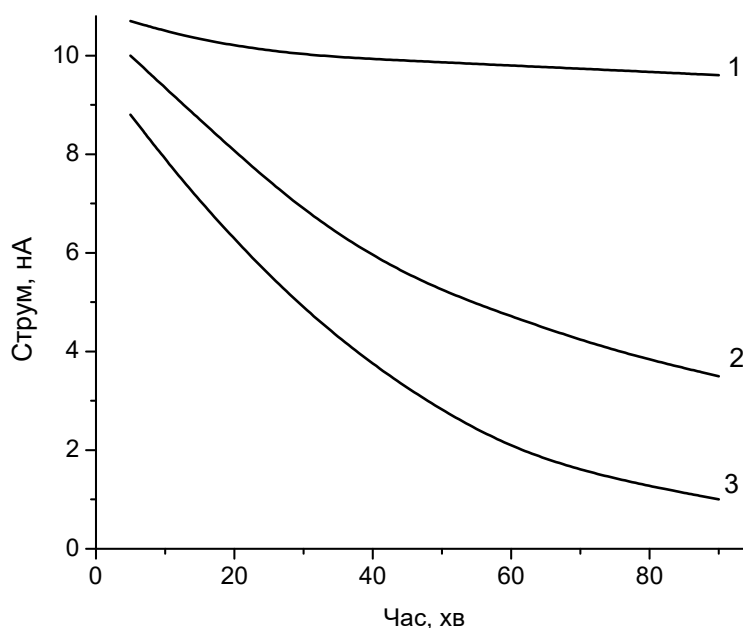


Рисунок 1.11 – Дрейф напівпровідникових структур з різними діелектриками (SiO_2 (40 нм) / Si_3N_4 (80 нм) (1), SiO_2 (80 нм) (2), Ta_2O_5 (80 нм) (3))

З рисунка видно, що кращі результати були отримані для діелектричного матеріалу, що складається з термічної плівки SiO_2 товщиною 40 нм та плівки Si_3N_4 товщиною 80 нм, нанесеної зверху.

В 1980 р. вийшла у світ перша робота по використанню ІСПТ як перетворювача для ензимного біосенсора для визначення пеніциліну [52]. В цьому повідомленні Карас та Яната описали прилад для визначення пеніциліну, який складався з двох рН-чутливих ІСПТ. Один перетворювач був покритий мембраною з ковалентно зв'язаною пеніциліназою і альбуміном, а другий – тільки мембраною з ковалентно зв'язаним альбуміном. Такий прилад вони назвали ензимним польовим транзистором – ЕНПТ (ENFET в англійському варіанті). Коли в розчині був присутній пеніцилін, то пеніциліназа у мембрані каталізувала його гідроліз до пеніцилової кислоти. Це призводило до утворювання протонів і відповідно до локального зменшення величини рН в області затвору, що реєструвалось за допомогою ІСПТ. Було також показано, що подібні ЕНПТ потребують невеликої

кількості ферменту в мембрані і можуть використовуватись багаторазово, що, без сумніву, було великою перевагою у порівнянні з класичним ферментним аналізом.

Практичне застосування ензимних сенсорів на основі ІСПТ ускладнюється тим, що як правило їх відгук залежить від рН середовища, його іонної сили та буферної ємності, а у випадку глюкозного сенсора – ще і від концентрації кисню, косубстрату ензимного перетворення глюкози. Буферна ємність аналізованого розчину, в свою чергу, залежить від рН, відповідно, величина зсуву рН в матриці з іммобілізованим ферментом обумовлена вихідною величиною рН аналізованого зразку.

Дослідження по розробці ензимних біосенсорів на основі ІСПТ проводились в багатьох лабораторіях світу, отримано досить цікаві і перспективні результати. Однак до цих пір не існує успішного комерційного варіанту біосенсора на основі ІСПТ, що свідчить про певні проблеми з його використанням. Але необхідно, перш за все, широко використовувати всі переваги біосенсорів на основі ІСПТ у порівнянні з іншими типами датчиків. Це перш за все використання при їх виготовленні групової технології інтегральних схем, яка є найкращим засобом зниження собівартості окремого приладу при налагодженні їх масового виробництва. Також вона забезпечує можливість інтеграції і суміщення на одному чипі обчислювальних і детектуючих засобів з буферною електронною схемою обробки і довгочасного зберігання інформації.

1.4 Загальні положення про інгібітори ензимів

Інгібітори являють собою молекули, які можуть взаємодіяти з ензимом тим самим впливаючи на його каталітичну активність. Контроль активності ензиму за рахунок використання інгібіторів має широкий спектр застосування. Велика кількість лікарських засобів є інгібіторами ензимів; вони включають препарати для лікування ВІЛ, раку та хвороб серця [53-55]. Інгібітори ензимів також використовуються в сільському господарстві як пестициди та гербіциди [56]. Більшість інгібіторів є природними сполуками [57], але величезну кількість небезпечних інгібіторів було розроблено штучно. Існують різні механізми

інгібування, які мають характерний вплив на ензиматичну кінетику. Інгібітори ензимів розділяють на дві широкі категорії: оборотні та необоротні.

Необоротні інгібітори формують сильні стійкі взаємодії, які можуть бути видалені тільки хімічно. Спершу інгібітор нековалентно зв'язується з ензимом (комплекс EI або ESI), що призводить до інактивації ферменту і утворенню ковалентного комплексу EI* (рис 1.12)

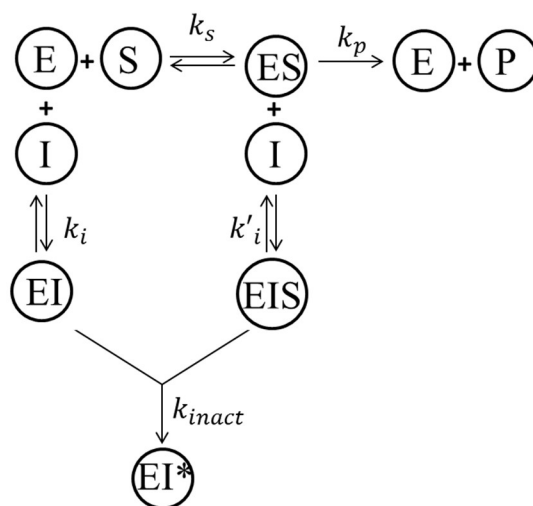


Рисунок 1.12 – Кінетична схема необоротного інгібування

Як правило, необоротне інгібування є наслідком алкілювання або ацилювання залишку амінокислоти в активному центрі. Незоборотні інгібітори можуть виступати в якості отрут. Наприклад, фосфорорганічні пестициди, які використовують в якості інсектицидів, гербіцидів та нервово-паралітичних газів. Аспірин, відомий його використанням в якості знеболюючого та жарознижуючого препарату, інгібує ензим циклооксигеназу шляхом необоротного ацетилювання серина в його активному сайті, запобігаючи синтезу простагландинів та тромбосану [58].

Оборотні інгібітори утворюють слабкі взаємодії з їхнім цільовим ензимом та легко видаляються. Оборотно інгібування досягає стану рівноваги, положення якого визначається константою інгібування (K_i), яка характеризує спорідненість ферменту до інгібітору. Оборотно інгібітори можуть бути додатково класифіковані

відповідно до механізму їх дії: конкурентні, неконкурентні та безконкурентний (чистий та змішаний).

В класичній моделі конкурентного інгібування субстрат (S) та інгібітор (I) зв'язуються із одним і тим же активним центром ензиму (E), конкуруючі за нього (рис. 1.13). Конкурентні інгібітори частіше за все мають схожу структуру із субстратом. Вони блокують активний сайт ферменту та не дають можливості для зв'язування із субстратом.

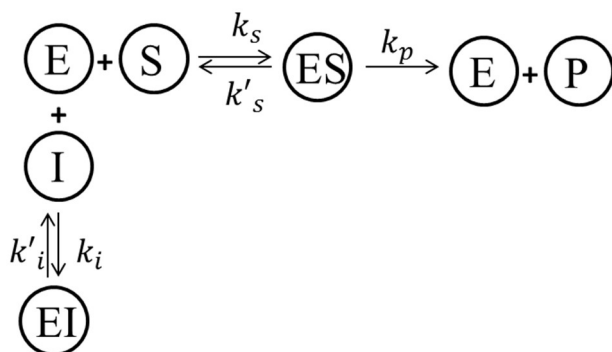


Рисунок 1.13 – Кінетична схема оборотного конкурентного типу інгібування

У цьому випадку початкова швидкість v_0 та уявна константа Міхаеліса-Ментен K_m^{app} визначаються наступним чином:

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m + [S]} \quad (1.1)$$

$$K_m^{app} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m \quad (1.2)$$

Спорідненість ферменту до субстрату знижується в присутності інгібіторів, а значення константи Міхаеліса-Ментен відповідно збільшується. Значення максимальної швидкості (V_{max}) не змінюється, так як насичуюча концентрація субстрату витісняє інгібітор з його комплексу з ензимом (рис. 1.14).

$$K_m^{app} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (1.4)$$

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (1.5)$$

Неконкурентне інгібування протікає краще при високій концентрації субстрату. У всякому разі неконкурентні інгібітори зменшують як V_{max} так і K_m (рис.1.16).

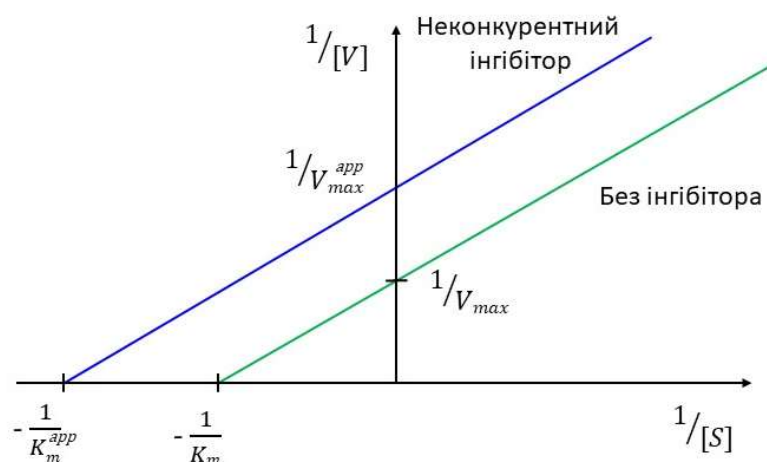


Рисунок 1.16 – Зображення неконкурентного інгібування у подвійних зворотних координатах

Змішаний тип інгібування поєднує в собі особливості як конкурентного так і неконкурентного інгібування. Інгібітор (I) може зв'язуватися або з ензимом (E) або з ензим-субстратним (ES) комплексом і в будь-якому випадку буде утворюватись неактивний комплекс (рис. 1.17). Інгібітор не має одну і ту саму спорідненість до (E) і (ES), що призводить до різних констант рівноваги, K_i і αK_i відповідно. Аналогічним чином, спорідненість субстрату різна для вільного ензиму (E) і для комплексу ензим-інгібітор (EI), що дає константи рівноваги K_m і αK_m , відповідно.

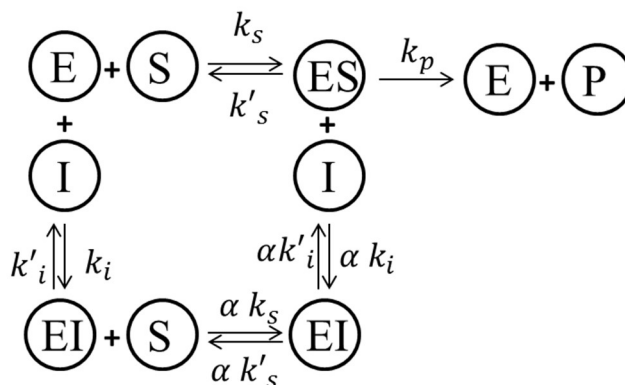


Рисунок 1.17 – Кінетична схема оборотного змішаного типу інгібування

У цьому випадку початкова швидкість v_0 , уявна константа Міхаеліса-Ментен K_m^{app} і уявна максимальна швидкість V_{max}^{app} є наступними:

$$v_0 = \frac{V_{max}}{\alpha'} \cdot \frac{[S]}{\frac{\alpha}{\alpha'} K_m + [S]}, \quad (1.6)$$

$$\text{Де } \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}; \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i} \quad (1.7)$$

$$K_m^{app} = \frac{\alpha}{\alpha'} K_m \quad (1.8)$$

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} \quad (1.9)$$

Як при неконкурентному інгібуванні, змішані інгібітори зазвичай впливають як на K_m так і на V_{max} . Величина V_{max} зменшується, а значення K_m може або зростати або зменшуватись (рис.1.18).

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1.10)$$

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (1.11)$$

Безконкурентні інгібітори зменшують величину V_{max} , але не впливають на величину K_m (рис.1.20).

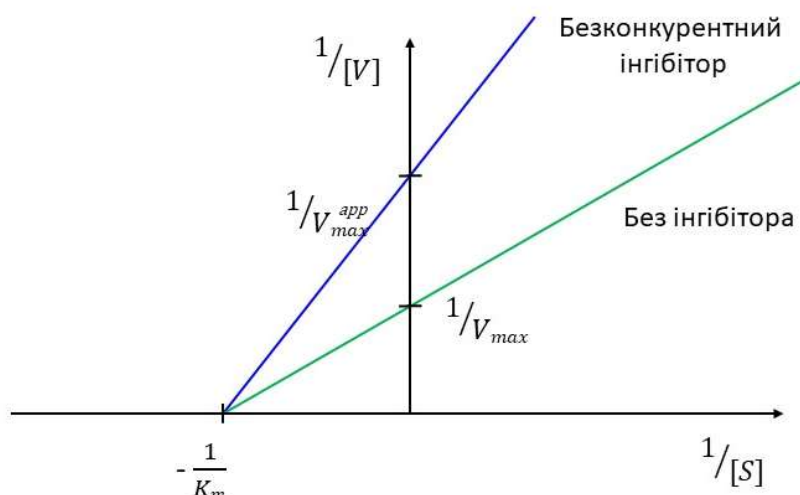


Рисунок 1.20 – Зображення безконкурентного інгібування у подвійних зворотних координатах

1.5 Біосенсори на основі інгібіторного ензимного аналізу для визначення токсичних сполук

В останні роки значно виріс інтерес до визначення сполук, які є інгібіторами ензимів [59].

Перший біосенсор на основі інгібіторного аналізу для визначення нервово-паралітичних речовин (таких як зоман, зарін, паратіон і малатіон) був розроблений у 1962 році [60]. Принцип його роботи оснований на пригніченні активності холінестерази нервово-паралітичними речовинами. З того часу розроблена велика кількість біосенсорів на основі інгібіторного аналізу для визначення різних токсичних речовин. На цю тему останнім часом були опубліковані кілька оглядів

[59, 61]. Вибір системи ензим/аналіт визначається здатністю токсичної речовини інгібувати ензим.

Еволюція числа публікацій, присвячених біосенсорам на основі інгібування ензимів опублікованих в період 1990-2014 рр представлена в огляді [59]. Ці дані були отримані шляхом пошуку елементів за ключовими словами "биосенсор", "ензим" і "інгібування" з використанням баз даних ISI Web, Thomson Reuters та Scopus. У статті повідомляється, що в період 1990-1996 років, кількість публікацій була близькою до 100, в 1997-2002 роках вона збільшилася майже в два рази, в 2003-2008 роках досягла майже 400, в 2009-2014 - майже 500 і продовжує зростати. На теперішній час кількість таких статей сягає майже 800.

Для біосенсорів цього типу, активність ензиму вимірювали до і після інгібування, яка дозволяє оцінити рівень інгібування, який, в свою чергу, пропорційний концентрації токсичної речовини.

У разі необоротного інгібування, після відгуку на субстрат біосенсиори інкубують в розчині інгібітору протягом деякого часу, а потім відмивають від надлишку інгібітора та знову отримують відгук на субстрат.

Оскільки необоротні інгібітори досить міцно зв'язуються з біоселективним елементом, перш ніж біосенсор може бути повторно використаний, він повинен бути інкубований в розчині з реактиватором. Реактиватори ензимів представляють собою речовини, які відновлюють ензиматичну активність шляхом видалення інгібуючих сполук.

У разі оборотного інгібування, інгібітор додається безпосередньо у вимірювальну комірку після отримання відгуку на субстрат. Для повторного проведення процедури вимірювання необхідне тільки промивання біосенсора робочим буферним розчином.

Для розробки біосенсорів на основі інгібіторного аналізу були запропоновані різноманітні ензими, в тому числі лужна фосфатаза, тирозиназа, глюкозооксидаза, уреаза та холінестераза [59, 61].

Так наприклад, є повідомлення про використання лужної фосфатази для визначення ванадію [62, 63], карбофурану [63], фосфатів [64] та кофеїну [65], а

каталазу використовують для інгібіторного визначення нітритів [66]. Афлатоксин В1 визначають за допомогою еластази у складі біосенсора [67]. Глюкозооксидаза була використана для розробки біосенсорів для визначення різних іонів важких металів [68, 69]. Хром вимірювали за допомогою біосенсорів на основі пероксидази [70]. Були запропоновані тирозиназні та фенолоксидазні біосенсиори для моніторингу бензойної кислоти [71, 72], в той час як уреазу використовували для визначення іонів ртуті [73], аргініну [74] або атразину [75].

1.6 Біосенсиори на основі ацетилхолінестерази

Серед великої кількості ензимів, запропонованих для інгібіторного аналізу за допомогою біосенсорів, найчастіше використовують холінестерази через їхню високу чутливість до різних токсичних речовин, зокрема пестицидів [59, 61]. Ацетилхолінестераза (АцХЕ) має дуже високу каталітичну активність - кожна молекула АцХЕ розщеплює близько 25000 молекул ацетилхоліну в секунду, наближаючись до допустимої межі дифузії субстрату до активного центру ензиму [8].

АцХЕ стабілізує рівень нейротрансмітера ацетилхоліну шляхом каталізування гідролізу ацетилхоліну до холіну:

АцХЕ



Реакція, що каталізується ацетилхолінестеразою, необхідна для дезактивації ацетилхоліну в синаптичній щілині і для переходу клітини-мішені в стан спокою (наприклад, для розслаблення м'язової клітини). Було показано, що інгібування АцХЕ афлатоксинами та глікоалкалоїдами, а також деякими іншими природними токсинами є оборотне, в той час як інгібування пестицидами та іонами важких металів є необоротним [76, 77]. Реактивація після аналізу важких металів може бути проведена за допомогою етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) або

цистеїну, а після аналізу фосфорорганічних пестицидів для реактивації ензиму застосовують деякі оксими, наприклад піридин-2-альдоксимметилйодид (ПАМ-2).

Таким чином АцХЕ була успішно застосована для розробки великої кількості електрохімічних біосенсорів, в першу чергу спрямованих на визначення пестицидів [78-88], а також, але в меншій мірі, афлатоксинів [59] або важких металів [59]. Кілька оглядів, присвячених цій темі, було опубліковано [78-81].

Таким чином пристрої на основі іммобілізованої АцХЕ можуть бути використані для аналізу різних токсичних речовин. Однак основним питанням, залишається можлива присутність кількох інгібіторів АцХЕ в аналізованих пробах, що ускладнює визначення конкретних аналітів з необхідною точністю.

1.7 Висновки

Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє широке застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук, які є інгібіторами холінестераз.

На даний час розроблено ряд різних біосенсорів на основі холінестераз. Але більшість із цих досліджень є дещо фрагментарними, відсутній ґрунтовний аналіз можливостей різних систем перетворення сигналу, а також специфічних особливостей перетворювачів та біоселективного матеріалу. Тому основні переваги застосування холінестераз як селективних елементів біосенсорів не завжди використовуються з максимальною ефективністю, що робить це дослідження актуальним.

До того ж зовсім невелика кількість робіт стосується застосування розроблених біосенсорів на основі холінестераз для роботи з реальними зразками. Досить часто розроблені лабораторні прототипи добре працюють у модельних розчинах, однак при переході до аналізу реальних зразків виникають труднощі, які ускладнюють, а іноді й унеможливають роботу створених систем.

1.8 Література

1. Perumal V, Hashim U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J Appl Biomed*. 2014;12:1–15.
2. Sin ML, Mach KE, Wong PK, Liao JC. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;14(2):225–244.
3. Rotariu L, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Bala C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. *Trends Anal Chem*. 2016;79:80–87.
4. Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. Київ: Наукова думка; 2006. 261 с.
5. Marks RS, Lowe CR, Culen DC, Weetall HH, Karube I. (eds). *Handbook of Biosensors and Biochips*. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. 1500 p.
6. Cosnier S. (ed.) *Electrochemical Biosensors*. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2015. 412 p.
7. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report). *Pure Appl. Chem*. 1999;71:2333–2348.
8. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev*. 1987;87(5):955–979.
9. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1–3):10–22.
10. Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991;253(5022):872–879.
11. Nachmansohn D, Wilson I B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv Enzymol*. 1951;12:259–339.
12. Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*. 1999;38:122–133.
13. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*. 2010;39:1747–1763.
14. Narsaiah K, Jha SN, Bhardwaj R, Sharma R, Kumar R. Optical biosensors for food quality and safety assurance—a review. *J Food Sci Technol*. 2012;49:383–406.
15. Zhang Y, Tadigadapa S. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosens Bioelectron*. 2004;19:1733–1743.
16. Länge K, Rapp BE, Rapp M. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391:1509–1519.

17. Scognamiglio V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. *Biosens Bioelectron.* 2013;47:12–25.
18. Perez-Lopez B, Merkoci A. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends Food Sci Technol.* 2011;22: 625–639.
19. Hayat A, Catanante G, Marty JL. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors.* 2014;14:23439–23461.
20. Bratov A, Abramova N, Ipatov A. Recent trends in potentiometric sensor arrays-A review. *Anal Chim Acta.* 2010;678:149–159.
21. Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors.* 2008;8:2569–2588.
22. Clark LC Jnr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1956;2:41–48.
23. Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci.* 1962;102:29–45.
24. Updike SJ, Hicks GP. The enzyme electrode. *Nature.* 1967;214:986–988.
25. Дзядевич СВ. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. *Біополімери і клітина.* 2005;21(2):91–106.
26. Camman K. Working with Ion-Selective Electrodes: Chemical Laboratory Practice. Berlin: Springer-Verlag; 2011. 226 p.
27. Vetter K. Electrochemical Kinetics. New York: Academic Press; 1967. 455 p.
28. Macdonald JR. Impedance/admittance response of a binary electrolyte. *Electrochem Acta.* 1992;37(6):1007–1014.
29. Дзядевич СВ. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов. *Биополимеры и клетка.* 2002;18(5):363–376.
30. Лепіх ЯІ, Гордієнко ЮО, Дзядевич СВ, Дружинін АО, Євтух АА, Ленков СВ, Мельник ВГ, Романов ВО. Створення мікроелектронних датчиків нового покоління для інтелектуальних систем. Одеса: Астропринт; 2010. 289 с.
31. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Electrochemical enzyme biosensors. Kiev: Akadempriodika; 2006. 72 p.
32. Watson LD, Maynard P, Cullen DC, Sethi RS, Brett J, Lowe CR A microelectronic conductometric biosensor. *Biosensors.* 1987/88;3:101–115.
33. Cullen DC, Sethi RS, Lowe CR. Multi-analyte miniature conductance biosensor. *Anal Chim Acta.* 1990;231:33–40.
34. Hin BFY, Sethi RS, Lowe CR. Multi-analyte microelectronic biosensor. *Sensors Actuators B.* 1990;1:550–554.
35. Mikkelsen SK, Rechnitz GA. Conductometric transducers for enzyme-based biosensors. *Anal Chem.* 1989;61:1737–1742.

36. Bilitewski U, Drewes W, Schmid RD. Thick film biosensors for urea. *Sensors Actuators B*. 1992;7:321–326.
37. Дзядевич СВ, Солдаткин АП, Шульга АА, Стриха ВИ, Ельская АВ. Кондуктометрический биосенсор для определения фосфоорганических пестицидов. *Журнал анал химии*. 1994;49(8):874–878.
38. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors. *Anal Chim Acta*. 2006;568:248–258.
39. Bergveld P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1970;17:70–71.
40. Bergveld P. Development, operation and application of the ion sensitive field effect transistor as a tool for electrophysiology. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1972;19:342–351.
41. Matsuo T, Wise K D. An integrated field effect electrode for biopotential recording. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1974;21:485–487.
42. Bergveld P. Thirty years of ISFETOLOGY. What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors Actuators B*. 2003;88:1–20.
43. Petersen K E. Silicon as a mechanical material. *Proc IEEE*. 1982;70:420–450.
44. Middelhoek S. Celebration of the tenth transducers conference: the past, present and future of transducer research and development. *Sensors Actuators A*. 2000;82:2–23.
45. Cane C, Gracia I, Merlos A. Microtechnologies for pH ISFET chemical sensors. *Microelectronics Journal*. 1997;28:389–405.
46. Tsukada K, Sebata M, Miyahara Y, Miyagi H. Long-life multiple-ISFETs with polymeric gates. *Sensors Actuators*. 1989;18:329–336.
47. Bousse L, de Rooij NF, Bergveld P. Operation of chemically sensitive field effect transistors as function of the insulator-electrolyte interface. *IEEE Trans Electron Devices*. 1983;36:1263–1270.
48. Abe H, Esashi M, Matsuo T. ISFETs using inorganic gate thin films. *IEEE Trans Electron Devices*. 1979;26:1939–1944.
49. Gimmel P, Gompf B, Schmeiiser D, Wiemhofer HD, Gopel W, Klein M. Ta₂O₅-gates of pH-sensitive devices: comparative spectroscopic and electrical studies. *Sensors Actuators B*. 1989;4:195–202.
50. Akiyama T, Ujihira Y, Okabe Y, Sugano T, Niki E. Ion-sensitive field-effect transistors with inorganic gate oxide for pH sensing. *IEEE Trans Electron Devices*. 1982;29:1936–1941.
51. Пацковський СВ, Фролов ОС, Шульга ОА, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження напівпровідникових структур для розробки рН-чутливих польових транзисторів. *Сенсорная электроника и микросистемные технологии*. 2005;3:66–73.

52. Janata J, Moss SD. Chemically sensitive field effect transistors. *Biomed Eng.* 1976;6:241–245.
53. Gopal M, Bhaskaran A, Khalife WI, Barbagelata A. Heart Disease in Patients with HIV/AIDS-An Emerging Clinical Problem. *Curr Cardiol Rev.* 2009;5(2):149–154.
54. Bullard Dunn K, Heffler M, Golubovskaya V. Evolving Therapies and FAK Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10(10):722–734.
55. Friedrich E B, Böhm M. Management of end stage heart failure. *Heart.* 2007;93(5):626–631.
56. Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Pesticides and Herbicides: Types, Uses, and Determination of Herbicides. *Encyclopedia of Food and Health.* 2016;326–332.
57. Ata A, Naz S, Elias EM. Naturally occurring enzyme inhibitors and their pharmaceutical applications. *Pure Appl Chem.* 2011;83(9):1741–1749.
58. Wu KK. Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: new therapeutic insights. *Semin Vasc Med.* 2003;3(2):107–112.
59. Amine A, Arduini F, Moscone D, Palleschi G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Biosens Bioelectron.* 2016;76:180–194.
60. Guilbault GG, Kramer DN, Cannon PL. Electrochemical Determination of Organophosphorous Compounds. *Anal Chem.* 1962;34(11):1437–1439.
61. Upadhyay LSB, Verma N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Anal Lett.* 2013;46:225–241.
62. Alvarado-Gámez AL, Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ. Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. *J Electroanal Chem.* 2013;693:51–55.
63. Samphao A, Suebsanoh P, Wongsu Y, Pekec B, Jitchareon J, Kalcher K. Alkaline Phosphatase Inhibition-Based Amperometric Biosensor for the Detection of Carbofuran. *Int J Electrochem. Sci.* 2013;8:3254–3264.
64. Upadhyay LSB, Verma N. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. *Biosens Bioelectron.* 2015;68:611–616.
65. Akyilmaz E, Turemis M. An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. *Electrochim Acta.* 2010;55(18):5195–5199.
66. Chen H, Mousty C, Chen L, Cosnier S. A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Mater Sci Eng C.* 2008;28(5–6):726–730.
67. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Barocci S, Ciuti F, Pecorelli I, Eleuteri A M, Spina M, Fioretti E, Angeletti M. Biosensor-Based Screening Method for the Detection of Aflatoxins B1-G1. *Anal Chem.* 2008;80:9250–9256.

68. Ghica ME, Carvalho RC, Amine A, Brett CMA. Glucose oxidase enzyme inhibition sensors for heavy metals at carbon film electrodes modified with cobalt or copper hexacyanoferrate. *Sensors Actuators B*. 2013;178:270–278.
69. Ayenimo JG, Adeloju SB. Rapid amperometric detection of trace metals by inhibition of an ultrathin polypyrrole-based glucose biosensor. *Talanta*. 2016;148:502–510.
70. Attar A, Emilia Ghica M, Amine A, Brett CMA. Poly(neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements. *J Hazard Mater*. 2014;279:348–355.
71. Shan D, Li Q, Xue H, Cosnier S. A highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. *Sensors Actuators B*. 2008;134(2):1016–1021.
72. Shan D, Shi Q, Zhu D, Xue H. Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenols biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. *Talanta*. 2007;72(5):1767–72.
73. Zeng X, Liu J, Zhang Z, Kong S. Sensitive and Selective Detection of Mercury Ions by Potentiometric Biosensor Based on Urease Immobilized in Chitosan–Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Film. *Int J Electrochem Sci*. 2015;10:8344–8352.
74. Sheliakina M, Arkhypova V, Soldatkin O, Saiapina O, Akata B, Dzyadevych S. Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*. 2014;121:18–23.
75. Braham Y, Barhoumi H, Maaref A. Urease capacitive biosensors using functionalized magnetic nanoparticles for atrazine pesticide detection in environmental samples. *Anal Methods*. 2013;5:4898–4904.
76. Pohanka M. Cholinesterases in Biorecognition and Biosensors Construction: A Review. *Anal Lett*. 2013;46(12):1849–1868.
77. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmac*. 2013;11:315–335.
78. Pundir CS, Chauhan N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal Biochem*. 2012;429(1):19–31.
79. Dhull V, Gahlaut A, Dilbaghi N, Hooda V. Acetylcholinesterase biosensors for electrochemical detection of organophosphorus compounds: A review. *Biochem Res Int*. 2013;2013:1–18.
80. Zhang W, Asiri AM, Liu D, Du D, Lin Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Trends Anal Chem*. 2014;54:1–10.
81. Xia N, Gao Y. Carbon Nanostructures for Development of Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensors for Determination of Pesticides. *Int J Electrochem Sci*. 2015;10:713–724.

82. Zhao H, Ji X, Wang B, Wang N, Li X, Ni R, Ren J. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- β -cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. *Biosens Bioelectron.* 2015;65:23–30.
83. Guan H, Zhang F, Yu J, Chi D. The novel acetylcholinesterase biosensors based on liposome bioreactors–chitosan nanocomposite film for detection of organophosphates pesticides. *Food Res Int.* 2012;49(1):15–21.
84. Gong J, Guan Z, Song D. Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. *Biosens Bioelectron.* 2013;39(1):320–323.
85. Ben Oujji N, Bakas I, Istamboulié G, Ait-Ichou ., Ait-Addi E, Rouillon R, Noguer T. Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors. *Food Control.* 2013;30(2):657–661.
86. Wei M, Zeng G, Lu Q. Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres. *Microchim Acta.* 2014;181:121–127.
87. Yan J, Guan H, Yu J, Chi D. Acetylcholinesterase biosensor based on assembly of multiwall carbon nanotubes onto liposome bioreactors for detection of organophosphates pesticides. *Pestic Biochem Physiol.* 2013;105(3):197–202.
88. Wei M, Wang J. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. *Sensors Actuators B.* 2015;211:290–296.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали та реактиви

Для досліджень було використано наступні матеріали.

Ензими та субстрати:

- Ацетилхолінестераза (АцХЕ) із електричного вугря (КФ 3.1.1.7), різні препарати з активністю 200-1000 од. акт./мг ензиму виробництва фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина),
- ацетилхолінхлорид (АцХХ) фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина).
- Бутирихолінестераза (БуХЕ) із сироватки крові коня (КФ 3.1.1.8), різні препарати з активністю 10-20 од. акт./мг ензиму, та БуХЕ з сироватки крові людини (КФ 3.1.1.8) з активністю 6,4 од. акт./мг препарату виробництва фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина),
- бутирилхолінхлорид (БуХХ) фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина).

Для іммобілізації ензимів в біоселективні мембрани застосовували:

- 25% и 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми “*Serva*” (Німеччина);
- фотополімер полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин фірми *Toyo Gosei Kogyo Co*, Японія (PVA/SbQ);
- сироватковий альбумін бика (БСА) та гліцерин фірми “*Serva*” (Німеччина).

Як робочі буферні розчини використовували:

- KH_2PO_4 -NaOH фірми “*Merck*” (Німеччина) різної буферної ємності та рН.
- Багатокомпонентний буфер “*Polymix*”, який готували за таким складом: 2,5 мМ Трис, 2,5 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мМ лимонної кислоти, 2,5 мМ тетраборат натрію, 150 мМ NaCl. рН цього буфера регулювали титруванням або NaOH, або HCl. Буфер “*Polymix*” має стабільну буферну здатність у широкому діапазоні рН від 5 до 9.

Для інгібіторного аналізу як модельні і калібрувальні розчини використовували:

- Пестициди:
 - трихлорфон [(dimethyl – 2,2,2- trichlor – 1 – hydroxyethyl) - phosphonat] фосфорорганічний пестицид фірми „Riedel-de-Haen”, (Швейцарія);
 - карбофуран [2,3 – dihydro - 2,2 – dimethylbenzofuran – 7 - yl N-methylcarbamate] карбаматний пестицид фірми „Riedel-de-Haen”, (Швейцарія);
 - диізопропілфторфосфат (diisopropyl fluorophosphate) фірми “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина),
 - параоксон-етил (paraoxon-ethyl) (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) фірми „Riedel-de-Haen” (Швейцарія).
 - параоксон-метил (paraoxon-methyl) (O,O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) фірми „Riedel-de-Haen” (Швейцарія).
 - паратіон-метил (parathion-methyl) (O,O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) thiophosphate) фірми „Riedel-de-Haen” (Швейцарія).
- Глікоалкалоїди та аглікони:
 - кристалічні α -соланін (95 % чистоти) та α -чаконін (95 % чистоти) з пагонів *Solanum tuberosum* від “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина),
 - томатін (Lycopersicin) (98 % чистоти) від “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина),
 - деміссідін (соланін D), езерін (Physostigmine) та аглікони соланідін (98 % чистоти) з паростків картоплі, томатідін (3 β -Hydroxy-5 α -tomatidane), соласодін (Solasod-5-en-3 β -ol) (99 % чистоти) фірми “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина).
- Мікотоксини:
 - афлатоксин B1 (чистота 98%), афлатоксин G1(чистота 98%) виробництва фірми “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина).
- Поверхнево-активні речовини:
 - бензалконіум хлорид ($C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$, (R= C_8H_{17} до $C_{18}H_{37}$)) - катіонна поверхнево-активна речовина фірми “Fluka” (Швеція),

- додецилсульфат натрію ($C_{12}H_{25}O_4NaS$) - аніонна поверхнево-активна речовина, отримана з 3 різних заводів України.

Як реактиватор холінестераз використовували розчин піридин-2-альдоксимметилйодиду (ПАМ-2) фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина).

Як розчинники були використані:

- метанол (CH_3OH , чистота 99,9%), ацетонітрил (CH_3CN , чистота 99,8%), диметилсульфоксид (ДМСО) ($((CH_3)_2SO)$, чистота $\geq 99.8\%$), етанол (C_2H_5OH , чистота $\geq 99.8\%$), виробництва фірми “*Sigma-Aldrich Chemie*” (Німеччина),
- Етилацетат ($CH_3COOC_2H_5$), бутанол (C_4H_9OH), ксилол ($C_6H_4(CH_3)_2$), ізоаміловий спирт ($((CH_3)_2CHCH_2CH_2OH)$), ізопропіловий спирт або ізопропанол ($CH_3CH(OH)CH_3$) вітчизняного виробництва.

Для визначення рН-чутливості перетворювачів використовували стандартні рН-титри від “*Singles*” (США) та рН-титри вітчизняного виробництва.

Усі інші реактиви, як вітчизняного, так і імпорного виробництва, були кваліфікації «ос.ч» і «х.ч».

Для модифікації поверхні ІСПТ використовували

- Аминосилан ((3-Aminopropyl)triethoxysilane, 99%) від „Sigma-Aldrich Chimie” (Німеччина).

Для модифікації як поверхні ІСПТ так і біоселективних елементів використовували:

- золоті наночастинки, 10 нм, стабілізована суспензія в цитратному буфері фірми “Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина).

Колоїдні наночастинки золота розміром 20 нм та 30 нм, використані в роботі, синтезували за методом Туркевич-Френса [1-2] у власній модифікації шляхом відновлення золотохлористоводневої кислоти ($\geq 99.9\%$ чистоти, Sigma-Aldrich) цитратом натрію у присутності карбонату калію.

Морфологію синтезованих наночастинок золота визначали методами трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1400 (Jeol, Японія), центр колективного користування НАН України при Інституті мікробіології та

вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України) та лазерно-кореляційної спектрометрії (Zetasizer-3, “Malvern Instruments Ltd”). Згідно отриманих даних наночастинки мали сферичну форму і середній розмір відповідно 20 і 30 нм (рис. 2.1).

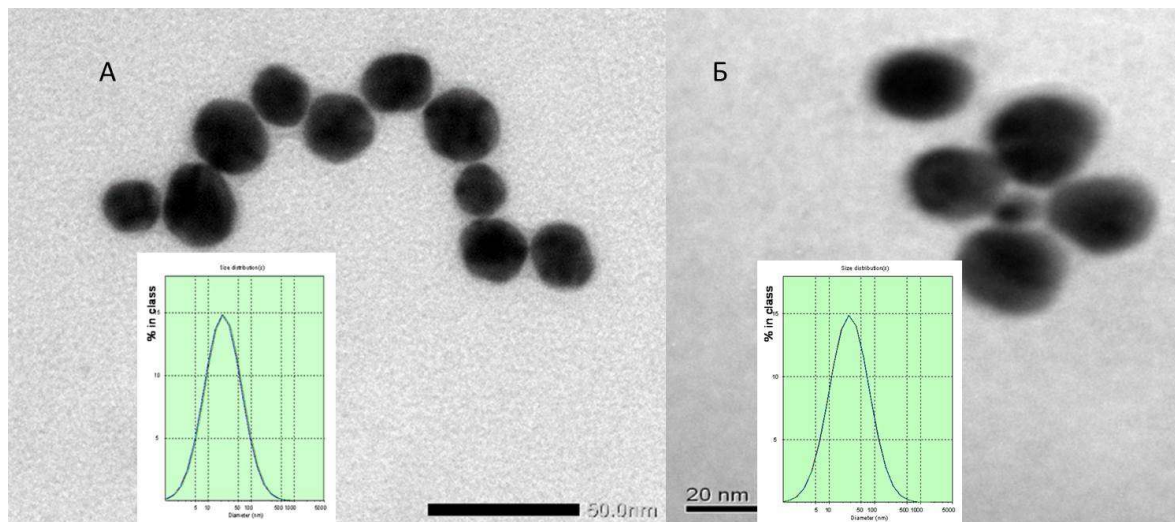


Рисунок 2.1 – Електронно-мікроскопічні зображення і розподіл за гідродинамічним діаметром наночастинок золота розміром 20 нм (А) та 30 нм (Б)

В роботі використовували цеоліти різних типів, які були синтезовані в Центральньо-східному технічному університеті (Анкара, Туреччина).

Цеоліт Бета гідротермічно синтезували з реакційної суміші з молярним складом $1,92\text{Na}_2\text{O} : \text{Al}_2\text{O}_3 : 50\text{SiO}_2 : 4,6(\text{TEA})_2\text{O} : 444\text{H}_2\text{O}$. Розчин попередника алюмінату натрію готували шляхом розчинення гідроксиду натрію (NaOH , > 97 мас.%, JT Baker) та алюмінату натрію (50,8 мас.% Al_2O_3 , 43,4 мас.% Na_2O , Riedel de Haën) у деіонізованій воді (опір > 18 МОм см). Потім додавали гідроксид тетраетиламонію (TEAON , 35 мас.% розчину у воді, Sigma-Aldrich), який є структуроутворюючим агентом для синтезу цеоліту Бета [3], і отриманий розчин попередника ретельно перемішували. Розчин колоїдного діоксиду кремнію Ludox® HS-40 (40 мас.% суспензії SiO_2 у воді, Sigma-Aldrich) додавали в розчин попередника алюмінату і ретельно перемішували перед завантаженням отриманої суміші в тefлоновий автоклав з нержавіючої сталі. Автоклав витримували

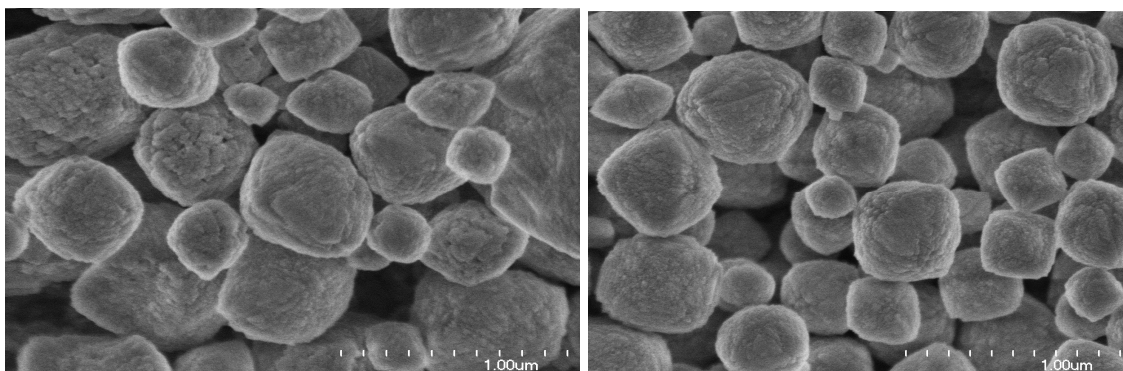
статично при 120°C у програмованій печі протягом 7 днів. Отримані тверді частинки відфільтровували у вакуумі, промивали деіонізованою водою і сушили на повітрі при кімнатній температурі.

Кристали цеоліту Бета у формі NH_4^+ отримували шляхом іонного обміну синтезованих кристалів 1 М водним розчином нітрату амонію при температурі 80 °C протягом 24 годин [4]. Іонообмінні кристали (як правило, зразки 0,2 г) поміщали в тигель і нагрівали в програмованій печі для перетворення форми NH_4^+ у форму H^+ , що має кислотність Бренстеда [4]. Зразок ВЕА-1 готували нагріванням від 25 до 500 °C зі швидкістю 1 °C хв⁻¹, підтримуючи 500 °C протягом 6 год, а потім охолоджуючи до 25 °C. Зразки ВЕА-2 та ВЕА-3 також обробляли з використанням етапів нагрівання, ізотермії та охолодження, але з різними значеннями швидкості та заданих температур (Табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Процедури термічної обробки, що використовуються для приготування різних зразків цеоліту Бета

Зразок	Кінцева температура (°C)	Час нагрівання (г)	Швидкість нагрівання (°C хв ⁻¹)
ВЕА-1	500	6	1
ВЕА-2	700	6	10
ВЕА-3	700	6	1

Аналіз зразків за допомогою емісійного скануючого електронного мікроскопа (FE-SEM) виявив типову, злегка закруглену зрізану квадратну біпірамідну морфологію для синтезованих частинок цеоліту Бета (рис. 2.2А). Поверхні цих частинок містили менші нерівності, що зазвичай спостерігаються для цеоліту Бета [5]. Ці частинки переважно знаходились у діапазоні розмірів 0,5–1,5 мкм, що узгоджується з даними аналізу розподілу за розмірами частинок, показаними на рис. 2.3.



(А)

(Б)

Рисунок 2.2 – FE-SEM мікрофотографії синтезованого цеоліту Бета (А) та БЕА-1 (Б), що термічно оброблений при 500 °С зі швидкістю нагрівання 1 °С хв⁻¹

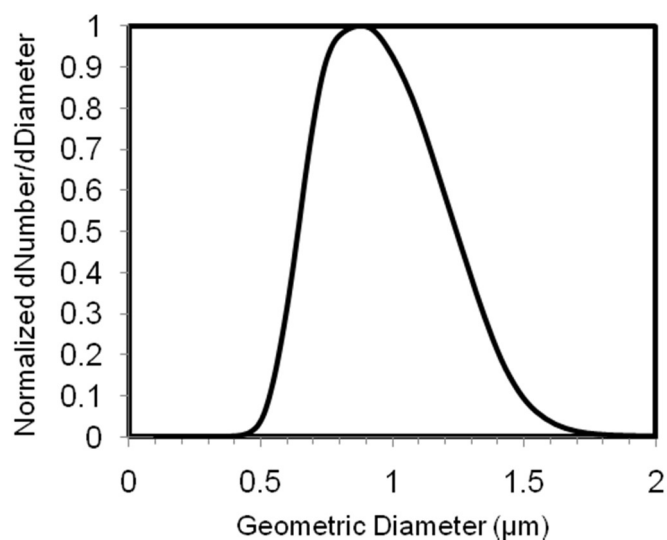


Рисунок 2.3 – Розподіл частинок за розміром синтезованого зразка цеоліту Бета

За даними FE-SEM (рис. 2.2Б) та аналізом розподілу розміру частинок (табл. 2.2) видно, що результати термічної обробки не спричинили суттєвих змін у морфології частинок цеоліту Бета, особливостях текстури та поверхні, і розмірах.

Таблиця 2.2 – Фізико-хімічні характеристики зразків цеолітів

Зразок	Співвідношення Si/Al	Середній розмір частинок (мкм)	$S_{\text{ВЕТ}}$ (m ² g ⁻¹)	S_{ext} (m ² g ⁻¹)	Розмір пор (нм)	Об'єм пор (см ³ г ⁻¹)
Бета	17 ± 2	0.9	460	58	0.88	0.19
БЕА-1	17 ± 2	0.9	666	61	1.06	0.28
БЕА-2	17 ± 2	0.9	753	71	0.98	0.32
БЕА-3	17 ± 2	0.9	739	64	0.91	0.31

2.2 Конструкція перетворювачів

2.2.1 Конструкція датчика на основі рН-чутливих польових транзисторів виробництва НДІ "Мікроприлад" (Київ, Україна)

В роботі використовували сенсорний чип на основі рН-чутливих польових транзисторів, виготовлений за стандартною кремнієвою технологією в Науково-дослідницькому Інституті "Мікроприлад" (Київ, Україна) [6]. Це кремнієвий кристал *p*-типу розміром 3 мм × 10 мм, на якому було розміщено два ідентичних рН-чутливих польових транзистори (рис. 2.4). Чип було наклеєно на ситалову підкладинку розмірами 30 мм×6 мм×1 мм. Контакти кремнієвої структури було приєднано до відповідних площадок на ситаловій підкладинці методом ультразвукового зварювання. Контактні площадки було ізолювано за допомогою епоксидної смоли [6, 7].

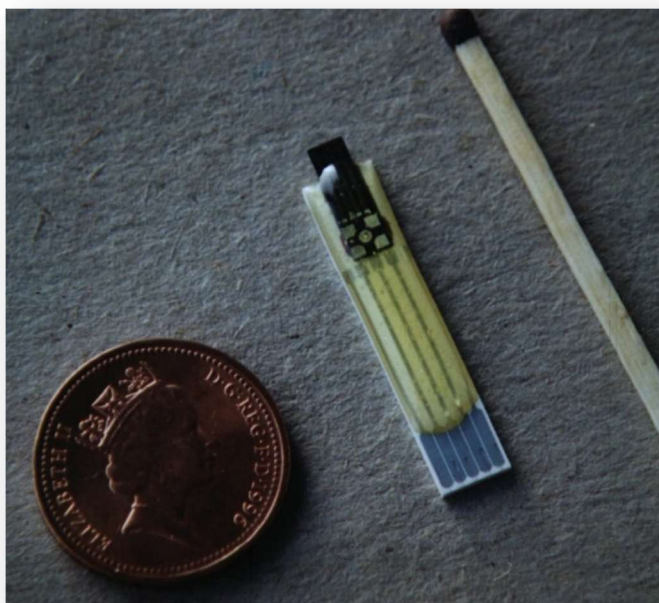


Рисунок 2.4 – Зовнішній вигляд потенціометричного датчика на основі пари рН-чутливих польових транзисторів виробництва НДІ "Мікроприлад" (Київ, Україна)

рН-чутливі польові транзистори було сформовано на р-Si-підкладинці з орієнтацією (100) та опором 7,5 Ом/см (рис. 2.5).

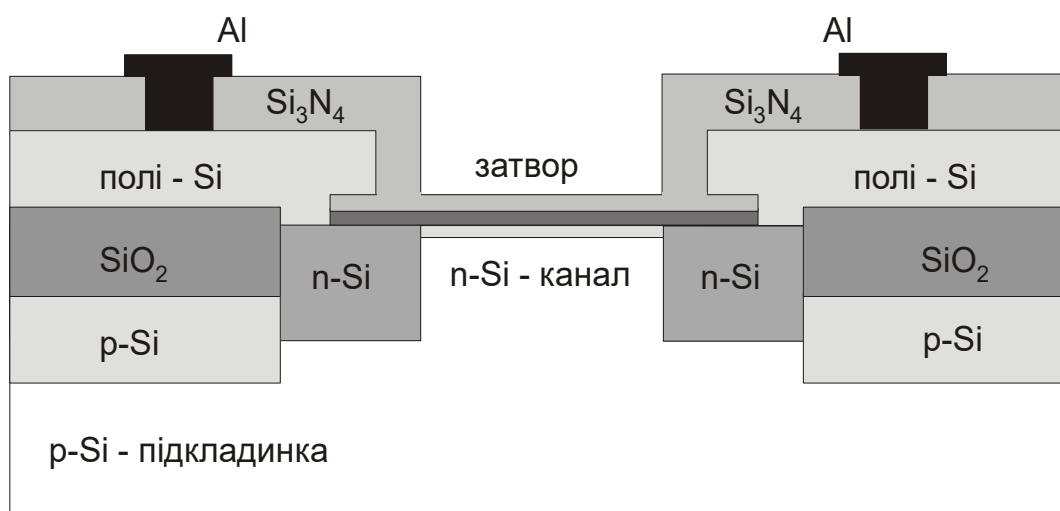


Рисунок 2.5 – Технологічна карта-схема рН-чутливого польового транзистора, виготовленого в НДІ “Мікроприлад” (Київ, Україна)

Для формування інверсійного шару було проведено імплантацію бору з дозою від 3 до 15 мкС під товстий шар оксиду. Іонна імплантація фосфору за допомогою дифузії з загальною дозою 500 мкС була виконана для формування областей витоку та стоку. Канал розмірами 7 мкм×250 мкм був сформований іонною імплантацією фосфору з дозою, що залежала від прикладеної напруги, (від -2 В до -4 В). Полі-кремнієві провідні шляхи з опором близько 300 Ом було використано для утворення контактів з витоком і стоком. Термічно вирощений шар SiO₂ товщиною 50 нм, покритий шаром Si₃N₄ товщиною 150 нм, було сформовано для ізоляції затвору від каналу. Крім того, шар Si₃N₄, нанесений на підзатворну область транзистора обумовлював його іоно-селективні властивості.

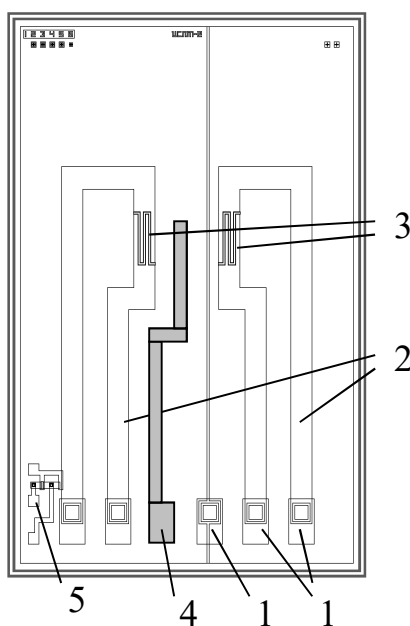
рН-чутливість датчиків становила близько 50 мВ/рН, що забезпечувало достатню чутливість перетворювача для реєстрації змін рН в мембрані, які відбуваються в процесі ферментативної реакції, при використанні його як ферментного біосенсора. Робочі параметри отриманих датчиків: $I_b = 100$ мкА, $U_{bc} = 1$ В.

2.2.2 Конструкція потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів виробництва Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (Київ, Україна)

В роботі використовували перетворювачі з парою p -каналних транзисторів на кристалі загальною площею 8×8 мм (рис. 2.6) [8]. Кристал включав два ідентичні транзистори, розділені захисною n^+ -областю шириною 50 мкм з контактом до підкладинки, p^+ -дифузійні шини, виведені на край чипу з контактами до стоку та витoku, два тестові МДН-транзистори з металевим затвором, призначені для контрольної перевірки електричних параметрів виготовлених кристалів, а також вивід до майбутнього вбудованого мікроелектроду порівняння. Зигзагоподібна геометрія затворної області транзистора дає відношення загальної довжини каналу до ширини рівним 100, що забезпечує високу крутизну перехідних характеристик транзистора [8, 9].



(A)



(Б)

Рисунок 2.6 – Загальний вигляд кристалу (А) та схематичне зображення топології диференційної пари транзисторів (Б). 1 - контакти до підкладки, 2 - p^+ - дифузійні шини з контактами до витоку і стоку кожного з транзисторів, 3 - затворна область транзисторів, 4 - вивід до вбудованого електроду порівняння, 5 - тестова МДН-структура

Як підкладинку використовували кремнієві пластини n -типу марки $<100>$ з концентрацією домішок 10^{15} см^{-3} . На поверхні термічним окисленням в потоці вологого кисню при температурі 1100°C отримували шар SiO_2 товщиною $0,65 \text{ мкм}$, який служив маскою під час термічної дифузії бору в області витоку і стоку. В процесі двохступеневої дифузії товщина SiO_2 збільшувалася до $0,8 \text{ мкм}$, що забезпечує поріг інверсії під оксидом не менше 20 В . P - n перехід областей витоку та стоку глибиною 4 мкм забезпечує величину пробивної напруги не менше 40 В . Двохшаровий підзатворний діелектрик складався з шарів оксиду і нітриду кремнію товщиною 50 нм кожен. Оксид формувався окисленням в сухому кисні при температурі 1000°C , Si_3N_4 отриманий осадженням в реакторі зниженого тиску при 780°C реакцією діхлорсилану з аміаком. Для порівняння електричних характеристик на кристалі одночасно з ІСПТ формувався метал-нітрид-оксид-

напівпровідник (МНОН) транзистор з алюмінієвим затвором. ІСПТ і тестовий МНОН транзистори відрізняються відношенням ширини до довжини каналу W/L : для МНОН воно рівне 1, для ІСПТ - 100. Поперечний розріз p -канальної структури показаний на рис. 2.7.

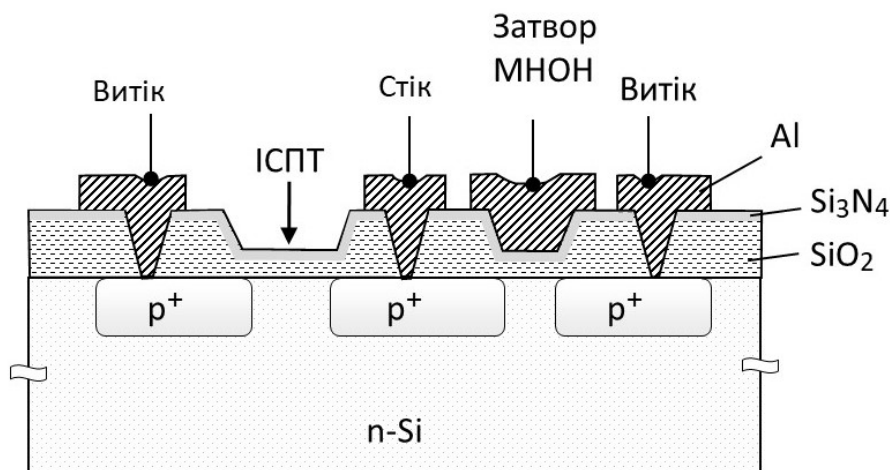


Рисунок 2.7 – Поперечний розріз кремнієвої структури, на якому сформовані ІСПТ і МНОН транзистори

На рис. 2.8 зображено фото кремнієвої пластини з нанесеними рН-чутливими польовими транзисторами. В подальшому вони розрізались на окремі кристалічні чипи.

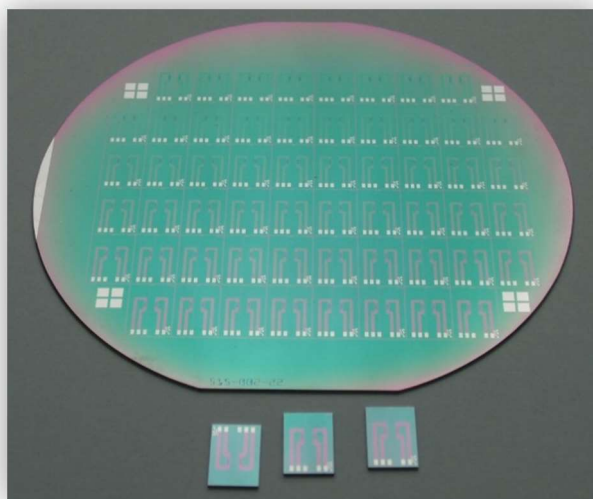


Рисунок 2.8 – Фотографія кремнієвої пластини з нанесеними рН-чутливими польовими транзисторами

Було розроблено та виготовлено спеціальні монтажні друковані плати для проведення електрохімічних вимірювань і встановлення сенсорів в вимірювальні кювети (рис.2.9).

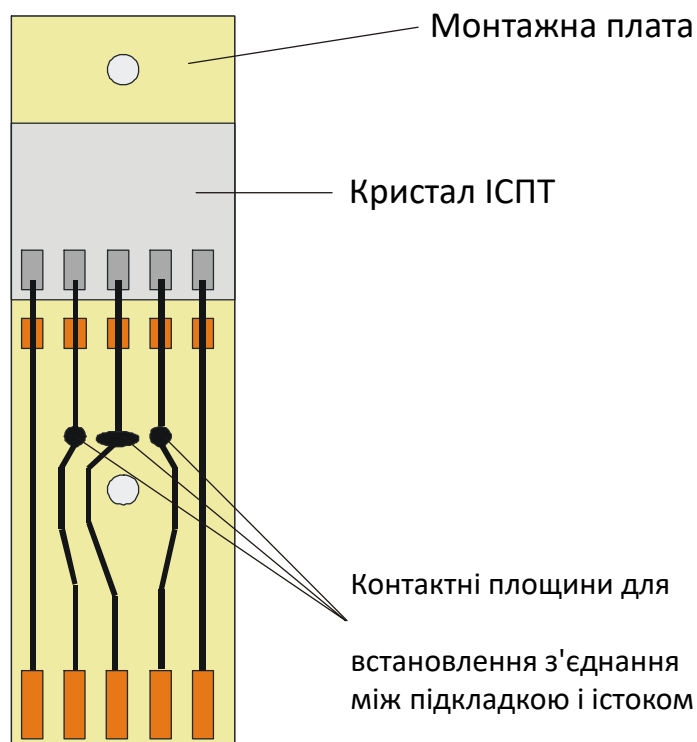


Рисунок 2.9 – Схема друкованої монтажної плати – основи для кристала диференційної ІСПТ-пари

Кристалічний чип розміром 8×8 мм з диференційною ІСПТ-парою монтується на платі. Кристал приклеюється до неї, контактні площини з'єднуються з платою тонкими проводами та ізолюються компаундом. Загальний вигляд потенціометричних перетворювачів на основі рН-чутливих польових транзисторів, виготовлених в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України наведено на рис.2.10.

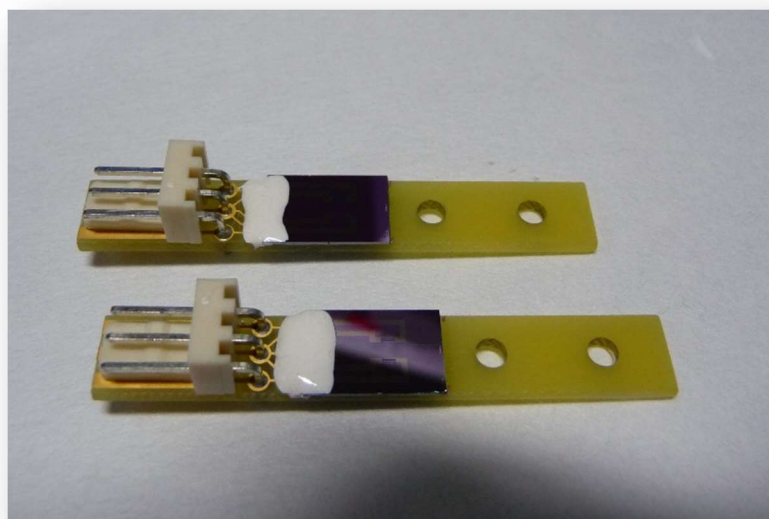
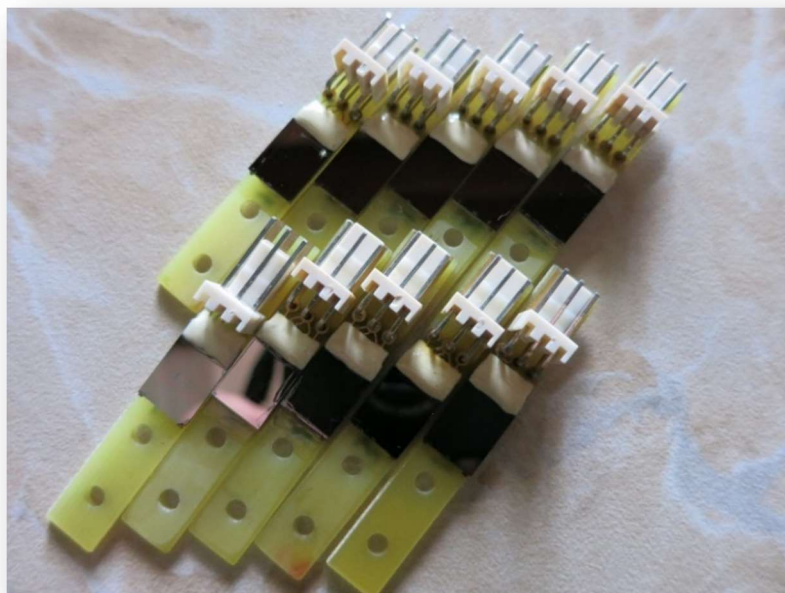


Рисунок 2.10 – Загальний вигляд потенціометричних перетворювачів на основі рН-чутливих польових транзисторів, виготовлених в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАНУ (Київ, Україна)

Іон-селективні властивості транзистора обумовлені підзатворним діелектричним шаром, що складається з термічно окисленої плівки SiO_2 товщиною 50 нм та плівки Si_3N_4 товщиною 70 нм, осадженої в реакторі зниженого тиску.

2.2.3 Конструкція кондуктометричних перетворювачів виробництва Інституту хемо- та біосенсорики (Мюнстер, Німеччина)

В роботі використовувались перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій і пропозицій в Інституті хемо- та біосенсорики м. Мюнстер (Німеччина) (рис.2.11) [10]. Як підкладинка використовувалось скло розміром 40 мм × 5 мм, на яке було нанесено електроди із платини. Ширина пальців гребінок та відстань між ними 10 мкм.

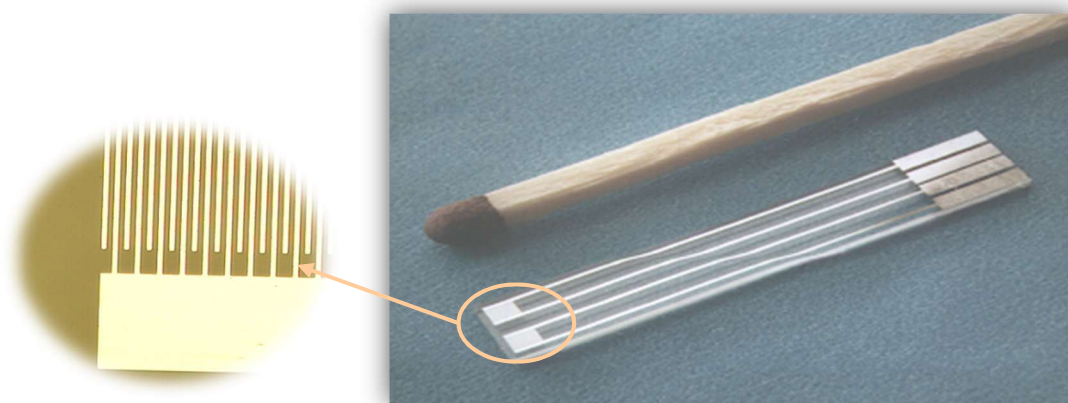


Рисунок 2.11 – Загальний вигляд кондуктометричних перетворювачів виробництва Інституту хемо- та біосенсорики (Мюнстер, Німеччина)

2.2.4 Конструкція кондуктометричних перетворювачів виробництва Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України (Київ, Україна)

В роботі використовувались перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України (Київ, Україна). Вони складаються з двох ідентичних пар тонкошарових планарних золотих електродів розміром 5 мм × 30 мм, виготовлених за технологією плазменної полімеризації (вакуумного напилення) золота на непровідну керамічну підкладинку з ситалу (рис. 2.12). Середня частина електродів була захищена ізолюючим шаром (поліамід, фоторезист, оксид кремнія чи

епоксидна смола). Кожна пара електродів представляла собою кондуктометричний перетворювач [11].

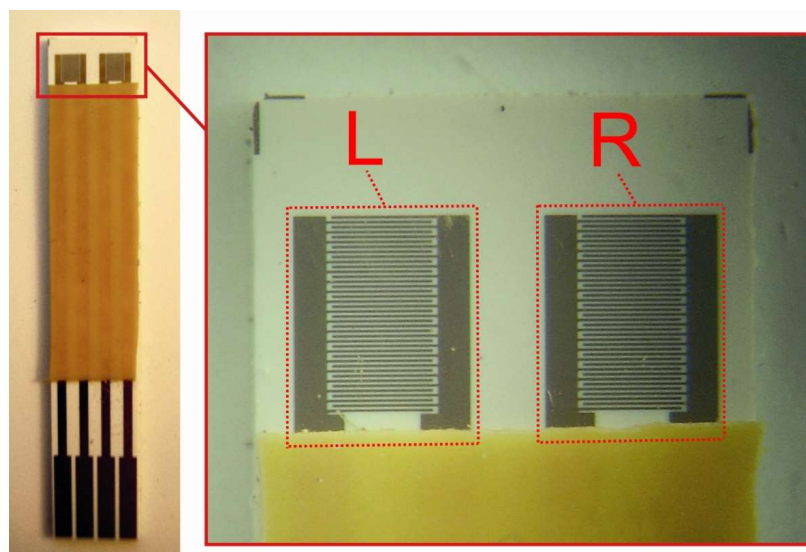


Рисунок 2.12 – Загальний вигляд кондуктометричного перетворювача виробництва Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України (Київ, Україна)

Для покращення адгезивних властивостей золота на ситал наносили підшар хрому товщиною 50 нм. Кожний такий перетворювач складається із 20 пар гребінчастих електродів, що мають ширину пальців гребінки та зазор між ними 20 мкм. Загальна площа чутливої поверхні складала приблизно 2 мм² (рис.2.13) [12].

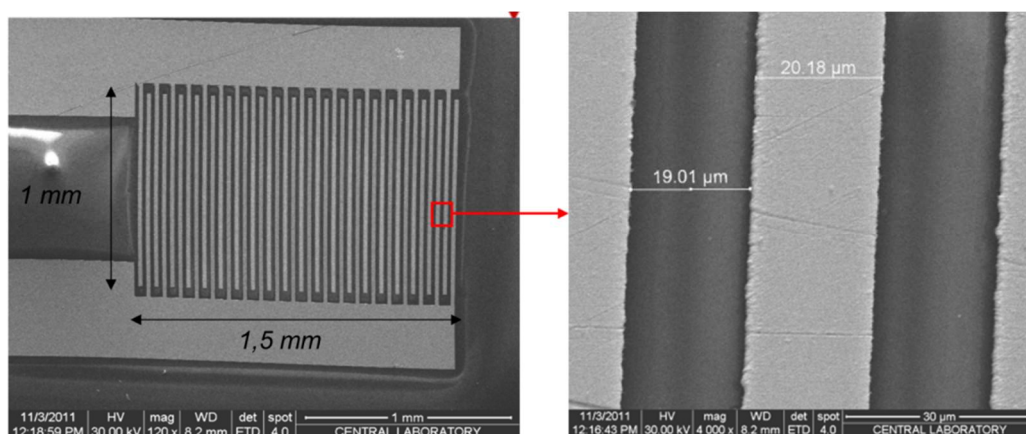


Рисунок 2.13 – Кондуктометричні золоті електроди, нанесені на ситалову підкладку

2.3 Схеми та конструкції експериментальних установок та приладів для роботи з біосенсорами

2.3.1 Схема експериментальної установки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"

Для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад" використовувалась експериментальна установка, блок-схема якої представлена на рис. 2.14.

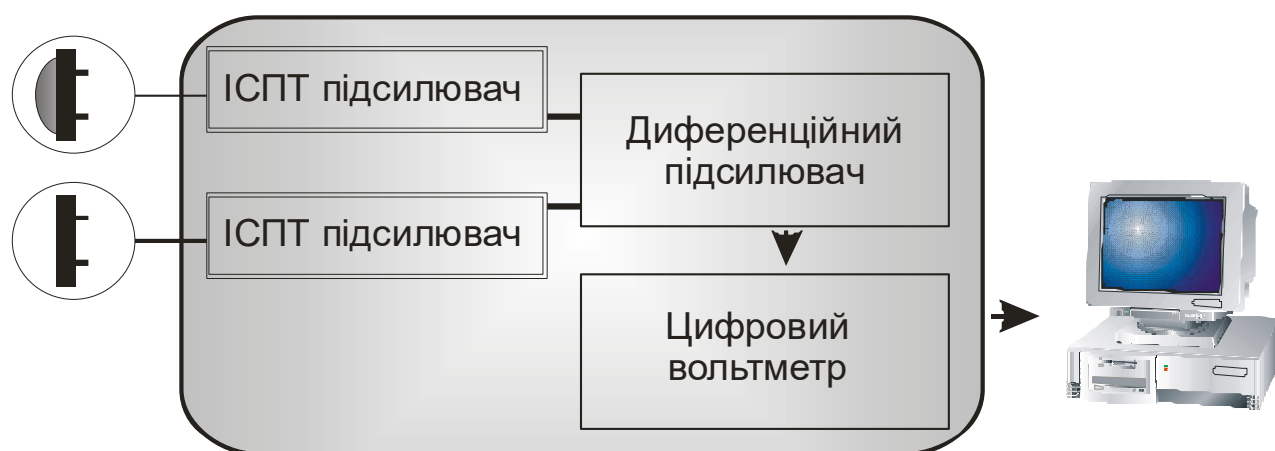
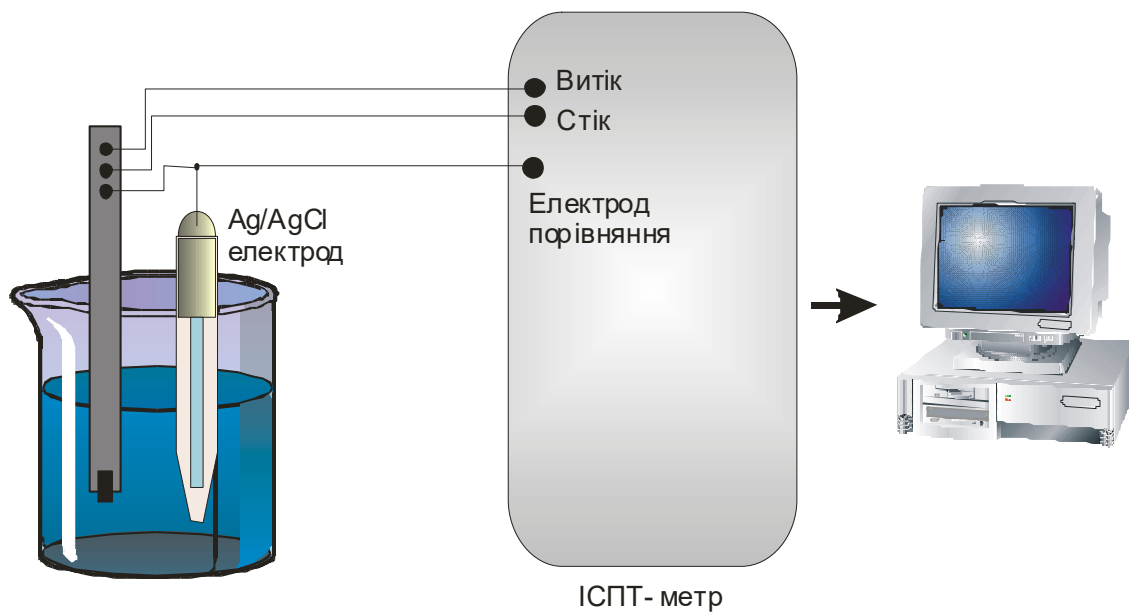
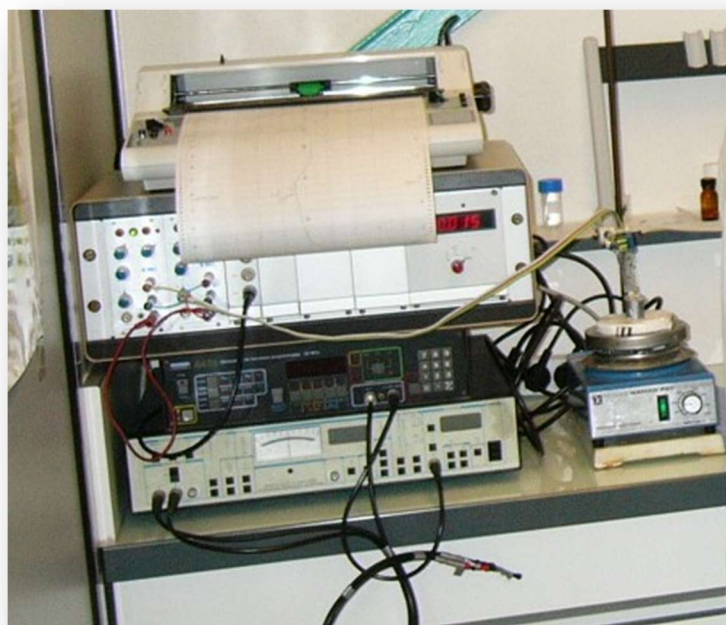


Рисунок 2.14 – Схема експериментальної установки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"

В роботі використовували 2 варіанти такої системи. Перший базувався на ІСПТ-метрі Інституту мікроелектроніки м.Ньюшатель (Швейцарія). Схема установки та зовнішній вигляд такої системи представлено на рис. 2.15.



(A)



(B)

Рисунок 2.15 – Схема (А) та зовнішній вигляд (Б) експериментальної установки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад" на базі ІСПТ-метру Інституту мікроелектроніки м.Ньюшатель (Швейцарія)

Другий варіант системи був стаціонарною установкою, що складалася з блоків живлення, вольтметрів, магазинів опорів тощо (рис.2.16).



Рисунок 2.16 – Зовнішній вигляд експериментальної установки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"

2.3.2 Портативний прилад для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"

Для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад" розроблено та виготовлено варіант двоканального портативного приладу (рис.2.17).



Рисунок 2.17 – Зовнішній вигляд портативного приладу для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва НДІ "Мікроприлад"

Прилад працює за принципом вимірювання поверхневого потенціалу затвору транзисторів по схемі стеження із від'ємним зворотним зв'язком, що підтримує струм каналу ПТ постійним на рівні 0,3 мА при постійній напрузі сток-виток біля 2В. Вихідний сигнал відгуку при цьому відповідає потенціалу на затворі. Прилад забезпечує можливість роботи як в диференційному режимі (з підсиленням різницевого сигналу у 10 чи 100 разів), так і в режимі моніторингу відгуків кожного з окремих двох каналів. Поточна інформація відображується на цифровому індикаторі та паралельно може бути зчитана з вихідного аналогового підсилювача на реєструючий пристрій чи комп'ютер для перетворення в цифровий код. Прилад забезпечений внутрішнім джерелом живлення і працює від мережі змінного струму 220 В.

На випадок використання транзисторів з різними електричними параметрами в приладі передбачена можливість роботи при різних напругах стік-витік (від 0,5 до 3,0 В) та різних струмах каналу (від 20 до 500 мкА). Для цього прилад забезпечений засобами внутрішнього контролю та настройки цих параметрів. Такий прилад може працювати в складі автоматизованої вимірювальної установки та може служити прототипом промислового приладу.

2.3.3 Портативний прилад для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова

Перший варіант портативного приладу у вигляді блоку з елементами управління для роботи з іон-чутливими польовими транзисторами представлено на рис. 2.18.



Рисунок 2.18 – Зовнішній вигляд портативного приладу для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова

Пристрій відслідковує зміну поверхневого потенціалу затвору транзисторів при зміні рН аналізованого розчину і працює по схемі прямого підсилення з модуляцією струму каналу ПТ. На випадок використання транзисторів з суттєво різними електричними параметрами (різною пороговою напругою) в пристрої передбачена можливість роботи при різних струмах каналу (від 20 мкА до 1 мА), при цьому напруга стік-витік або на резисторі навантаження може змінюватися в межах 0.5–5 В. Для цього прилад забезпечений засобами внутрішнього контролю та настройки цих параметрів. Вихідний сигнал формується як відносно підсилена на навантаженні затворна напруга. Пристрій забезпечує можливість роботи як в режимі моніторингу аналогового відгуку кожного з окремих каналів, так і в

диференційному режимі (з можливістю 10 кратного підсилення диференційного сигналу).

Електрична схема прямого вимірювання струму в каналі з активним навантаженням в ланцюгу стоку приведена на рис. 2.19.

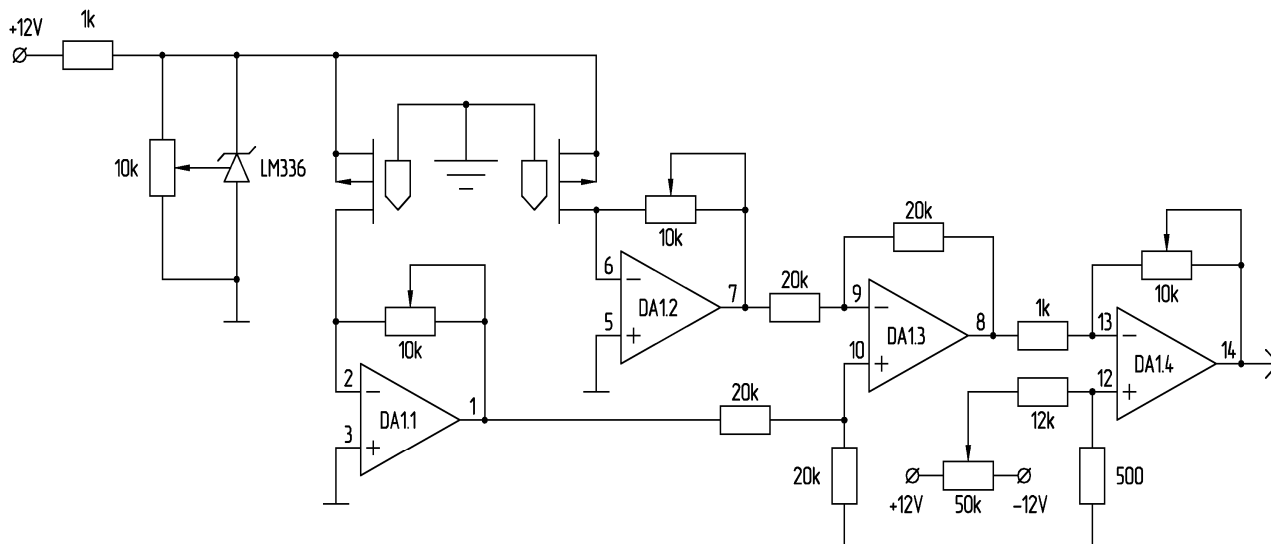


Рисунок 2.19 – Електрична схема сенсорного вимірювального перетворювача на основі прямого вимірювання струму в каналі з активним навантаженням в ланцюгу стоку ІСПТ

Схема дозволяє встановлювати величину падіння напруги стік-витік та коефіцієнт перетворення струм-напруга. Таким чином спрощується встановлення робочих параметрів транзистору і запобігається можливість виходу їх за межі лінійної зони перетворення. Послідовно з каналом кожного ІСПТ включено активне навантаження, напруга на якому є вихідним сигналом кожного із каналів. Виходом усього перетворювача є диференційний сигнал, що отримується за допомогою диференційного підсилювача. Особливості схеми наступні: джерело опорної напруги фіксоване (зазвичай 5В); змінні резистори в ланцюгах активного навантаження потрібні для компенсації в початковому зсуві вихідних напруг обох ІСПТ за рахунок різниці в крутизні затворних характеристик транзисторів, причому змінним можна залишити тільки один із них; коефіцієнт підсилення вихідного диференційного сигналу доцільно зробити керованим в межах від 1 до 10 разів для досягнення необхідної чутливості для реєструючого приладу; змінний резистор у вихідному каскаді призначений для додаткової компенсації зсуву між

обома каналами ІСПТ. Крім того, для можливості одночасної реєстрації окремих сигналів кожного з транзисторів та диференційного сигналу потрібно передбачити мультиплексор (електронний чи з ручним керуванням). Далі сигнал з мультиплексору при потребі подається на АЦП для перетворення в цифровий вигляд.

Далі було розроблено покращений варіант портативного приладу з чутливістю близько 25 мкА/рН, що відповідало умовній рН-чутливості перетворювача 80 мВ/рН (рис. 2.20). Прилад працює за схемою прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням.

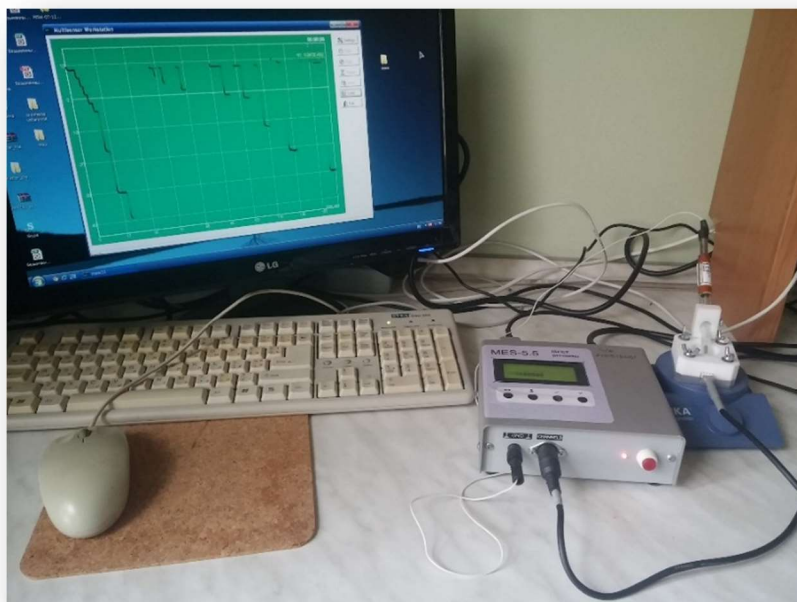


Рисунок 2.20 – Загальний вигляд системи для проведення вимірювань з використанням *p*-канальних рН-чутливих польових транзисторів на основі портативного приладу, виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України

Для внутрішньої стандартизації і експрес-тестування роботи вимірювальної системи було розроблено і створено електронний еквівалент *p*-канального польового транзистора. Його зовнішній вигляд представлений на рис. 2.21.

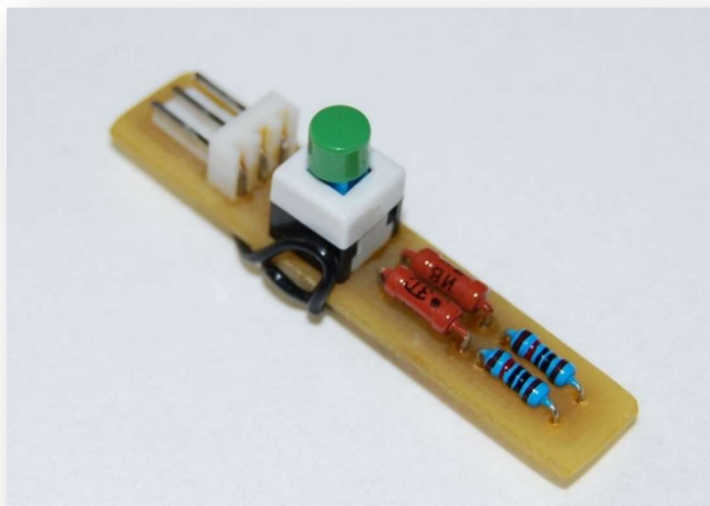


Рисунок 2.21 – Загальний вигляд електронного еквівалента р-канального польового транзистора (виготовлений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України)

Цей еквівалент підключається до вимірювального приладу замість рН-ПТ і моделює сигнали, що відповідають сигналу перетворювача при робочих значеннях рН 7 і рН 9.

2.3.4 Вимірювальні комірки для роботи з рН-чутливими польовими транзисторами виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова

У роботі використовували уніфіковану розбірну вимірювальну кювету, сконструйовану в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (рис. 2.22). Вона представляє собою модульну систему, що складається з ІСПТ-електроду і системи підготовки і подавання проби, які конструктивно розділені й оформлені у вигляді блоків, що сполучаються між собою. На металеву основу встановлюється і закріплюється друкована плата з кристалом сенсора, на поверхні якої фіксується фторопластовий змінний пробоприймач з силоксановим ущільненням.

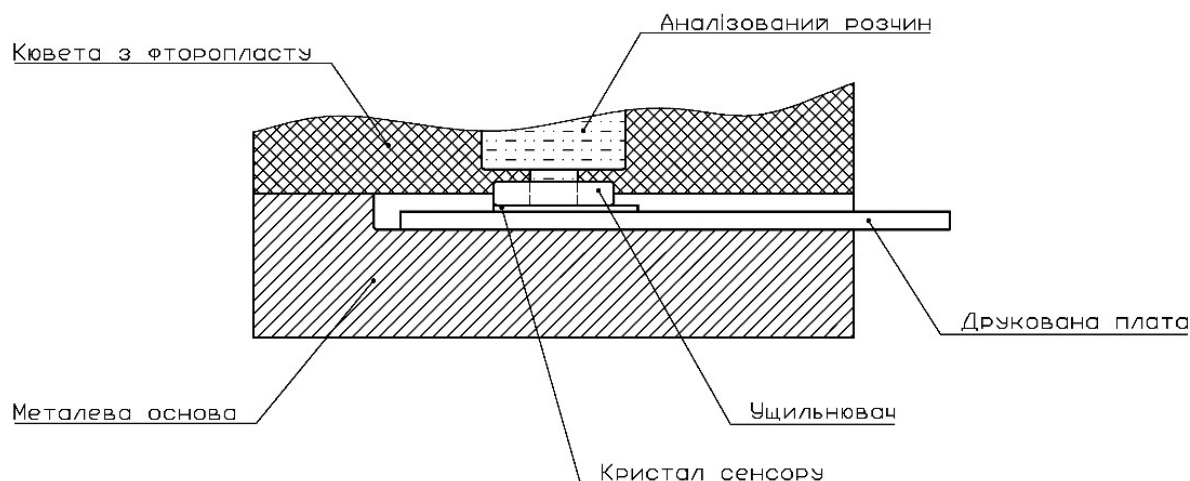


Рисунок 2.22 – Схематичне зображення вимірювальної комірки

Така модульна конструкція вимірювальної кювети дозволяє використовувати її у різних схемах вимірювань. При зміні конфігурації сенсорної системи (непроточної на проточну й навпаки, одноканальної на багатоканальну) змінюється лише конструкція пробоприймача, решта ж частин вимірювальної кювети залишаються незмінними.

У непроточному варіанті кювети кришка виготовлена у вигляді відкритого фланця з фторопласту, який закріплюється на корпусі кювети за допомогою ущільнювальної прокладки і в такий спосіб утворює кухоль (рис. 2.23).

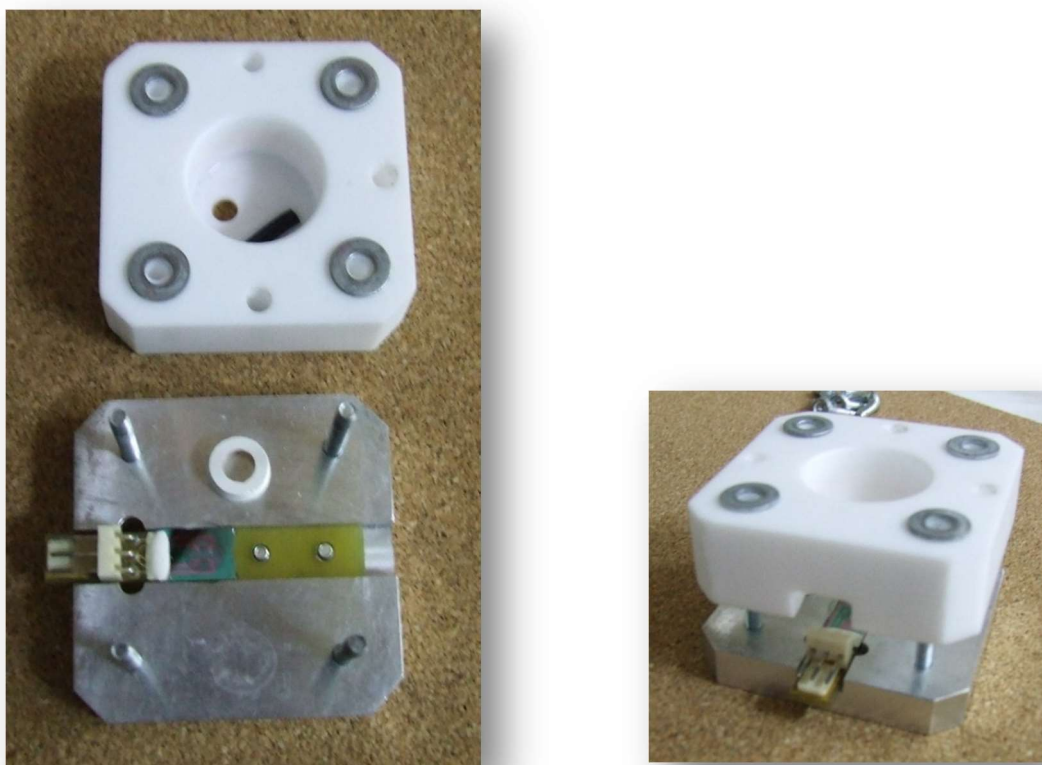


Рисунок 2.23 – Загальний вигляд вимірювальної комірки з встановленим перетворювачем (непроточний варіант)

В проточному варіанті кювета повинна забезпечувати протікання аналізованого розчину від вхідного отвору до вихідного через робочий об'єм, надійний контакт сенсора й електрода порівняння з рідиною, розташування електрода порівняння в безпосередній близькості до сенсору й надійне ущільнення всіх елементів конструкції, яке виключає витікання аналізованого розчину (рис.2.24).

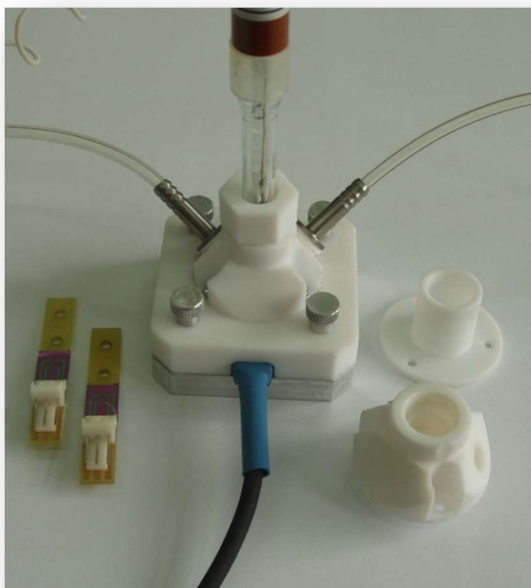


Рисунок 2.24 – Загальний вигляд вимірювальної комірки з встановленим перетворювачем та електродом порівняння (проточний варіант)

Важливим елементом системи є електрод порівняння, що використовується у вимірюваннях (рис.2.25).



Рисунок 2.25 – Загальний вигляд вимірювальної комірки з вбудованим утримувачем для електродів порівняння

Нами була ретельно вивчена технологія виготовлення хлор-срібних електродів порівняння. Потім було розроблено технологію створення мікроелектродів порівняння для використання у наших вимірюваннях. Було виготовлено кілька пробних зразків і проведено порівняльні вимірювання з ними. Було показано, що виготовлені нами електроди, за своїми характеристиками, не поступаються заводським, але значно менші за розмірами. На рис. 2.26 представлено порівняльні фото різних електродів порівняння.

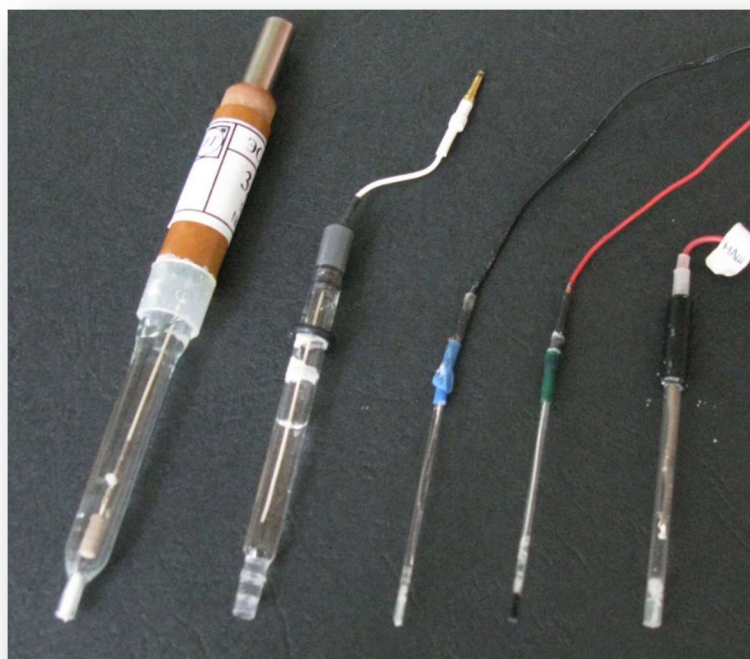


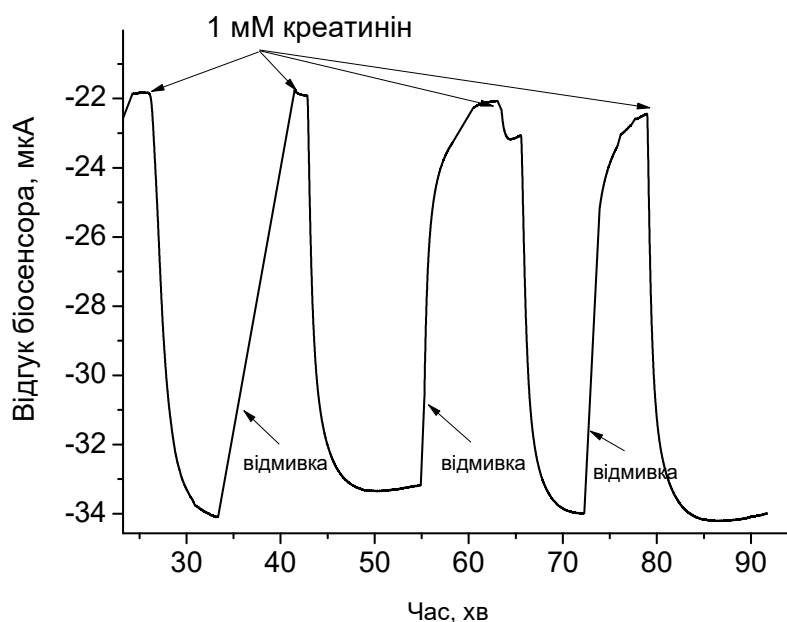
Рисунок 2.26 – Хлор срібні електроди порівняння: 1-ЭСр-10107 ($D=8\text{мм}$); 2 – ЭВЛ-1М4 ($D=5\text{ мм}$); 3, 4, 5 – мікроелектроди порівняння власного виготовлення, ($DD= 1,5\text{ мм}, 1\text{мм}, 3\text{ мм}$ відповідно)

Наступним кроком модернізації комірки був варіант, коли замість хлорсрібного електрода порівняння у вимірювальній схемі використовувався квазіелектрод порівняння у вигляді платиного дроту. Порівняльні розміри такого готового платиного електрода і стандартного заводського електрода порівняння представлено на рис. 2.27.

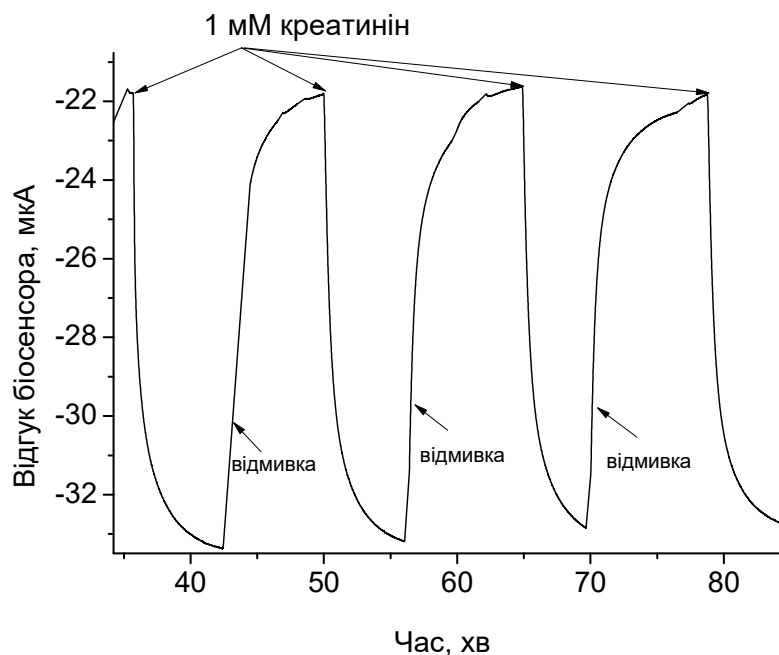


Рисунок 2.27 – Зовнішній вигляд хлор-срібного електрода порівняння і платинового квазіелектрода порівняння, виготовленого з платинового дроту

На рис. 2.28 представлено відгуки біосенсора на одну й ту ж саму концентрацію субстрату при підключенні до вимірювальної схеми хлор-срібного електрода порівняння (А) і платинового квазіелектрода (Б).



(А)



(Б)

Рисунок 2.28 – Порівняльні відгуки біосенсора при підключенні до вимірювальної схеми стандартного хлор-срібного електрода порівняння (А) і квазіелектрода порівняння з платинового дроту (Б).

Відгуки, отримані при підключенні стандартного хлор-срібного електрода порівняння, та платинового електрода майже однакові, що дає можливість використання платинового дроту у вимірювальній схемі як квазіелектрода порівняння. Це відкриває привабливу перспективу мініатюризації, оскільки такий електрод можна вбудувати як у вимірювальну комірку, так і власне у транзисторний перетворювач.

2.3.5 Схема експериментальної стаціонарної установки для кондуктометричних вимірювань

Для вимірювання зміни провідності всередині біоселективної мембрани на поверхні кондуктометричного перетворювача була використана вимірювальна установка, схема якої зображена на рис. 2.29.

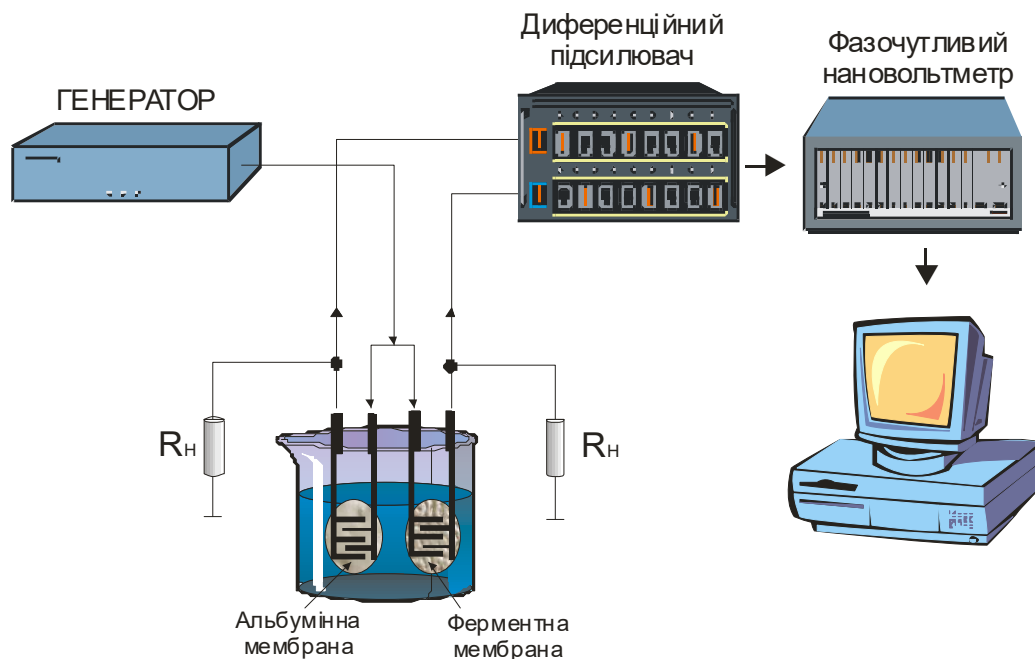


Рисунок 2.29 – Блок-схема виміральної установки для кондуктометричних досліджень

Змінна напруга амплітудою 10 мВ та частотою 100 кГц подається з низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 на пару кондуктометричних електродів, що знаходяться в комірці з розчином, що досліджується. Диференційний режим вимірювань застосовується для підвищення чутливості сенсора та мінімізації неспецифічних шумів. Сигнал, що отриманий на електродах сенсора, знімається з опорів навантаження $R_n = 1$ кОм та поступає на селективний нановольтметр “Unipan-233” через диференційний підсилювач “Unipan-233-6”. Потім цей сигнал подається на реєструючий пристрій (самописець або персональний комп’ютер).

2.3.6 Портативний прилад для роботи з кондуктометричними перетворювачами

На рис. 2.30 представлено схему експериментальної установки на основі портативного аналізатора для проведення вимірів з біосенсорами. На одну пару

електродів (1) наносили робочу ензимну мембрану (3), на другу пару електродів (2) - референтну мембрану (4). В Інституті електродинаміки НАН України згідно наших рекомендацій був розроблений та виготовлений портативний прилад для роботи з кондуктометричними біосенсорами «МСР-3» (5). Кондуктометрична установка включала в себе тримач для біосенсорного датчика (6) та штатив (7). При проведенні досліджень на основу штативу встановлюється експериментальна робоча комірка (8) з досліджуваним розчином (9), а весь біосенсорний блок встановлюють на магнітну мішалку (10). Портативний прилад «МСР-3» підключається до електромережі за допомогою адаптера мережі живлення (11), до біосенсора - дротами через вхідний контактний пристрій (12), а до комп'ютера (13) зі встановленим програмним забезпеченням - через вихідний контакт (14). Вимірювання проводили з використанням змінного струму частотою 37 кГц та амплітудою 14 мВ.

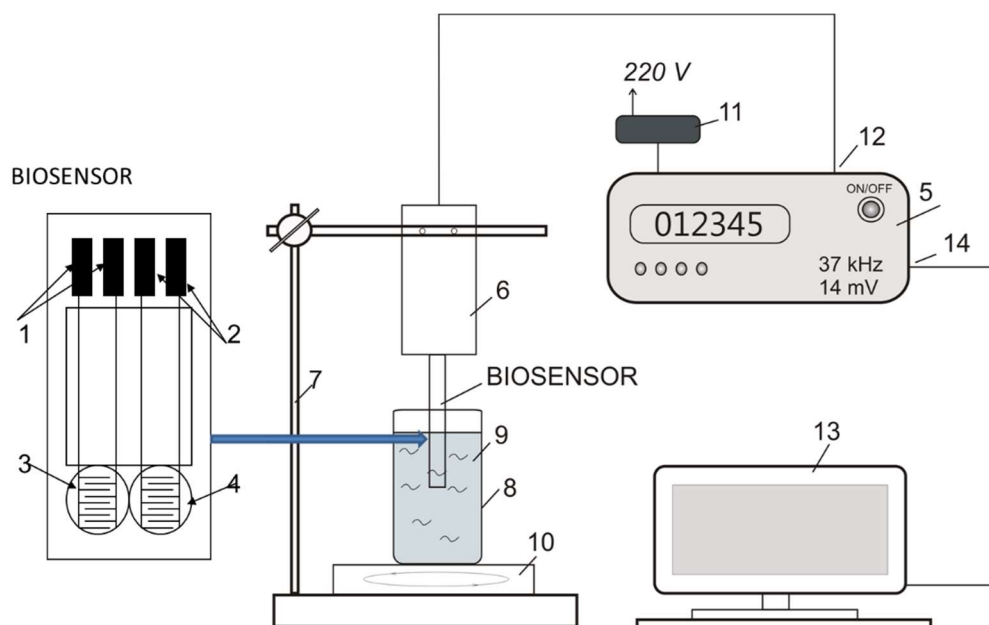


Рисунок 2.30 – Схема кондуктометричної установки на основі портативного кондуктометричного приладу «МСР-3». 1, 2 – контакти електродів, 3, 4 – мембрани, 5 - кондуктометр «МСР-3», 6 - тримач для біосенсора, 7 – штатив, 8 - робоча комірка, 9 - досліджуваний розчин, 10 - магнітний перемішувач, 11 - адаптер мережі живлення, 12 – вхід приладу, 13 - персональний комп'ютер, 14 – вихід приладу

Зовнішній вигляд такої системи зображено на рис. 2.31.

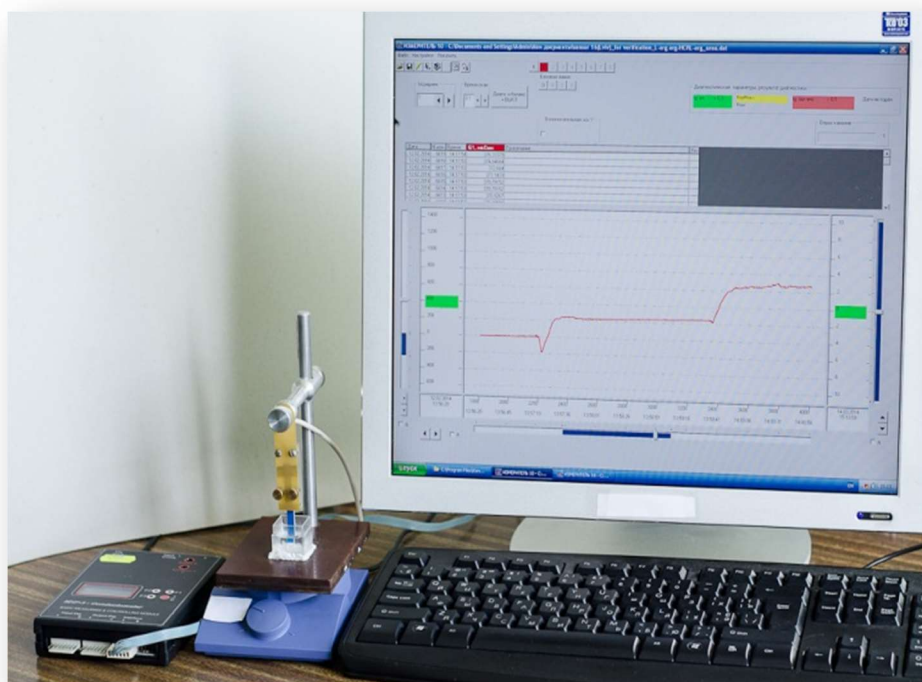


Рисунок 2.31 – Загальний вигляд кондуктометричної установки на основі портативного аналізатора «МСП-3»

2.4 Виготовлення біоселективних елементів

2.4.1 Імобілізація ензимів в насичених парах глутарового альдегіду

Для створення біоселективних елементів за основу був взятий метод ковалентної імобілізації ензимів за допомогою глутарового альдегіду [13]. Біоселективні мембрани отримували шляхом коімобілізації на поверхні перетворювача ензиму з БСА у парах ГА. В процесі виготовлення робочої мембрани готували розчини ензимів (АцХЕ чи БуХЕ) у 20 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,4) з кінцевими концентраціями від 10 мг/мл до 100 мг/мл в залежності від поставлених задач експерименту, та змішували їх з розчином БСА у співвідношенні 1:1. Для стабілізації ензиму, нанесеного на поверхню перетворювача, та запобіганню передчасному висиханню розчину при імобілізації, до суміші ензим-БСА додавали гліцерин з кінцевою концентрацією 10%. Для приготування референтної мембрани, суміш для імобілізації готували

таким же чином, але замість ензиму брали розчин БСА подвійної концентрації. Краплю суміші ензим-БСА (ензимна мембрана) наносили на одну частину поверхні перетворювача, розчин БСА без ензиму (референтна мембрана) – на іншу. Для полімеризації мембран датчики розміщували в ексикаторі на 20-30 хв в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду. Після полімеризації біосенсиори витримували на повітрі за кімнатної температури протягом 15 – 20 хвилин та відмивали від надлишку глутарового альдегіду та незв'язаних компонентів біоселективних мембран в робочому буферному розчині (10 – 15 хв).

На рис. 2.32 представлено зовнішній вигляд біосенсорів на основі потенціометричних перетворювачів з іммобілізованими БСА - мембранами та їх мікроскопічне зображення.

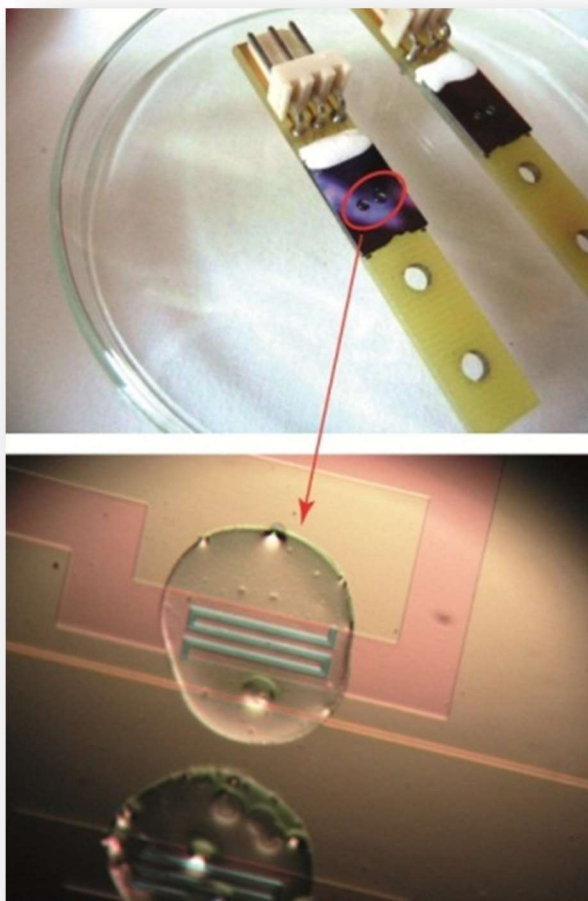


Рисунок 2.32 – Зовнішній вигляд біосенсорів та мікрозображення мембран

Для створення біоселективних мембран різних відносних щільностей (0,5%, 1%, 2%, 5% та 10%) розчини ензимів та БСА готувалися у відповідних концентраціях (5, 10, 20, 50 та 100 мг/мл).

2.4.2 Імобілізація ензимів в краплі глутарового альдегіду

При виготовленні робочих мембран в краплі ГА використовували наступний розчин: 10 % ензиму та 10 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, з 20 % гліцерином [14]. Суміш для приготування референтної мембрани готували ідентичним образом, але замість ензиму брали тільки 20 % БСА. Перед нанесенням розчини для робочої та референтної мембран змішували з 2 % водним розчином глутарового альдегіду у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші наносили на робочі поверхні перетворювачів (0,05 мкл - 0,15 мкл на кожну пару) та висушували протягом 45 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після висихання мембран біосенсиори занурювали у робочий буферний розчин з метою вимивання незв'язаних молекул глутарового альдегіду та інших компонентів біоселективної мембрани.

2.4.3 Імобілізація ензиму після модифікації поверхні перетворювача силанізацією

Силанізацію проводили шляхом нанесення 1% розчину аміносилану в етанолі (об'єм краплі – 0,15 мкл) на поверхню перетворювача. Потім датчики поміщали в піч з кварцовими нагрівальними елементами при температурі 100° С на 40-50 хвилин. Після термічної обробки ІСПТ охолоджували і на їхні робочі поверхні наносили біоселективні елементи згідно процедури, описаної в підрозділі 2.4.1.

2.5 Методики проведення вимірювань

2.5.1 Загальні методи проведення вимірювань

Всі вимірювання проводили при денному світлі за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 1 мл - 5 мл при постійному перемішуванні, в робочому

буфері (фосфатний, Polymix), з рН 5.5 – рН 9.0 в залежності від задач експерименту. Концентрації субстратів та інгібіторів в робочій комірці задавали додаванням до комірки концентрованих вихідних розчинів цих речовин (50 – 500 мМ БуХХ, 50-500 мМ АцХХ) в залежності від необхідного діапазону вимірювань. Розчини токсичних речовин готували в дистильованій воді чи робочому буфері і використовували для інгібування біоселективних елементів безпосередньо в робочій комірці при оборотному інгібуванні або ж для необоротного проводили інкубацію в розчинах токсинів в окремій ємності.

Дослідження проводилися щонайменше у двох - трьох повторностях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричними наводками, були значно зменшені завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

2.5.2 Методика дослідження рН-чутливості ІСПТ за допомогою біосенсорного приладу

Виміри проводилися за допомогою установки МЕС-5 за відпрацьованим алгоритмом. Калібрування приладу і підключеного до нього датчика полягає у встановленні робочої точки датчика (робочої напруги, відповідної середній точці необхідного піддіапазону вимірювання рН) і визначенні калібрувальних коефіцієнтів для перерахунку виміряних величин струмів в каналах датчика в одиниці рН.

Калібрування проводиться за допомогою програмного забезпечення MSW32. Після закінчення калібрування з використанням двох або трьох зразкових розчинів, розраховані програмою значення калібрувальних коефіцієнтів автоматично завантажуються на екран.

У даній роботі в основному ми використовували калібрування ІСПТ за двома точками з використанням стандартних рН розчинів для середньої точки шкали (рН = 7,0) і для кінцевої точки шкали (рН = 10 або рН = 9,18). Для перерахунку

сигналів датчиків в значення рН використовувалась лінійна інтерполяція між вимірними в калібрувальних точках значеннями.

На рис. 3.33 представлено типовий автоматизований звіт про вимірювання рН-чутливості за двома точками рН.

```

Calibration report generated 11.ноя.2020 11:36:53
Calibration type: two-point
pH vs. current dependency approximation: linear

Device #133-17:
Reference voltage = 2.52 V
Sensor 0 current at 7.00 pH is 485 uA
Sensor 1 current at 7.00 pH is 475 uA
Sensor 0 current at 10.00 pH is 613 uA
Sensor 1 current at 10.00 pH is 605 uA
Approximation/interpolation coefficients for sensor 0:
a0 = 3.4200
a1 = 3.9200
Approximation/interpolation coefficients for sensor 1:
a0 = 3.7300
a1 = 3.8500
Approximate pH-sensitivity for sensor 0 = 43 uA/pH
Approximate pH-sensitivity for sensor 1 = 43 uA/pH

```

Рисунок 2.33 – Типовий звіт про вимірювання рН-чутливості за двома точками рН 7,0 і рН 10,0

2.5.3 Методика дослідження вольт-амперних характеристик ІСПТ

Дослідження базових електричних характеристик напівпровідникових структур, а саме вимірювання вольт-амперних характеристик (ВАХ), визначення її крутизни, визначення граничної напруги, вимір різниці струмів в каналах і моніторинг дрейфу структур, проводилися за допомогою приладу СТ-2, розробленого і створеного в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Характеріограф СТ-2 призначений для автоматизованої реєстрації вольтамперних характеристик *p*-канальних іон-селективних польових транзисторів або інших керованих напругою пристроїв, які мають подібні електричні параметри. За допомогою СТ-2 можна отримати порогове значення напруги, робоче значення напруги при $I=500\mu\text{A}$, крутизну, а також ΔI в каналах.

На рис. 3.34 представлено типову вольт-амперну характеристику рН-чутливого ПТ, отриману за допомогою установки СТ-2.

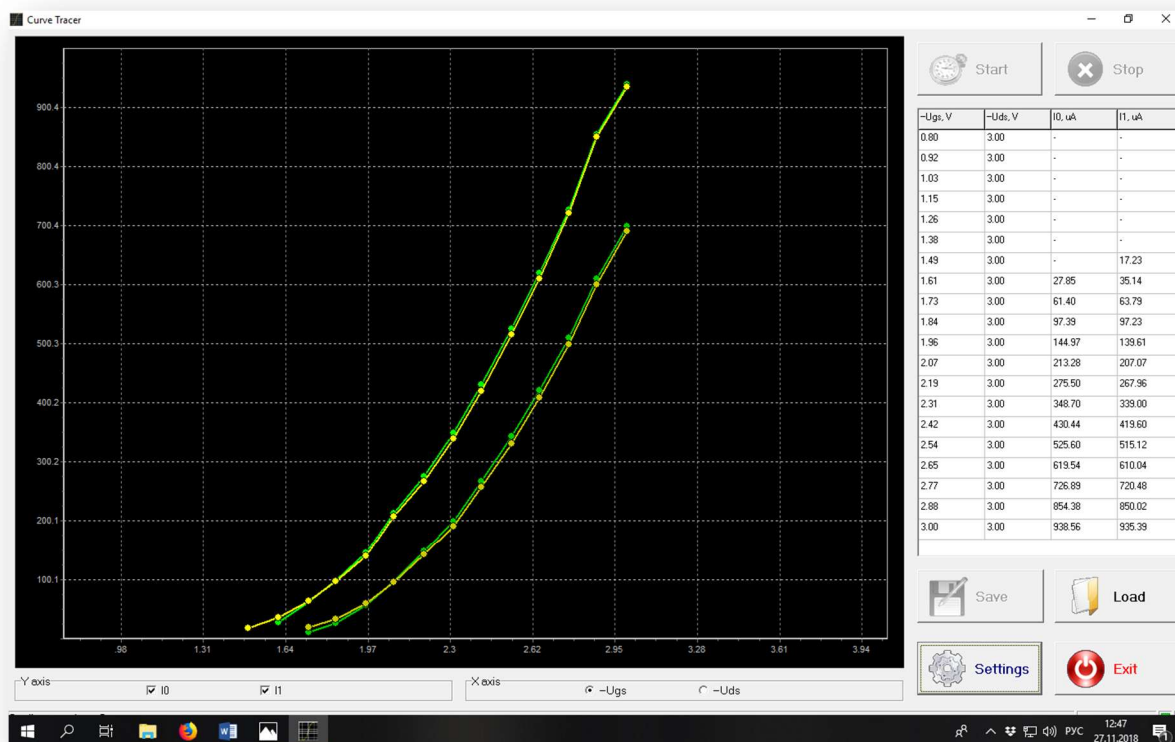


Рисунок 2.34 – Вольт-амперограма двох каналів рН-ПТ, отримана за допомогою характеріографу СТ-2 для двох значень рН 4,0 і рН 10,0

2.6 Методики приготування розчинів токсичних сполук

2.6.1 Приготування зразків, що містять афлатоксини

Зразки для визначення афлатоксинів були спеціально підготовлені в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за наступною процедурою. Продуцент афлатоксину В1 (*Aspergillus flavus*) та охратоксину (*Aspergillus ochraceus*) культивували на різних культурах (пшениця, кукурудза, горіхи, овес, соя, просо) протягом 21 доби. Заражені культури висушували при температурі не більше 60°C, подрібнювали до стану муки та додавали невелику кількість 4% KCl. Після цього отриманий розчин екстрагували протягом 30 хвилин при інтенсивному перемішуванні. Екстракцію із пшениці та

вівса проводили за допомогою ацетонітрила, екстракти упарювали до сухого залишку під зниженим тиском без світла. Отримані зразки розчиняли в 10 мл метанолу і фільтрували від домішків, що можуть механічно пошкодити мембрани біосенсору. Подальша робота проводилась з препаратами, отриманими таким чином.

2.6.2 Приготування розчинів глікоалкалоїдів

До 5 мг сухого порошку чаконіну додавали 2 мл дистильованої води, після чого маленькими порціями (приблизно по 50 мкл) додавали 100 мМ розчин оцтової кислоти до зникнення помутніння розчину. Кінцева концентрація оцтової кислоти у вихідному розчині не повинна перевищувати 5 мМ, щоб уникнути інгібування ферменту самою оцтовою кислотою. Суміш доводили до об'єму 2,5 мл, тобто кінцева концентрація інгібітора становила 2 мг/мл (2,3 мМ). З цього розчину готували 0,5 мл 1 мМ розчину чаконіну. Таким же чином готували розчини соланіну, та інших глікоалкалоїдів та агліконів.

2.6.3 Приготування зразків індольних алкалоїдів

Зразки для аналізу сумарного вмісту індольних алкалоїдів брали з сирової біомаси калюсної культури *Rauwolfia serpentina* (штам К-20). Для приготування зразка використовували сиру біомасу калюсної культури 2-місячного віку після пасажування, з якої витискали вручну через капроновий фільтр з розміром пор 0,3 мм сік для досліджень. Частину отриманого соку використовували одразу для дослідження сумарного вмісту індольних алкалоїдів, другу частину соку фасували по пробірках Eppendorf (об'єм 1,5 мл) і заморожували за температури -20 °С. Після розморожування сік *Rauwolfia serpentina* аналізували також.

2.7 Хроматографічний аналіз

Хроматографічний аналіз проводився за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України використовуючи систему рідинної хроматографії

Agilent 1200 (Agilent technologies, USA) обладнану трьома детекторами: діодним G1315, флуоресцентним G1321A та мас-спектрометричним G1956B. Розділення проводили при швидкості потоку 0,25 мл/хв використовуючи колонку Zorbax SB-C₁₈ (2,1 мм × 150 мм, 3,5 мкм) в режимі ізократичної елюції. Рухома фаза була MeOH/ACN/H₂O 40/10/50 (об/об). УФ-детектування проводили в діапазоні 200-400 нм з особливим наголосом на 230 та 365 нм. Флуоресцентну детекцію проводили при довжині хвилі 365 нм для збудження та 455 нм для емісії. Для того, щоб підтвердити наявність афлатоксинів, використовували мас-детектор налаштований на фіксоване значення m/z в режимі SIM. Зразки іонізували методом електростатичного розпилення (ESI) в позитивному режимі.

2.8 Література

1. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*. 1973;241:20–22.
2. Turkevich J, Hillier J, Stevenson PC. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Disc Farad Soc*. 1951;1:55.
3. Newsam JM., Treacy MMJ, Koetsier WT, De Gruyter CB. Structural characterization of zeolite beta. *Proc R Soc Lond A*. 1988;420:375–405.
4. Creighton EJ, Ganeshie SD, Downing RS, Van Bekkum H. Stereoselective Meerwein-Ponndorf-Verley and Oppenauer reactions catalyzed by zeolite BEA. *J Mol Catal A*. 1997;115:457–472.
5. Akata B, Yilmaz B, Jirapongphan SS, Warzywoda J, Sacco AJr. Characterization of zeolite beta grown in microgravity. *Microporous Mesoporous Mater*. 2004;71:1–9.
6. Dzyadevich SV, Korpan YI, Arkhipova VN, Alesina MY, Martelet C, El'skaya AV, Soldatkin AP. Application of enzyme field effect transistors for glucose analysis in blood serum. *Biosens Bioelectronics*. 1999;14:283–287.
7. Пацковський СВ, Фролов ОС, Шульга ОА, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження напівпровідникових структур для розробки рН-чутливих польових транзисторів. *Сенсорная электроника и микросистемные технологии*. 2005;3:66–73.

8. Павлюченко АС, Кукла АЛ, Голтвянский ЮВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткин АП. Исследование стабильности характеристик рН-чувствительных полевых транзисторов. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2010;4:90–99.
9. Pavluchenko AS, Kukla AL, Goltvianskyi YV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Investigation of stability of the pH-sensitive field-effect transistor characteristics. *Sensor Letters*. 2011;9:2392–2396.
10. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Georgiou C, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for the environmental monitoring based on enzyme inhibition effect. *Sensors and Actuators B*. 2005;55:81–87.
11. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Conductometric enzyme biosensors In: Marks RS, Lowe CR, Culen DC, Weetall HH, Karube I, editors. *Handbook of Biosensors and Biochips*. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. p. 379–394.
12. Архипова ВМ, Бережецький АЛ, Шульга ОА, Шовелон Ж-М, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження та оптимізація кондуктометричних перетворювачів на основі планарної технології. *Сенсорная электроника и микросистемные технологии*. 2005;2:48–54.
13. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Korpan YI, El'skaya AV, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Conductometric formaldehyde sensitive biosensor with specifically adapted analytical characteristics. *Anal Chim Acta*. 2001;445/1:47–55.
14. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора. *Біополімери і клітина*. 2008;24(1):41–50.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА, ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ХОЛІНЕСТЕРАЗ НА ПОВЕРХНЮ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

3.1 Вступ

Процес іммобілізації біологічного матеріалу визначається як включення біоселективних молекул в ізольовану фазу, яка відділена від фази вільного розчину, однак може обмінюватись з нею молекулами субстратів, ефекторів чи інгібіторів [1]. Для іммобілізації ензимів застосовують велику кількість різних як органічних, так і неорганічних носіїв. Основні вимоги, які необхідно виконати при створенні біоселективних елементів, наступні: висока механічна міцність, високі біологічна та хімічна стійкості, достатня проникність для субстратів та інгібіторів (за необхідності), велика питома поверхня, висока вмісткість, пористість, можливість отримання у вигляді зручних в технологічному плані форм, легке переведення в реакційну форму (активація), висока гідрофільність та низька вартість [2].

На рис.3.1 наведено різні методи іммобілізації ензимів.

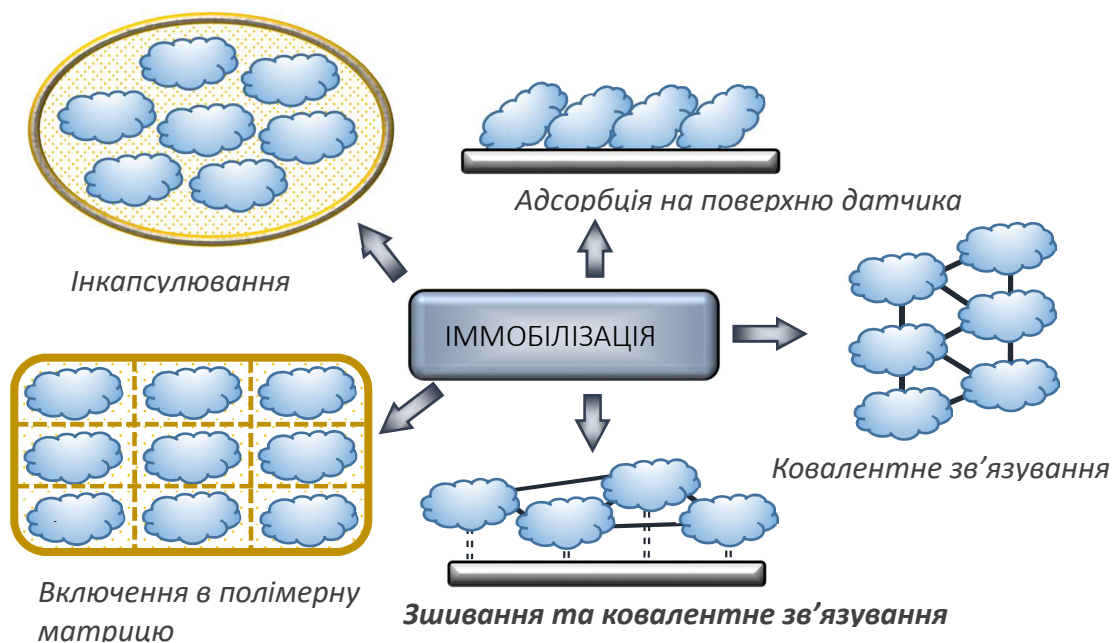


Рисунок 3.1 – Різні методи іммобілізації ензимів

Для успішної іммобілізації холінестераз необхідно було прийняти до уваги наступні фактори.

- ✓ Ензим повинен бути стабільним в умовах проходження реакції, яку він каталізує, і в процесі іммобілізації.
- ✓ При ковалентному зв'язуванні бажано, щоб реагенти, що створюють поперечні зшивки, взаємодіяли переважно з тими хімічними групами, які відсутні в активному центрі. Якщо останню умову не вдається виконати (як це звичайно спостерігається), то поперечно зшиваючий агент повинен бути як можна більших розмірів, що буде перешкоджати його проникненню в активний центр.
- ✓ Активний центр ензиму по можливості необхідно захищати від впливу реагентів в процесі іммобілізації.
- ✓ Процедура видалення „непришитого” ензиму не повинна оказувати негативного впливу на іммобілізований ензим.
- ✓ Необхідно також враховувати механічні властивості носія, особливо його механічну міцність та фізичну форму.

Порівняння різних методів іммобілізації ензимів показало, що для холінестераз оптимальним є такий метод іммобілізації як ковалентне зшивання ензиму в насичених парах глутарового альдегіду [3, 4]. Однак залишалось питання недостатньої відтворюваності самого процесу іммобілізації ензимів. Тому необхідно було дослідити властивості іммобілізованих холінестераз, вплив модифікації поверхні перетворювачів на процес іммобілізації, можливості застосування наночастинок при іммобілізації для покращення їхніх властивостей, дослідити біохімічні параметри іммобілізованих холінестераз, ідентифікувати типи інгібування та розробити математичну модель біосенсора на основі холінестераз.

3.2 Відпрацювання процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів

При дослідженні адгезії біоселективних мембран, коли на нерозрізаний кристал з 64 парами польових транзисторів (див. рис.2.8), які мають абсолютно

однакову властивість поверхні наносились мембрани різної густини та товщини, було отримано висновок: на нерозрізаному кристалі практично всі типи мембран тримаються на поверхні кристалу мінімум 2 тижні.

При роботі ж з окремими розпаяними датчиками вони відділяються від поверхні через 2-3 дні. Готові (розпаяні) датчики були додатково досліджені; знайдено, що на поверхнях пар транзисторів є нерівномірний шар смол, який утворюється при розпаюванні контактних площин на монтажних платах в процесі упаковки та монтажу датчиків. Тому було запропоновано процедуру додаткової хімічної очистки поверхні рН-чутливих польових транзисторів після їх монтажу. Було запропоновано кілька процедур додаткової обробки поверхні транзисторів різними хімічними речовинами та вибрано метод очищення за допомогою розчину біхромату калію, що дозволяє зняти з поверхні перетворювача органічні забруднення.

Така ж сама процедура попереднього очищення була використана і для кондуктометричних перетворювачів.

Після цього проводилась іммобілізація мембран на серію відібраних датчиків протягом різного часу. Роботу кожного сенсора оцінювали за величиною декількох тестових відгуків на додавання певної концентрації субстрату.

Для відпрацювання часу іммобілізації АцХЕ було вибрано вміст ензиму в робочій мембрані 1%. Біоселективна і референтна мембрани наносилися по методиці, описаній в розділі 2, на 5 обраних датчиках та іммобілізувалися в парах глутарового альдегіду протягом різного часу - 10, 20, 30, 40 і 50 хвилин. Час іммобілізації варіювався шляхом вилучення одного датчика з ексикатора, інші ж залишалися в парах ГА для продовження процедури. Далі на кожному з них отримували тестові відгуки на додавання субстрату з кінцевою концентрацією 1 мМ АцХХ. Виміри проводились як мінімум в трьох повторях. На рис. 3.2 представлено результати цих вимірювань.

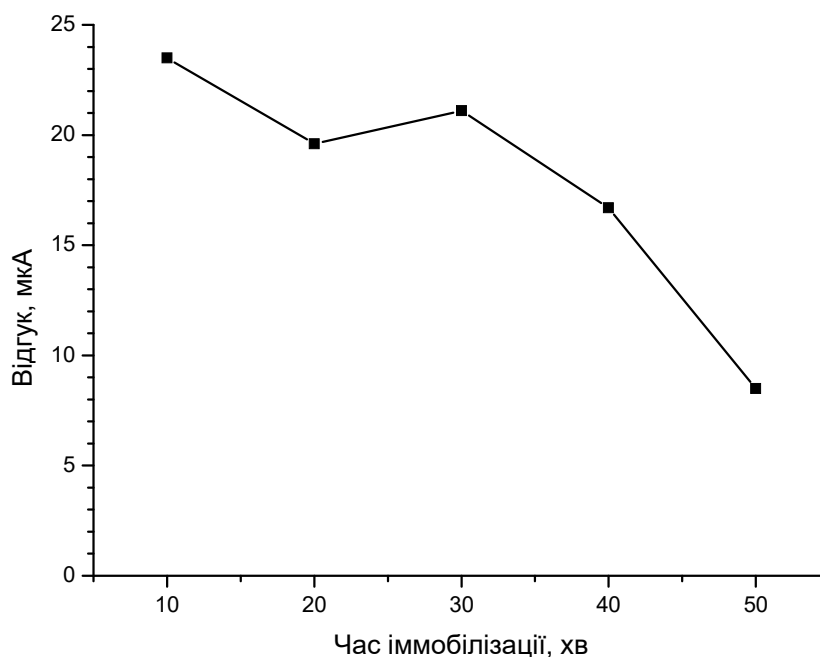


Рисунок 3.2 – Залежність величин відгуків біосенсорів на основі АцХЕ від часу іммобілізації ензима. Концентрація субстрату – 1 мМ АцХХ

Для роботи був обраний діапазон часу іммобілізації 25-35 хвилин, так як з одного боку цього часу достатньо для того, щоб мембрана добре трималася на поверхні перетворювача, з іншого - сенсор показує відносно високі відгуки. При зміні зовнішньої температури цей час може змінюватися, але небажано проводити процедуру нанесення мембран при температурі повітря в приміщенні нижче 18-19°C і вище 25°C. При тривалості іммобілізації менше 20 хвилин, з поверхні сенсорів, що показували непогані відгуки, дуже швидко відкрєплювались мембрани (через 3-5 відгуків), а при іммобілізації більше 30 хвилин - тестові відгуки помітно падали.

Біосенсиори на основі АцХЕ були протестовані на відтворюваність відгуків. Тестовий відгук на концентрацію субстрату 1мМ АцХХ отримували протягом трьох робочих днів. Результати представлено на рис.3.3.

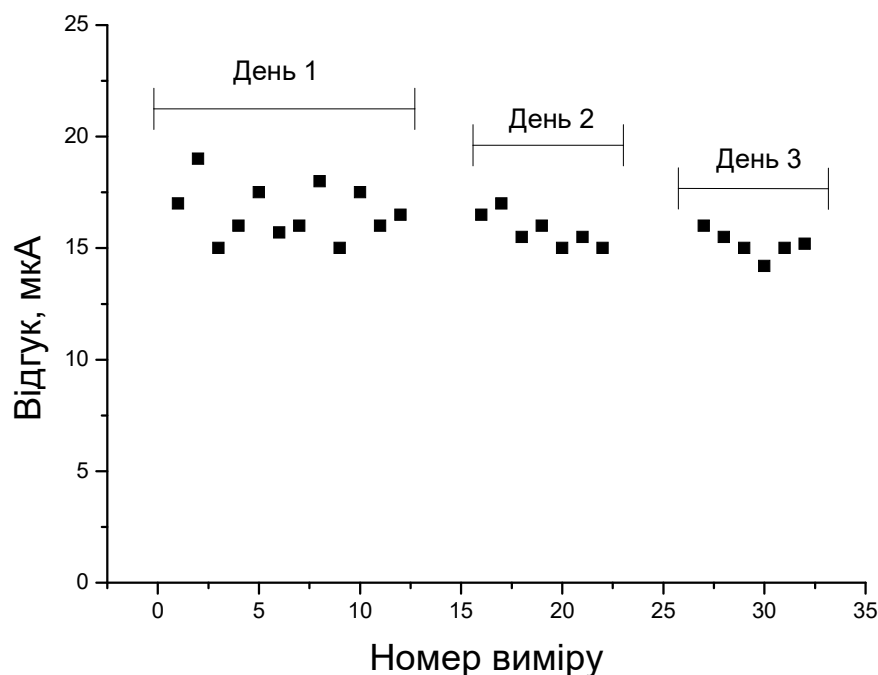


Рисунок 3.3 – Відтворюваність та операційна стабільність тестових відгуків АцХЕ біосенсора. Концентрація субстрату - 1 мМ АцХХ

Добре видно, що АцХЕ біосенсиори демонструють досить непогану операційну стабільність.

Крім того, було проведено експерименти для перевірки стабільності робочих характеристик і величини тестових відгуків при довготривалому зберіганні біосенсора. Він зберігався в робочому 5мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.2, за кімнатної температури (18-22°C) і періодично тестувався за 4 мМ концентрації субстрату АцХХ. Також при вимірах завжди фіксувалися фізичні параметри роботи вимірювальної системи, зокрема, параметри робочої точки перетворювачів - значення опорної напруги і робочих струмів в каналах.

На рис. 3.4 представлено типові криві відгуків, отримані при тестуванні сенсора на 35 день його зберігання. Дуже добре видно, що величина тестових відгуків практично не зменшується, зберігаючи високу відтворюваність результатів впродовж одного дня вимірювань.

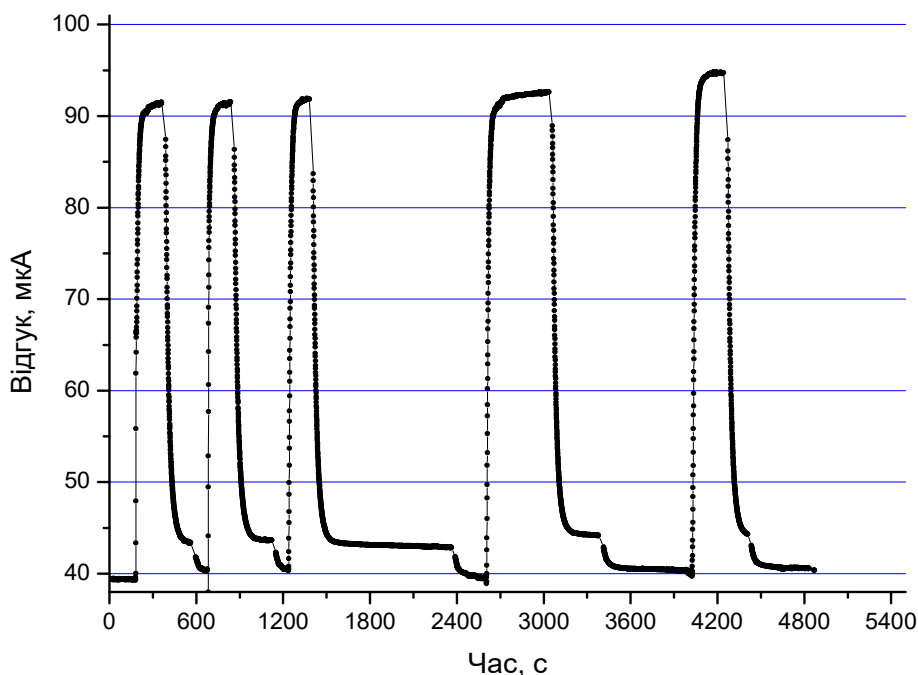


Рисунок 3.4 – Типові відгуки біосенсора на основі 2% АцХЕ мембрани на додавання 4 мМ субстрату АцХХ

Добре видно, що біосенсор на основі АцХЕ при вдалій іммобілізації демонструє дуже високу відтворюваність відгуків і незначне падіння активності ензиму в мембрани при зберіганні за зазначених умов, а також стабільну роботу як системи в цілому, так і самого перетворювача. Однак через деякий час при інтенсивних вимірах відгуки починали «шуміти», що швидше за все, пов'язано з процесами порушення адгезії мембран до поверхні перетворювачів.

Вивчення іммобілізації БуХЕ на поверхнях транзисторів проводили за таким же алгоритмом, як і для АцХЕ-біосенсорів. Нанесення біоселективних елементів проводили на ті ж самі перетворювачі. Вміст ферменту БуХЕ в робочій мембрані вибрали 5%.

Залежність величини відгуку сенсора від часу іммобілізації БуХЕ має наступний вигляд (рис. 3.5).

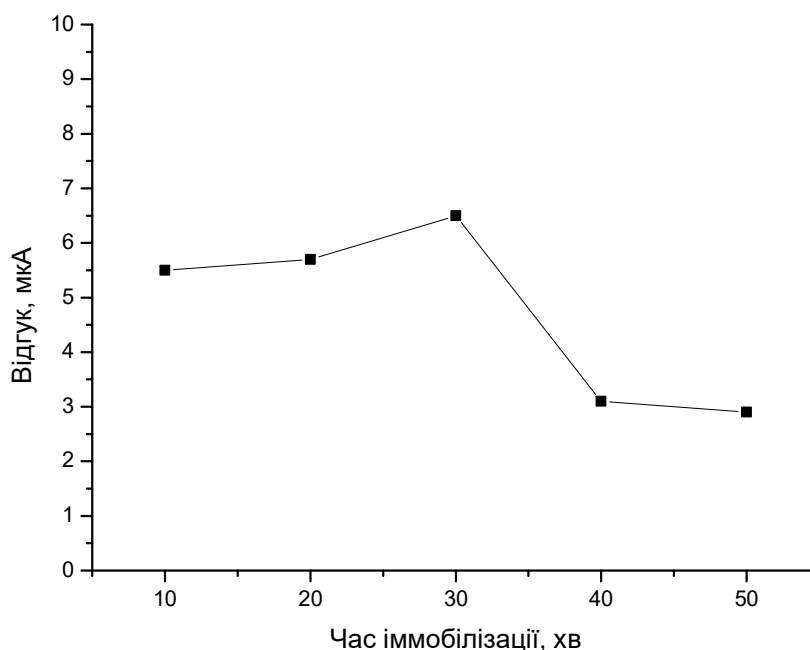


Рисунок 3.5 – Залежність величини відгуку біосенсорів на основі БуХЕ від часу іммобілізації ензиму. Концентрація субстрату – 1 мМ БуХХ

Для подальшої роботи було вибрано час іммобілізації БуХЕ в біоселективній мембрані на поверхню рН-чутливих польових транзисторів – 25-35 хвилин, який може змінюватись в залежності від температури навколишнього середовища. При збільшенні температури повітря час іммобілізації необхідно зменшити, і навпаки – при зменшенні температури – збільшити.

Біосенсиори на основі БуХЕ були також протестовані на відтворюваність відгуків. Тестові відгуки на 1мМ БуХХ отримували протягом трьох робочих днів. Результати представлені на рис. 3.6.

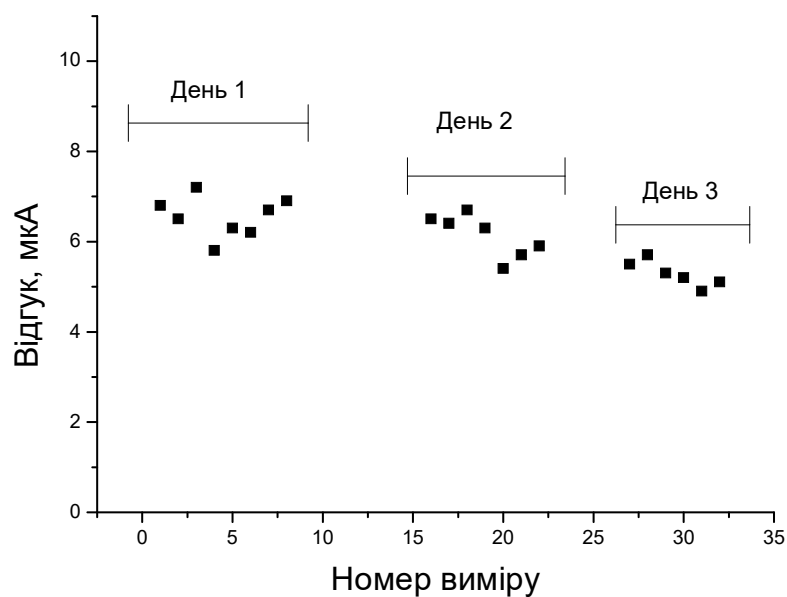


Рисунок 3.6 – Відтворюваність та операційна стабільність тестових відгуків БуХЕ біосенсора. Концентрація субстрату - 1 мМ БуХХ

Також були проведені експерименти з довгострокового зберігання біосенсора з іммобілізованою БуХЕ (рис. 3.7).

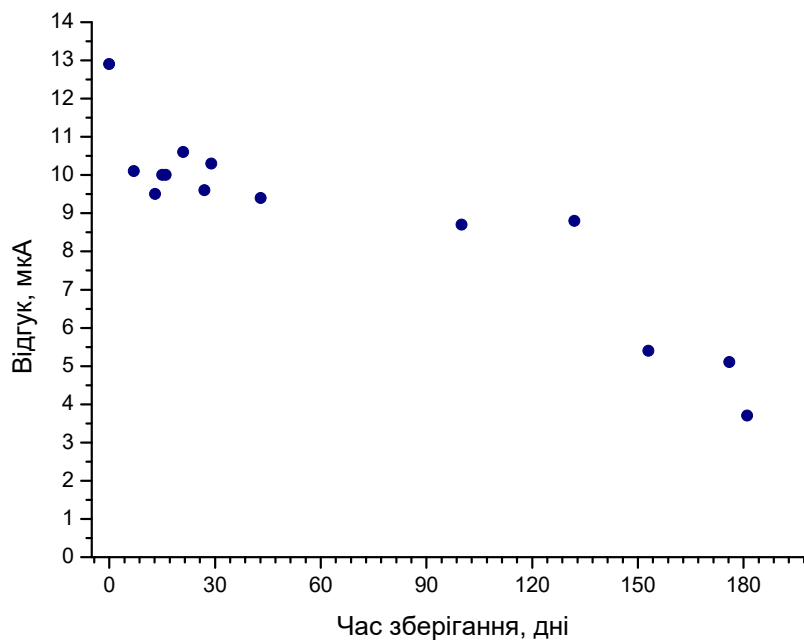


Рисунок 3.7 – Графік падіння активності БуХЕ, іммобілізованої на поверхню транзистора при тривалому зберіганні. Додавання субстрату з кінцевою концентрацією 1мМ БуХХ

З графіку дуже добре видно, що сенсор зберігає свою робочу активність на високому рівні більш, ніж 4 місяці. Потім відбувається падіння тестових відгуків більше, ніж на 50% початкової активності.

Таким чином, можна сказати, що БуХЕ біосенсиори демонструють непогану відтворюваність та стабільність відгуків. Терміни і якість роботи біосенсора в досить великій мірі залежать від якості іммобілізації біоселективного елемента. Іноді відбувається швидка деградація біосенсора, коли на тлі невеликого корисного сигналу сторонні шуми швидко збільшуються і нівелюють його. Найімовірніше цей ефект пов'язаний з процесами поганої адгезії мембран до поверхні перетворювачів. Тому необхідно було провести пошук шляхів модифікації поверхні для покращення процесу іммобілізації холінестераз.

3.3 Дослідження процесу іммобілізації холінестераз після силанізації поверхні

Із літературних джерел відомо, що можливим варіантом покращення адгезії мембран до поверхні перетворювачів – використання процесу силанізації поверхні. Силанізація - це обробка поверхні силанізуючими агентами, такими як триметилхлорсилан, диметилдихлорсилан, дисилазани. Сенса процесу полягає в тому, що присутні на поверхні гідрофільні силанольні групи (-Si-OH) реагують з силанізуючим агентом з утворенням хімічно пришитої гідрофобної силоксанової плівки.

Спочатку були проведені попередні дослідження з визначення оптимальних умов силанізації, зокрема підбиралися розчинники, обсяги та концентрації реагенту для силанізації поверхні перетворювача.

На поверхню ІСПТ наносилась велика крапля 10 % розчину аміносилану, отримана в двох розчинниках – етанолі та толуолі. Потім перетворювачі з нанесеними шарами силанів піддавалися термічній обробці при температурі 80°C.

Після такої попередньої процедури іммобілізували біоселективні елементи - крапля ензимної суміші об'ємом ~ 0,15 мкл наносилася поверх аміносиланованої плівки над затворною областю транзистора (ензимна і референтна мембрани).

Датчик висушувався на повітрі і потім проводилися вимірювання. Біоселективні елементи були двох видів: один стандартний, приготовлений за методикою, описаною вище (Розділ 2), другий - гелі (і ферментний, і референтний) були спеціально приготовлені без додавання гліцерину, для того, щоб поліпшити зв'язування гелю і сіланізованої поверхні.

Результати, які були отримані не відповідали очікуванім. Робочі тестові відгуки сенсорів складали не більше 1,5-2 мкА для обох розчинників, при тому, що при роботі значущим відгуком на додавання 1 мМ субстрату БуХХ ми вважаємо величину відгуку не менше 5-6 мкА.

На другому етапі був приготований 1% розчин аміносилану в етанолі. На поверхню ІСПТ, приблизно по центру кристала наносили краплю силану, яка під дією сили тяжіння практично рівномірно розтікалася по всій поверхні. Оброблені таким чином перетворювачі висушувалися в печі при 80°C протягом 40-50 хв. Потім поверх плівки, що утворилася, наносили біоселективні елементи, які теж були як стандартні (з гліцерином), так і чисті білкові розчини без додавання гліцерину. Робочі тестові відгуки сенсорів складали не більше 0,5-1 мкА.

На рис. 3.8 представлено фотографії чистої поверхні ІСПТ перед іммобілізацією біоселективних елементів.

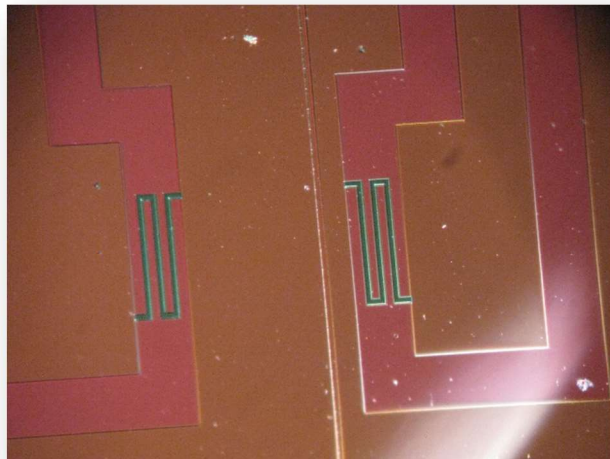
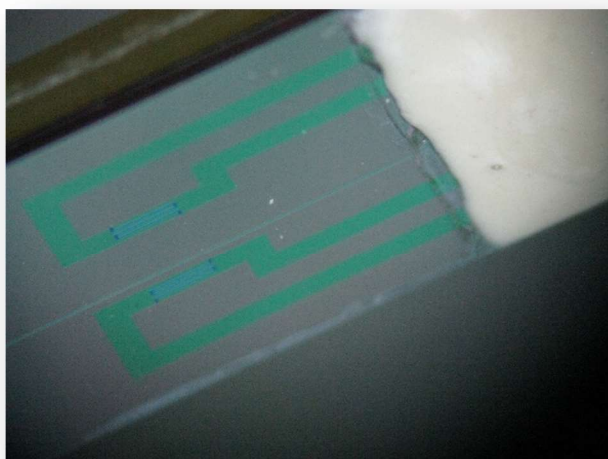


Рисунок 3.8 – Фотографії чистої поверхні ІСПТ перед іммобілізацією біоселективних елементів

На рис. 3.9 представлено фотографії біоселективних елементів, іммобілізованих на чисті поверхні ІСПТ.

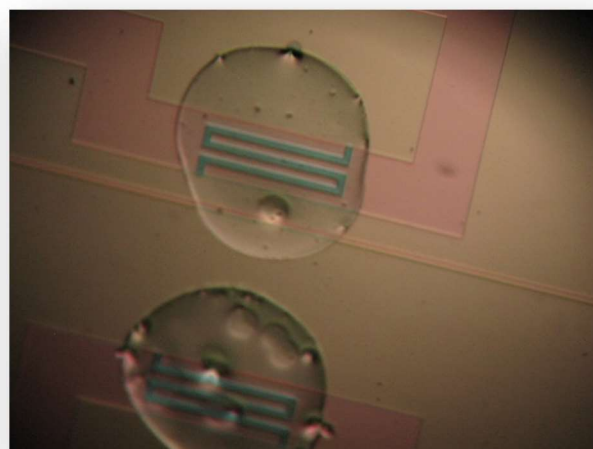
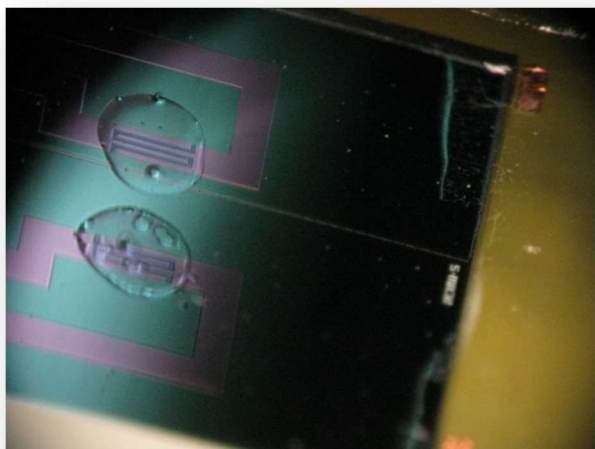


Рисунок 3.9 – Фотографії біоселективних елементів, іммобілізованих на чисті поверхні ІСПТ

На рис. 3.10 представлено фотографії силанізованих поверхонь ІСПТ.

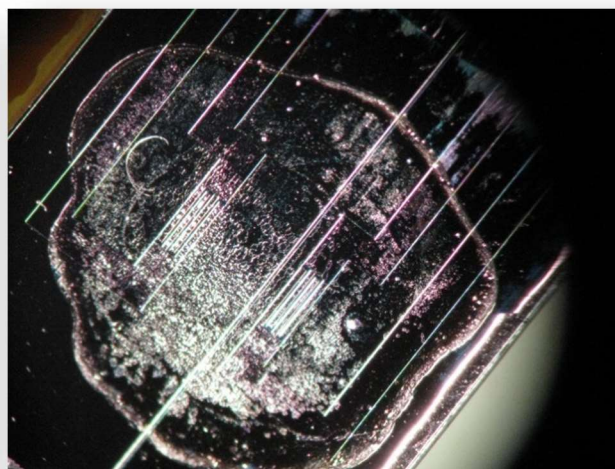
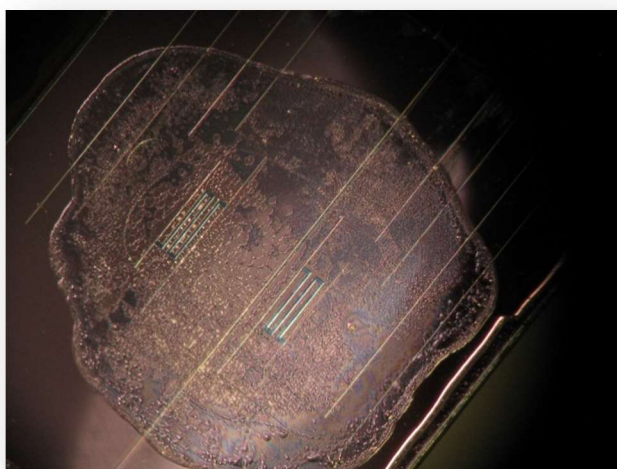


Рисунок 3.10 – Фотографії поверхонь ІСПТ після сіланізації

На рис. 3.11 представлено фотографії біоселективних елементів, іммобілізованих на модифіковану аміносіланом поверхню ІСПТ.

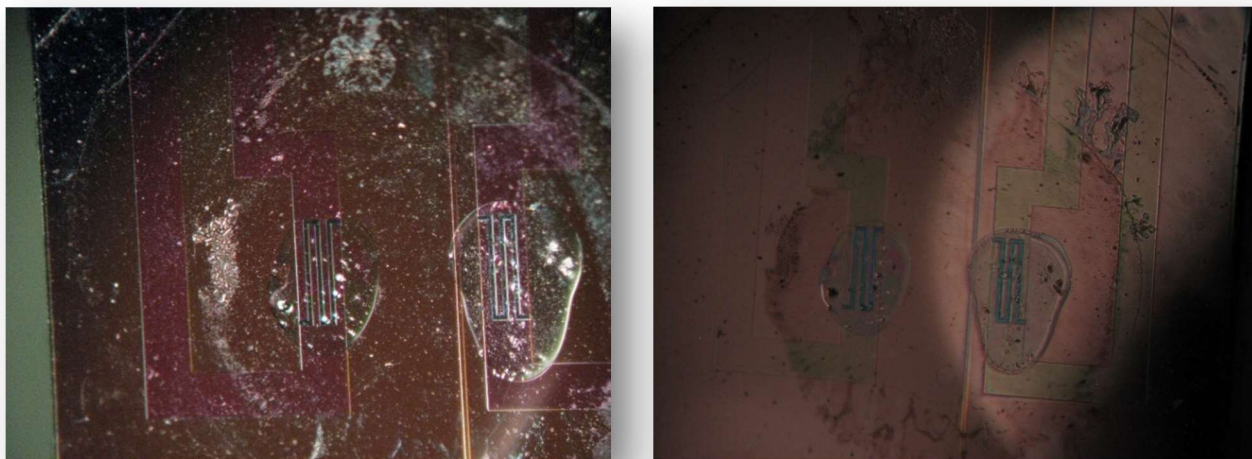


Рисунок 3.11 – Фотографії біоселективних елементів, іммобілізованих на силанізовану поверхню ІСПТ

В тих же умовах було проведено іммобілізацію ензимів на поверхню датчиків без попередньої силанізації поверхні. Сенсорів показали величини відгуків в 3-5 разів більше (7-12 мкА), ніж до силанізації.

Було також отримано, що зберігання сенсорів з іммобілізацією ензимів на силанізовану поверхню в буферному розчині не призводить до яких-небудь істотних змін у відгуках сенсорів. Крім того, після висушування мембран і подальшого їх розмочування в буферному розчині було відмічено, що відбувається істотне порушення робочих характеристик біосенсора. Це полягає в тому, що з одного боку, повторне розмочування мембран займає досить тривалий час (до 1 години), а з іншого - стабілізація робочої точки після силанізації може як зайняти тривалий проміжок часу, так і не відбутися зовсім.

Таким чином, особливих переваг силанізації поверхні з подальшою іммобілізацією холінестераз отримано не було. Відбувається набагато міцніша пришивка біологічного матеріалу до модифікованої поверхні ІСПТ, і відгук на додавання субстратів стає меншим. Можливо це пов'язано зі зменшенням чутливості транзисторів до зміни рН.

3.4 Застосування наноматеріалів для покращення процесу іммобілізації холінестераз на поверхнях перетворювачів

Наночастинки забезпечують ідеальний компроміс, коли мова йдеться про зазвичай суперечливі вимоги, що виникають при оптимізації іммобілізованих ензимів, тобто обмеження мінімальної дифузії, максимальна поверхня на одиницю маси і ефективність навантаження ферментом. Композитні електроди з вмістом металевих наночастинок застосовують як хімічні сенсори або для виготовлення електрохімічних біосенсорів на основі металевих наночастинок. Останнім часом розроблено нові підходи до синтезу полімерних стабілізованих металевих наночастинок із застосуванням інертних (нефункціоналізованих) полімерів як наночастинок, що стабілізують середовище. Електропровідні полімери представляють великий науковий і технологічний інтерес завдяки їхнім унікальним електричним, електронним, магнітним і оптичним властивостям. Нанорозмірні кон'юговані органічні молекули і полімери можна застосовувати для біосенсорів, електрохімічних пристроїв, окремих електронних транзисторів і т.ін.

Одними з перспективних наноматеріалів для біосенсорики є цеоліти. Вони є важливою групою мінеральної сировини для промислових та інших потреб. Формуючись у тріщинах, або порожнинах вулканічних порід, цеоліти є результатом дуже повільного поступового метаморфізму. Деякі формуються від ледь відчутних нагрівання та тиску, і їх можна умовно називати метаморфічними, тоді як інші знаходяться у більш жорстких метаморфічних режимах. Термін «цеоліт» був започаткований шведським мінералогом Акселем Фредериком Кронштедом, який помітив, що внаслідок швидкого нагрівання матеріалу стильбіту той виділяв велику кількість пари води, яка була адсорбована матеріалом. На основі цього він назвав матеріал «цеолітом» (zeolite) від грецьких слів *zeō*, що означає «кипіння», та *lithos*, що означає «камінь». Цеоліти поєднують у собі рідкісність, складність та унікальність форми кристалів. В останні роки вони інтенсивно досліджуються завдяки ряду унікальних властивостей, які можуть бути використані для модифікації біосенсорів. [5]. Тому на сьогодні перспективним напрямком в розвитку біосенсорних технологій є використання нових

нанорозмірних матеріалів для покращення аналітичних характеристик біосенсорів на основі цеолітів.

Нами було проведено комплекс експериментів для оцінки можливості поліпшення роботи біоселективних елементів на основі ферменту БуХЕ та різних цеолітів.

Відгуки біосенсорів на основі БуХЕ досліджували та порівнювали при модифікації перетворювачів частинками цеоліту ВЕА, що були обробленими за різних температурних режимів (ВЕА-1, ВЕА-2 та ВЕА-3). Отримані калібрувальні криві біосенсорів на основі іммобілізованої БуХЕ з різними частинками цеоліту ВЕА показані на рис. 3.12.

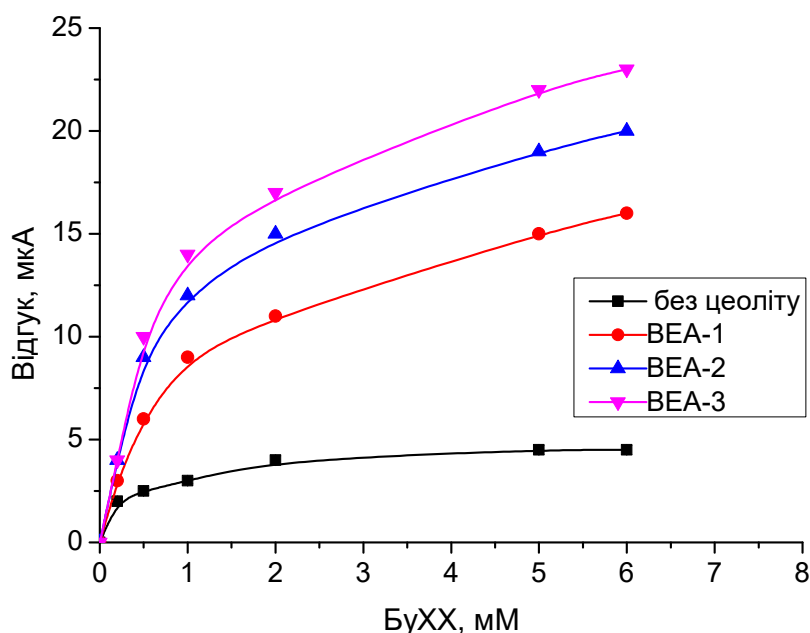


Рисунок 3.12 – Калібрувальні криві біосенсорів на основі іммобілізованої БуХЕ з та без термооброблених зразків ВЕА. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

Додавання цеолітів в біоселективні ензимні мембрани БуХЕ біосенсорів збільшувало відгуки приблизно в 3 рази. Отримані відгуки були найвищими для варіантів біосенсора з використанням зразків ВЕА-1, а ефекти мінялись в такому порядку ВЕА-1 > ВЕА-2 > ВЕА-3. Ці результати вперше продемонстрували, що

можна адаптувати поверхні перетворювачів цеолітами для отримання більшої чутливості біосенсорів.

Операційна стабільність та відтворюваність, як важливі робочі характеристики біосенсорів, також вивчались в залежності від присутності у біоселективних елементах різних цеолітів ВЕА. Відгуки на внесення тестової концентрації субстрату 5 мМ БуХХ визначали протягом одного робочого дня з 30-хвилинними інтервалами, протягом яких біосенсиори постійно знаходились у робочому буферному розчині за кімнатної температури. Як видно з рис. 3.13, біосенсиори продемонстрували високу відтворюваність сигналу. Крім того, проводили експерименти щодо дослідження стабільності біосенсорів (модифікованих цеолітами та без них) при зберіганні в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури. Всі зразки біосенсорів, що містять цеоліт ВЕА, були стабільними.

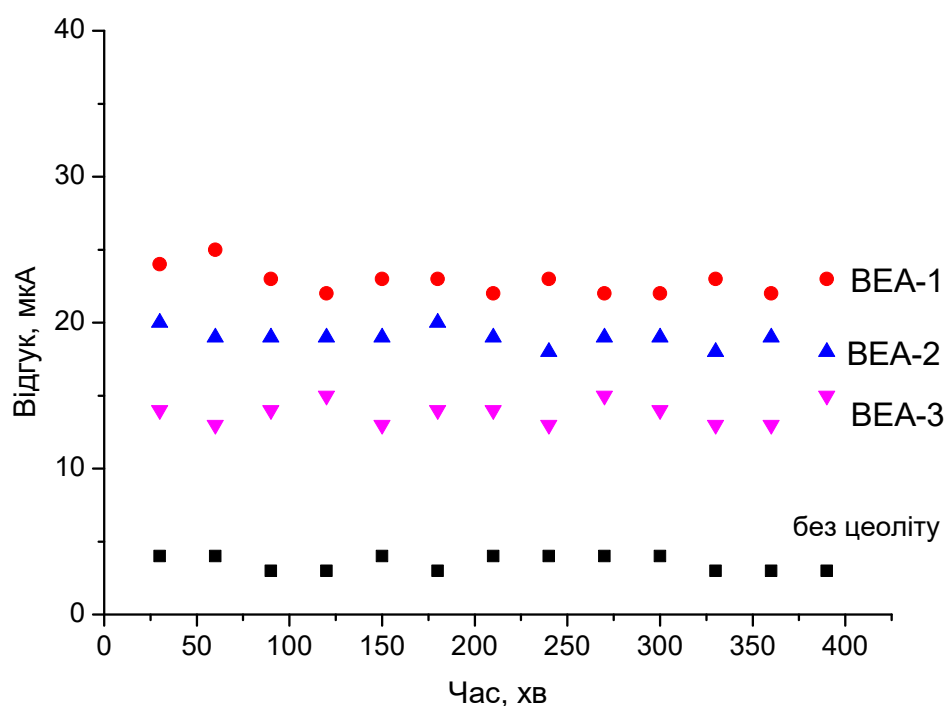


Рисунок 3.13 – Операційна стабільність біосенсорів з іммобілізованою БуХЕ та цеолітами. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Концентрація БуХХ 5 мМ

Наступним етапом дослідження було вивчення впливу модифікації біоселективного елемента наночастинками золота на роботу ензимного біосенсора на основі холінестераз.

Наночастинки золота (НЧЗ) можуть широко використовуватись в біосенсорах на основі ензимів. НЧЗ є високопровідними та біосумісними, можуть утворювати міцні тіолові зв'язки між органічними речовинами (наприклад, залишками цистеїну в складі молекул ензимів) [6]. Таким чином, наночастинки можуть покращити відповідне мікросередовище для іммобілізації ензимів, а активність іммобілізованого ензиму буде збережена [7].

В роботі ми використовували наступні процедури іммобілізації:

1. Колоїдний розчин НЧЗ у співвідношенні 1:1 змішували тільки з біоселективною 5% БуХЕ мембраною; референтна мембрана: 5% БСА.
2. Колоїдний розчин НЧЗ у співвідношенні 1:1 змішували як з біоселективною 5% БуХЕ мембраною, так і з референтною 10% мембраною.
3. Іммобілізація без використання НЧЗ. Біоселективна мембрана: 2.5% БуХЕ; референтна мембрана: 5% БСА.

Всі варіанти мембран в кінцевій концентрації мали 5% білку.

Було показано, що внесення до складу біоселективного елемента наночастинок золота призводить до помітної зміни результатів аналізу. Якщо при звичайній іммобілізації (метод 3), тестові відгуки сенсорів на 1 мМ БуХХ не перевищували 8 мкА, то при додаванні в біоселективну мембрану наночастинок золота (метод 1) тестові відгуки зростали до 18-27 мкА. При додаванні колоїдного розчину НЧЗ в обидві мембрани, ензимну та референтну (метод 2), спостерігалось ще більш значне збільшення відгуків. При контрольному нанесенні обох мембран в суміші з водою замість розчину НЧЗ 1:1, всі сенсори знову показували величини тестових відгуків до 8-9 мкА.

Іммобілізацію АцХЕ з наночастинками золота на поверхню кондуктометричних перетворювачів проводили в розчині глутарового альдегіда (ГА), при цьому методі глутаровий альдегід утворює ковалентні зв'язки між

ензимом та допоміжними речовинами (БСА), під час цього процесу активність ензиму може змінюватись в залежності від часу іммобілізації та концентрації ГА.

Для вибору оптимальної концентрації ГА при іммобілізації виготовляли біоселективні елементи з масовою часткою ГА від 0,2% до 1%. За концентрації ГА 1% тестові відгуки на субстрат (100 мкМ ацетилхолін) були дуже маленькими. Це пояснюється тим, що залишкова активність ензиму після іммобілізації в присутності високої концентрації ГА була низькою. Втім, за низької концентрації ГА (0,2 %) відгуки на ацетилхолін були значно більші, але ж спостерігалось поступове зменшення відгуків біосенсора під час вимірювань, обумовлене недостатньою пришивкою ензиму та поступовим його вимиванням з біоселективної мембрани. Тому для подальшої роботи використовували концентрацію ГА 0,4 % при іммобілізації ензиму в біоселективному елементі біосенсора, за якої відгуки на субстрат були достатньо високі, а зменшення відгуків при безперервній роботі не спостерігалось.

Також було досліджено характеристики роботи біосенсора в залежності від тривалості процесу іммобілізації ферменту (створення біоселективного елементу) (від 20 до 40 хв). При іммобілізації протягом 20 хвилин спостерігалось зменшення відгуків впродовж роботи біосенсора, обумовлене недостатньо стійкою іммобілізацією ензиму, а при іммобілізації 40 хв відгуки були менші за решту випадків, ймовірно через його сильне зшивання. Для подальших іммобілізацій було обрано оптимальний час 25-30 хв, за якого відгуки біосенсорів були достатньо великими та стабільними.

Аналітичні характеристики біосенсора залежать від складу біоселективної мембрани. Цей параметр впливає на чутливість біосенсора, саме тому необхідно підібрати оптимальне співвідношення компонентів в біоселективній мембрані. Наступним кроком експерименту був підбір оптимального співвідношення колоїдного розчину наночастинок золота (концентрація 38,6 мкг/мл) з ензимною сумішшю (5% АцХЕ) під час іммобілізації. В результаті було отримано низку біосенсорів на основі різних співвідношень цих двох розчинів (5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5). Перевірялась залежність відгуків біосенсорів від співвідношення АцХЕ та

НЧЗ, а саме відгуки біосенсора в стані ензимативного насичення субстратом (2 мМ АцХХ) (Рис. 3.14). Як видно з рисунка, оптимальне співвідношення розчинів ензиму і наночастинок золота – 3:1.

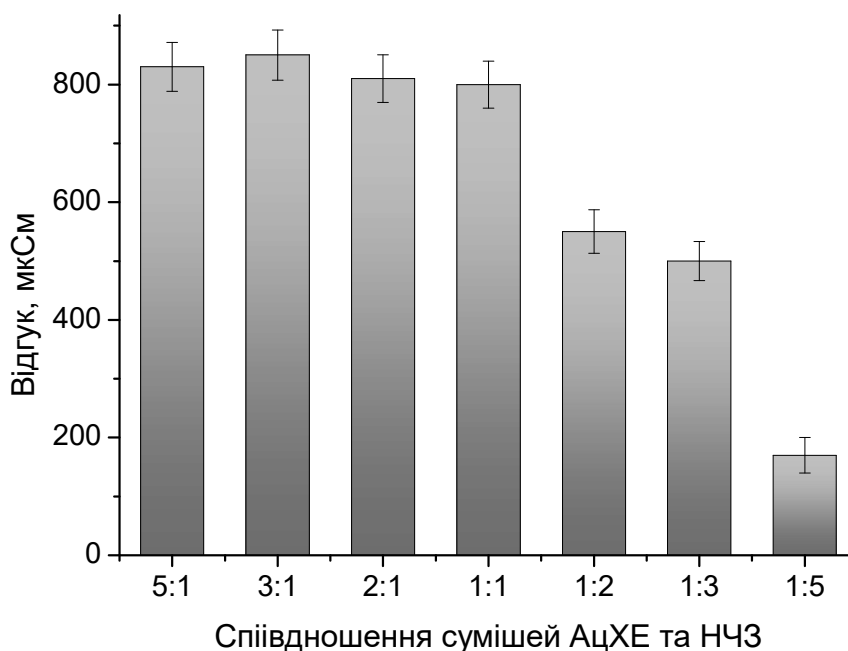


Рисунок 3.14 – Відгуки АцХЕ-біосенсорів на основі різних співвідношень ензиму і наночастинок золота в біоселективному елементі.

Концентрація субстрату - 2 мМ АцХХ

Для аналізу впливу наночастинок золота на іммобілізацію біологічного матеріалу та функціонування біосенсорів, необхідно було порівняти основні характеристики біосенсорів з та без додавання наночастинок золота різних розмірів ($\varnothing$ 20 нм та 30 нм). У всіх варіантах іммобілізації було використано однакову кількість ферменту.

За результатами досліджень побудовано калібрувальні графіки для кожного типу біосенсора (Рис. 3.15).

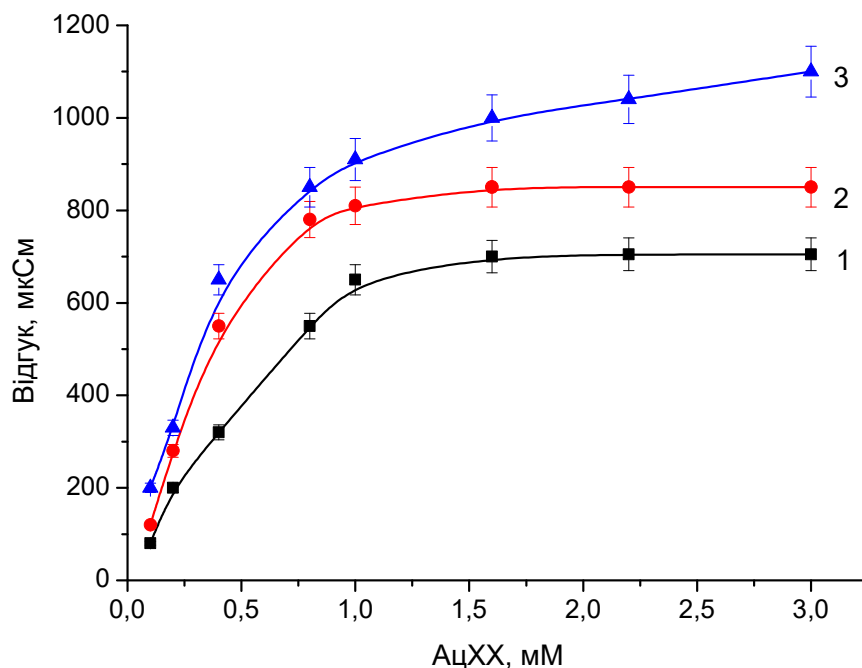


Рисунок 3.15 – Калібрувальні криві біосенсора на основі АцХЕ без використання наночастинок (1), з наночастинками золота 20 нм (2) та з наночастинками золота 30 нм (3)

За отриманими калібрувальними кривими видно, що найкращою чутливістю до субстрату характеризувались біосенсори на основі наночастинок золота 30 нм. Але лінійний діапазон роботи був кращим для біосенсора на основі традиційної методики іммобілізації без наночастинок. Окрім самих калібрувальних кривих оцінювали параметри відгуків біосенсорів на різні концентрації субстрату. Вплив на такі важливі аналітичні характеристики біосенсора, як чутливість, мінімальна границя визначення, лінійний діапазон роботи, шум та дрейф датчика, було скомпоновано і представлено в табл. 4.1 для усіх варіантів біосенсорів на основі АцХЕ.

Таблиця 3.1 – Порівняння характеристик біосенсорів на основі різних варіантів іммобілізації АцХЕ

Характеристики біосенсорів	Варіанти іммобілізації		
	в краплі ГА без НЧЗ	в краплі ГА з НЧЗ (30 нм)	в краплі ГА з НЧЗ (20 нм)
Чутливість, мкСм/мМ	780±20	1835±35	1354±30
Мінімальна границя визначення, мкМ	2,0	1,0	1,5
Лінійний діапазон роботи, мМ	до 0,7	до 0,4	до 0,4
Дрейф, мкСм /хв	12,3	12,1	15,3
Шум, мкСм	5,2	6,1	6,8

Таким чином показано, що цілком можливим та перспективним є створення біосенсорів шляхом коіммобілізації холінестераз з НЧЗ, причому даний варіант іммобілізації не поступався за ефективністю традиційній методиці іммобілізації холінестераз.

3.5 Дослідження біохімічних параметрів іммобілізованих холінестераз

Для кількісного визначення токсичної сполуки за допомогою ензимних біосенсорів найчастіше використовують експресний інгібіторний аналіз, визначаючи ступінь зменшення відгуку сенсора на додавання субстрату для іммобілізованого ензима-мішені в залежності від концентрації інгібітора. Цього, як правило, достатньо для підрахунку вмісту інгібітора в досліджуваних зразках за калібрувальною кривою [8]. Але для оцінки афінності оборотного інгібітора до ензиму недостатньо визначити концентрацію речовини, що зумовлює інгібування реакції на 50%, або коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ [9]. Так, у випадку повного конкурентного інгібування коефіцієнт $i_{0,5}$ не можна вважати вичерпною

характеристикою афінності, оскільки він залежить, зокрема, від початкової концентрації субстрату S_0 , у виборі якої присутня суб'єктивність дослідника, та константи субстрату K_s [9]:

$$i_{0,5} = (1 + S_0/K_s)K_i, \quad (3.1)$$

де K_i – константа інгібування, тобто константа дисоціації ензим-інгібіторного комплексу, яка є кількісною мірою спорідненості інгібітора до ензиму й кількісно дорівнює коефіцієнту $i_{0,5}$ лише у випадку повного неконкурентного інгібування [9]. Тому необхідно було, насамперед, ідентифікувати тип інгібування. Виходячи з цього, завданням було порівняльне дослідження кінетичних характеристик на прикладі іммобілізованих бутирилхолінестераз сироватки крові коня і людини та їх афінності до найбільш поширених стероїдних глікоалкалоїдів картоплі – соланіну й чаконіну, та основному алкалоїду томатів – томатину.

Обидві іммобілізовані БуХЕ демонструють міхаелісівську кінетику насичення бутирилхоліном при концентраціях субстрату 0,25-2,4 мМ (рис.4.16А).

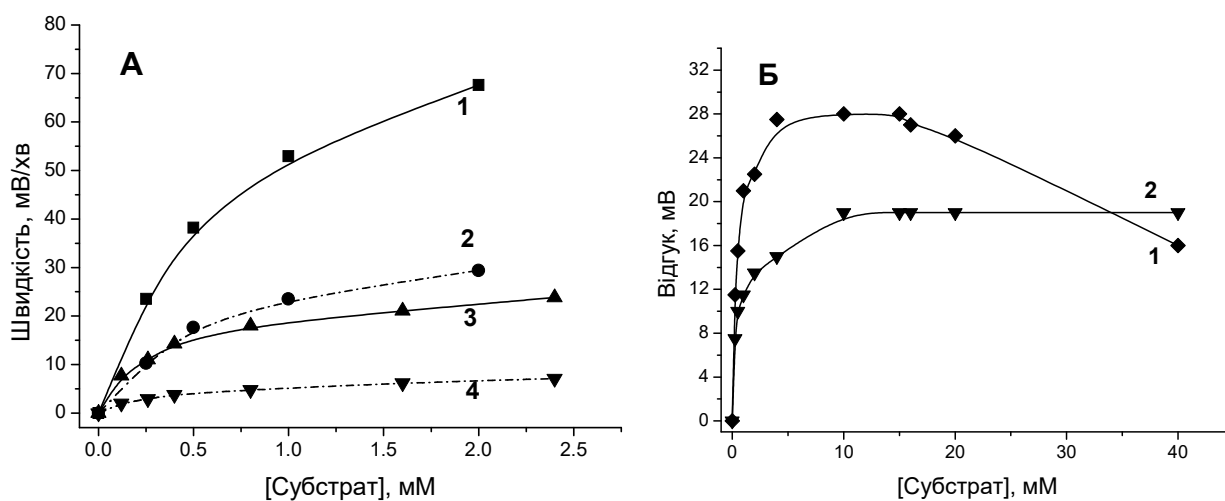


Рисунок 3.16 – Залежність швидкості відгуку (А) та величини відгуку (Б) потенціометричного біосенсора на основі іммобілізованої бутирилхолінестерази з сироватки крові коня (1, 2) та людини (3, 4) від концентрацій АцХХ (2, 4) та БуХХ (1, 3). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5

Для БуХЕ коня показано інгібування надлишком бутирилхоліну (більше 15 мМ) і відсутність інгібування ацетилхоліном (рис. 3.16Б).

Уявні K_m ($<K_m>$) розраховували в координатах Лайнуївера-Берка, Іді-Хофсті та Ханса-Вульфа (рис. 3.17).

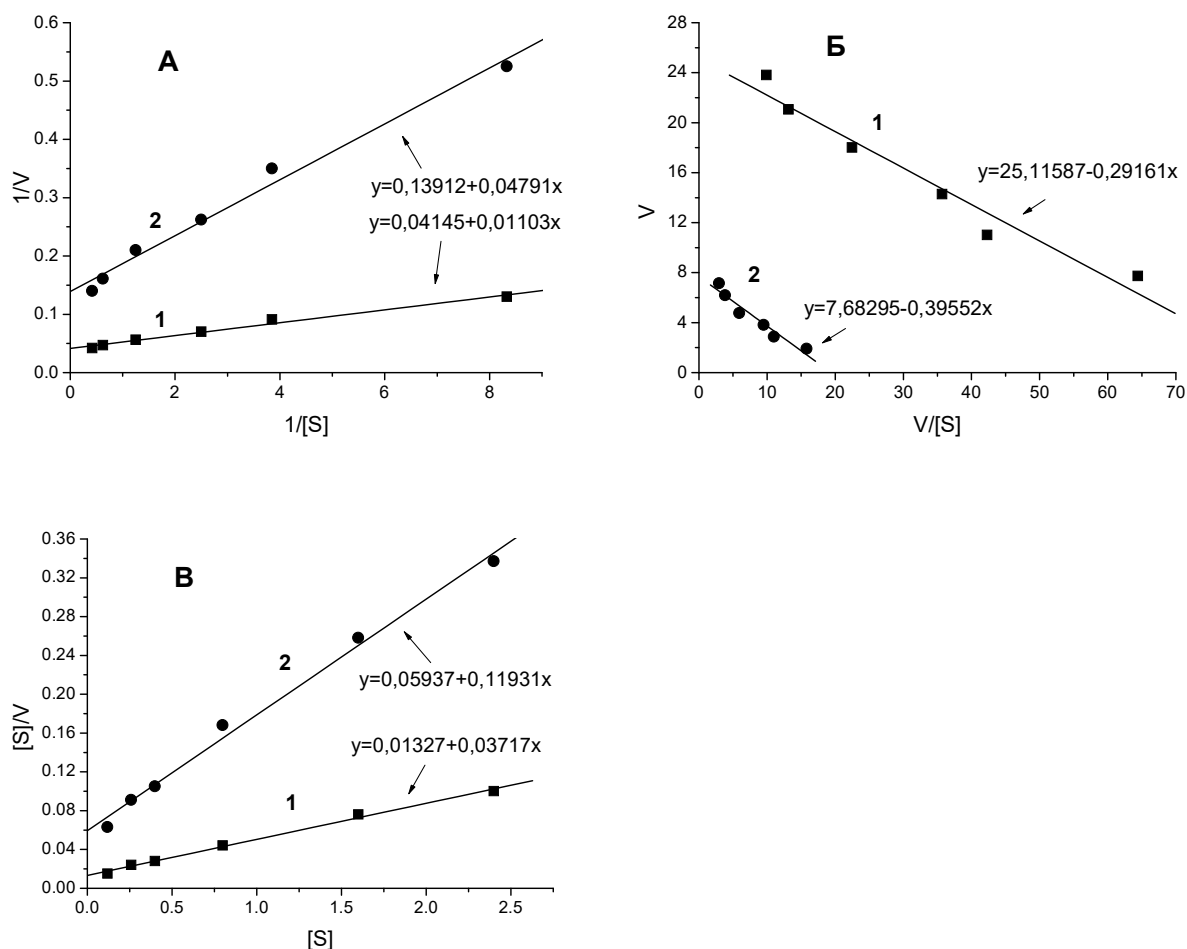


Рисунок 3.17 – Розрахунок кінетичних констант іммобілізованої БуХЕ сироватки крові людини в координатах Лайнуївера-Берка (А), Іді-Хофсті (Б) та Ханса-Вульфа (В). 1-бутирилхолінхлорид, 2-ацетилхолінхлорид

Розраховані константи наведено в табл. 3.2. Отримані величини добре корелюють з константами Міхаеліса, отриманими іншими дослідниками за подібних умов [10-12] для розчинених сироваткових БуХЕ коня та людини. Це певною мірою свідчить про відсутність значних конформаційних змін іммобілізованих в парах глутарового альдегіду бутирилхолінестераз.

Таблиця 3.2 – Уявні кінетичні параметри іммобілізованих бутирилхолінестераза

Графічний метод	БуХЕ сироватки крові коня				БуХЕ сироватки крові людини			
	Бутирилхолін		Ацетилхолін		Бутирилхолін		Ацетилхолін	
	$\langle K_m \rangle$, мМ	$\langle V_{max} \rangle$, мВ/хв	$\langle K_m \rangle$, мМ	$\langle V_{max} \rangle$, мВ/хв	$\langle K_m \rangle$, мМ	$\langle V_{max} \rangle$, мВ/хв	$\langle K_m \rangle$, мМ	$\langle V_{max} \rangle$, мВ/хв
Лайнуїве ра-Берка	1,2	98,8	1,3	42,5	0,3	24,1	0,3	7,2
Іді- Хофсті	0,8	99,7	0,7	39,8	0,3	25,1	0,4	7,7
Ханса- Вульфа	1,1	108,2	0,6	38,9	0,3	26,9	0,5	8,4
Середнє значення	1,0	102,2	0,9	40,4	0,3	25,4	0,4	7,8

Тип інгібування соланіном, чаконіном та томатином визначали в координатах Діксона та Корніш-Боудена. Підтверджено, що всі досліджувані інгібітори по відношенню до обох ферментів є оборотними.

Для БуХЕ з сироватки крові коня показано повне конкурентне інгібування соланіном, чаконіном та томатином (рис. 3.18). В координатах Діксона лінеаризовані криві пересікаються у другому квадранті, в той же час в координатах Корніш-Боудена прямі є практично паралельними, що свідчить про конкурентний характер інгібування. Це означає, що параметр $i_{0.5}$ не можна використовувати для оцінки афінності кожного з глікоалкалоїдів до даного ензиму. Тому, окрім $i_{0.5}$, було обчислено константи інгібування кожним з досліджуваних глікоалкалоїдів графічним методом Діксона (табл. 3.3). Для досліджень було обрано концентрації субстрату, що відповідали величинам $0,5\langle K_m \rangle$, $1\langle K_m \rangle$ та $2\langle K_m \rangle$.

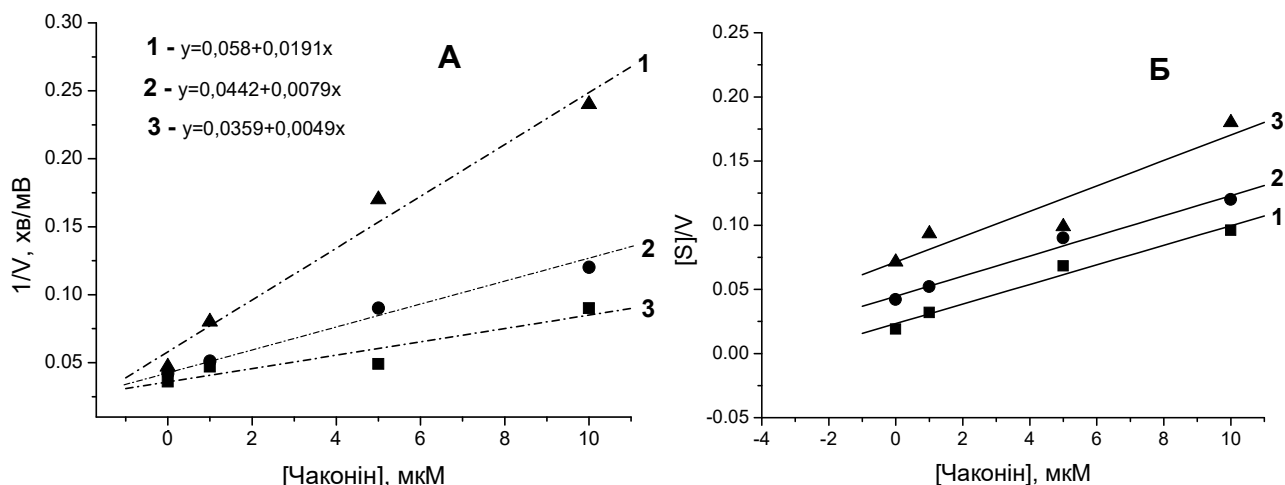


Рисунок 3.18 – Кінетика інгібування іммобілізованої БуХЕ з сироватки крові коня в координатах Діксона (А) та Корніш-Боудена (Б). 1 - 0,4 мМ БуХХ, 2 - 1 мМ БуХХ, 3 - 2 мМ БуХХ

Таблиця 3.3 – Уявні кінетичні параметри іммобілізованої бутирилхолінестерази сироватки крові коня та людини

Інгібітор	БуХЕ коня		БуХЕ людини		
	$i_{0.5}$, мкМ	$\langle K_i \rangle$, мкМ	$i_{0.5}$, мкМ		$\langle K_i \rangle$, мкМ
	1 мМ БуХХ		0,2 мМ БуХХ	1 мМ БуХХ	
Чаконін	11,2	1,4	0,2	0,3	0,2
Соланін	27,9	3,3	0,3	0,5	0,2
Томатин	11,9	1,7	0,9	1,2	1,3

У випадку БуХЕ з сироватки крові людини ідентифікувати тип інгібування виявилось важче (рис. 3.19): в координатах Діксона томатин показав конкурентне інгібування (прямі пересікаються в другому квадранті), тоді як прямі в координатах Корніш-Боудена перетинаються в третьому квадранті, що разом свідчить про, скоріше, змішаний тип інгібування. $\langle K_i \rangle$ обраховували в координатах Діксона по даним, отриманим для концентрації субстрату 0,15 мМ та 0,3 мМ, що відповідає величинам $0,5\langle K_m \rangle$ та $1\langle K_m \rangle$. Виявилось, що чутливість БуХЕ людини до

томатину не дуже відрізняються від такої БуХЕ коня, оскільки відповідні $\langle K_i \rangle$ практично співпадають.

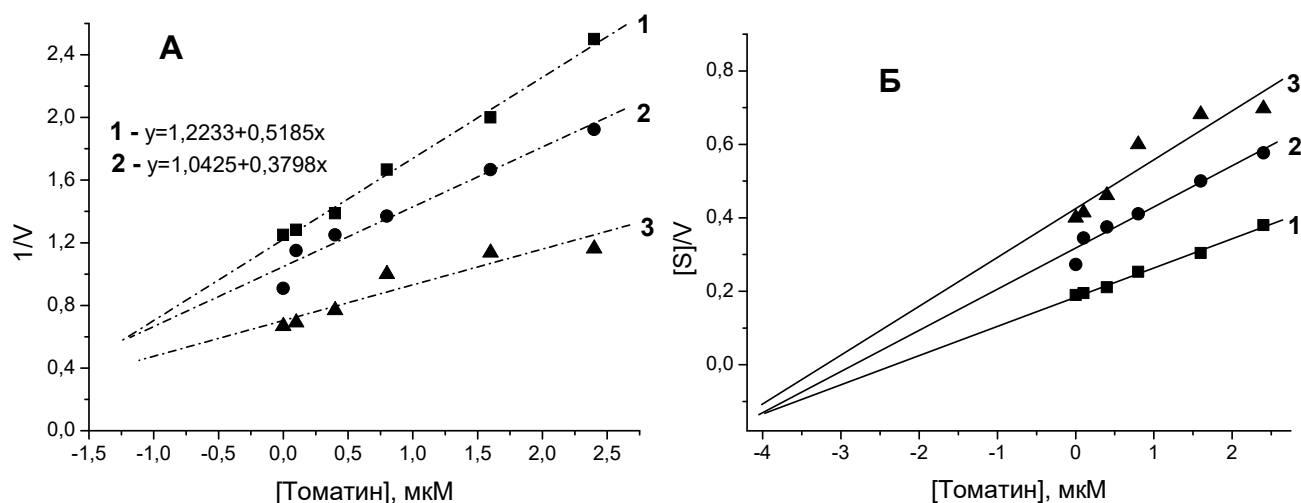


Рисунок 3.19 – Кінетика інгібування іммобілізованої БуХЕ з сироватки крові людини в координатах Діксона (А) та Корніш-Боудена (Б). 1 - 0,15 мМ БуХХ, 2 - 0,3 мМ БуХХ, 3 – 0,6 мМ БуХХ

Змішане інгібування демонструють соланін та чаконін, до яких БуХЕ людини виявляється на порядок чутливішою порівняно з БуХЕ коня.

Для БуХЕ людини було також обраховано $i_{0.5}$ за концентрацій субстрату 0,2 мМ та 1 мМ, що відповідає приблизно $0.6 \langle K_m \rangle$ та $3 \langle K_m \rangle$. Як видно з табл. 3.3, при збільшенні концентрації субстрату величина $i_{0.5}$ для кожного інгібітора зростає, що в певній мірі свідчить про конкурентний характер інгібування. Але вплив чисто конкурентного інгібітора, присутнього в концентрації, що дорівнює K_i , на ензим, який працює на половині максимальної швидкості, має повністю нівелюватися шляхом подвоєння концентрації субстрату з K_m до $2K_m$ [13]. У випадку БуХЕ коня рівень інгібування при наявності глікоалкалоїдів в концентраціях, що дорівнюють їхнім $\langle K_i \rangle$ та концентрації субстрату, що дорівнює $\langle K_m \rangle$, не перевищує 15% (рис.3.20). У випадку БуХЕ людини за концентрації субстрату, що відповідає $3 \langle K_m \rangle$ рівень інгібування всіма трьома глікоалкалоїдами становить близько 40% (рис.3.20), що свідчить про не повністю конкурентний характер інгібування.

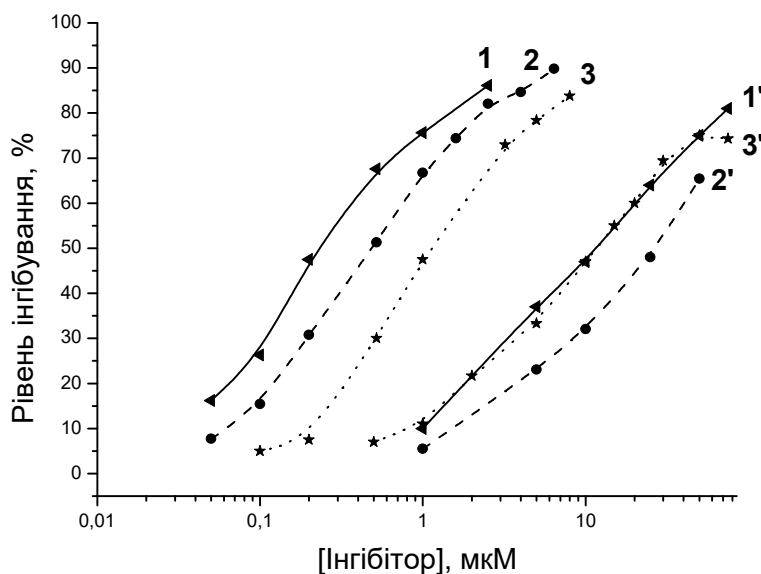


Рисунок 3.20 – Калібрувальні криві біосенсора на основі БуХЕ з сироватки крові коня (1', 2', 3') та людини (1, 2, 3) для визначення концентрацій α -чаконіну (1', 1), α -соланіну (2', 2) та томатину (3', 3). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація БуХХ – 1 мМ

Таким чином показано, що при оптимальному рН іммобілізовані бутирилхоліністерази з сироватки крові коня та людини показали міхаелісівську кінетику гідролізу ацетилхоліну та бутирилхоліну в діапазоні концентрацій 0,2-2,4 мМ. Іммобілізована БуХЕ коня інгібується бутирилхоліном при наявності останнього в концентрації більше за $15 <K_m>$. Глікоалкалоїди соланін, чаконін і томатин виявили оборотний конкурентний характер інгібування іммобілізованої БуХЕ з сироватки коня та змішаний для БуХЕ з сироватки людини. По величині уявної K_i , обрахованої графічним методом Діксона, обидва ферменти виявились однаково чутливими до інгібуючої дії томатину, БуХЕ людини виявилась на порядок більш чутливою до чаконіну та соланіну, ніж БуХЕ коня. Найпотужнішим інгібітором обох БуХЕ виявився чаконін, найменш сильним для БуХЕ коня – соланін, для БуХЕ людини – томатин. Суттєво різна чутливість БуХЕ коня та людини до глікоалкалоїдів дозволяє адаптувати біосенсор та його чутливість для визначення конкретних токсинів.

3.6 Дослідження взаємодії глікоалкалоїдів при інгібуванні іммобілізованої бутирилхолінестерази

α -Соланін і α -чаконін складають 95 % загального вмісту глікоалкалоїдів в картоплі, інші види глікоалкалоїдів наявні лише в слідових концентраціях. Взаємодія між цими двома основними глікоалкалоїдами може мати синергетичний ефект, тобто значно збільшувати токсичність суміші глікоалкалоїдів у порівнянні з їхньою дією кожного окремо.

Вперше дані про синергетичну дію глікоалкалоїдів були отримані в 1973 р., коли Свінярд та Чаубе показали, що суміш глікоалкалоїдів мала більшу токсичність ніж алкалоїди поодиноці [14]. Але це були неочищені екстракти, тому в них могли бути присутні інші невизначені токсичні компоненти, які могли призвести до такого збільшення. Після цього можливий синергетичний ефект глікоалкалоїдів було досліджено різними методами та різними авторами. Роддік та Рійненберг вперше показали на прикладі синтетичних ліпосом, що в присутності суміші α -соланіну та α -чаконіну значно збільшується ступінь руйнування клітинних мембран [15]. α -соланін окремо мав менш токсичний вплив на мембрани за α -чаконін. Деякі комбінації α -соланіну та α -чаконіну мали такий же руйнівний ефект як просто α -чаконін, але для комбінацій 60:40 та 40:60 було отримано синергетичний ефект. Синергізм також спостерігався між іншими парами глікоалкалоїдів [16, 17]. Але у випадку інгібування ацетилхолінестерази глікоалкалоїдами синергетичного ефекту між соланіном і чаконіном отримано не було [18].

Тому наступною задачею було дослідження взаємодії основних глікоалкалоїдів картоплі α -соланіну і α -чаконіну при інгібуванні ними іммобілізованої бутирилхолінестерази.

В звичайній картоплі існують різні комбінації соланіну з чаконіном, тому цікаво було дослідити вплив цих компонентів на бутирилхолінестеразу при різних співвідношеннях. На рис. 3.21 приведено результати інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази за різних концентрацій α -чаконіну та α -соланіну та їхніх

сумішей в різних комбінаціях. Крім того, досліджено три різні діапазони концентрацій глікоалкалоїдів при їхній сумарній концентрації 2, 10 та 50 мкМ. Таким чином ми майже повністю перекривали лінійний діапазон інгібування іммобілізованої на поверхні біосенсора бутирилхолінестерази глікоалкалоїдами. З рисунків чітко видно тенденцію інгібування бутирилхолінестерази глікоалкалоїдами поодинці та їхньою сумішшю.

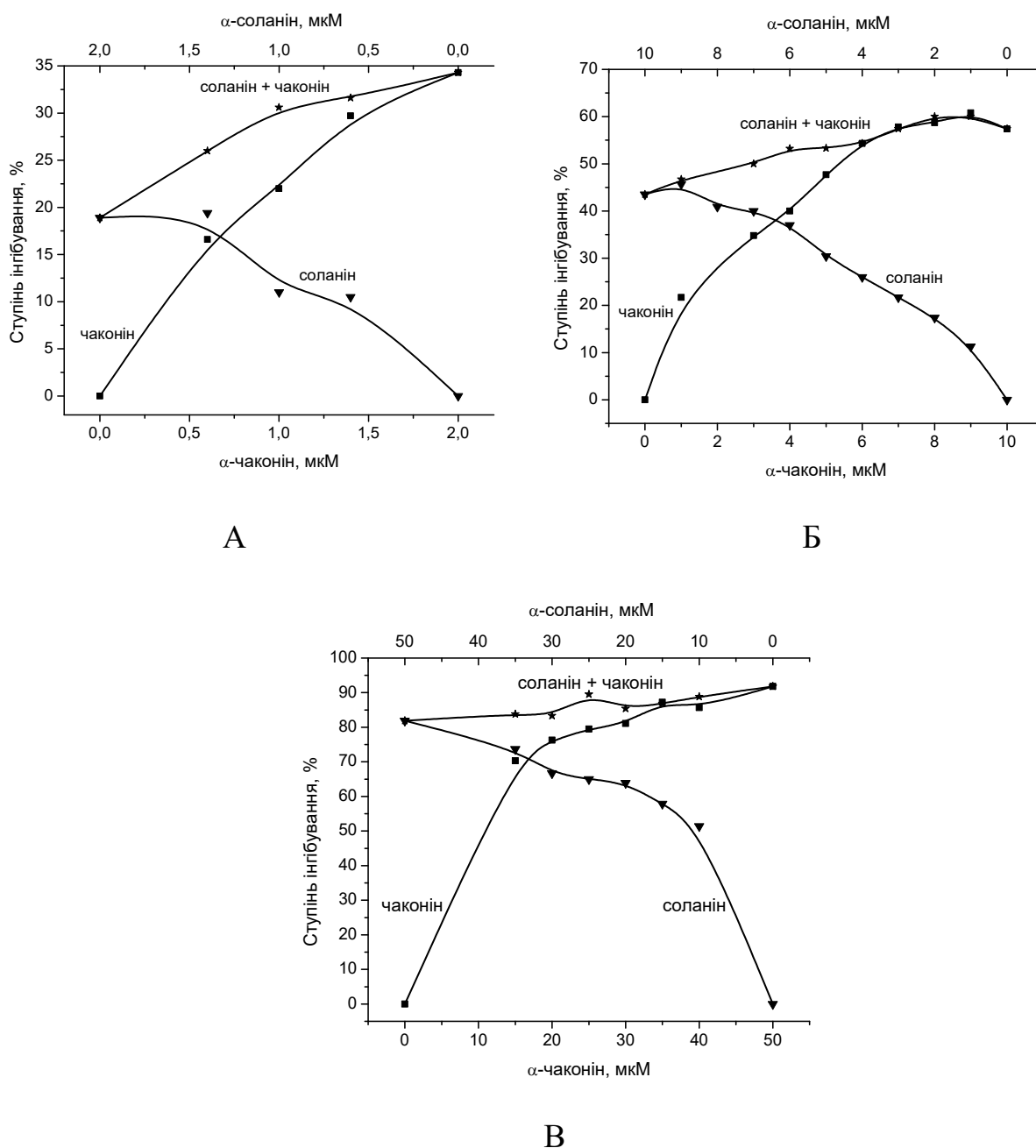


Рисунок 3.21 – Рівень інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази від концентрацій α -чаконіну та α -соланіну та їх різного співвідношення при сумарній

концентрації 2 мкМ (а), 10 мкМ (б) та 50 мкМ (в). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, концентрація бутирилхолін хлориду – 0,5 мМ

Для інтерпретації отриманих результатів використовували графічний метод ізоболограм [19]. Типову ізобольну діаграму для визначення синергізму, ефекту додавання чи антагонізму представлено на Рис. 3.22.

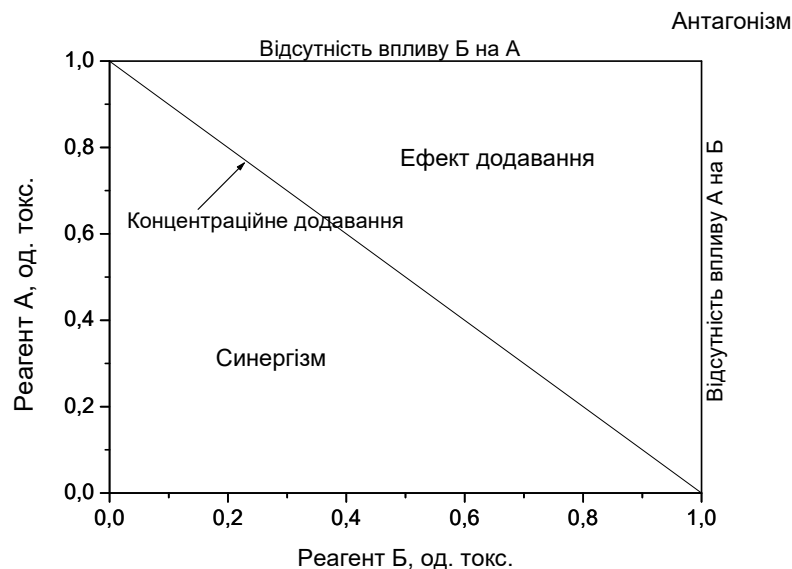


Рисунок 3.22 – Типова ізобольна діаграма для визначення ефектів синергізму, додавання чи антагонізму

При будуванні такої діаграми кожна компонента перераховується в комплексні одиниці токсичності, що відкладаються на осях x та y . При цьому точки, що попадають на діаграмі нижче лінії концентраційного додавання, визначають ефект синергізму, тобто значного збільшення комбінованого впливу суміші речовин у порівнянні з впливом цих компонентів окремо. На противагу цьому точки, що знаходяться вище кривої концентраційного додавання, відповідають за ефект додавання. Це той випадок, коли комбінований ефект суміші дорівнює сумарному ефекту впливу цих компонентів окремо. Точки, що лежать за межами ліній незалежності однієї компоненти від іншої, відповідають за ефект антагонізму. В цьому випадку відбувається зменшення впливу комбінованого ефекту суміші речовин у порівнянні з окремими компонентами. Одиниці токсичності для кожної

суміші визначались як відношення ефекту інгібування ензиму кожною окремою компонентою до ефекту інгібування ензиму їхньою сумішшю.

На Рис. 3.23 наведено ізобольні діаграми для різних співвідношень концентрацій соланіну та чаконіну при інгібуванні іммобілізованої бутирилхолінестерази.

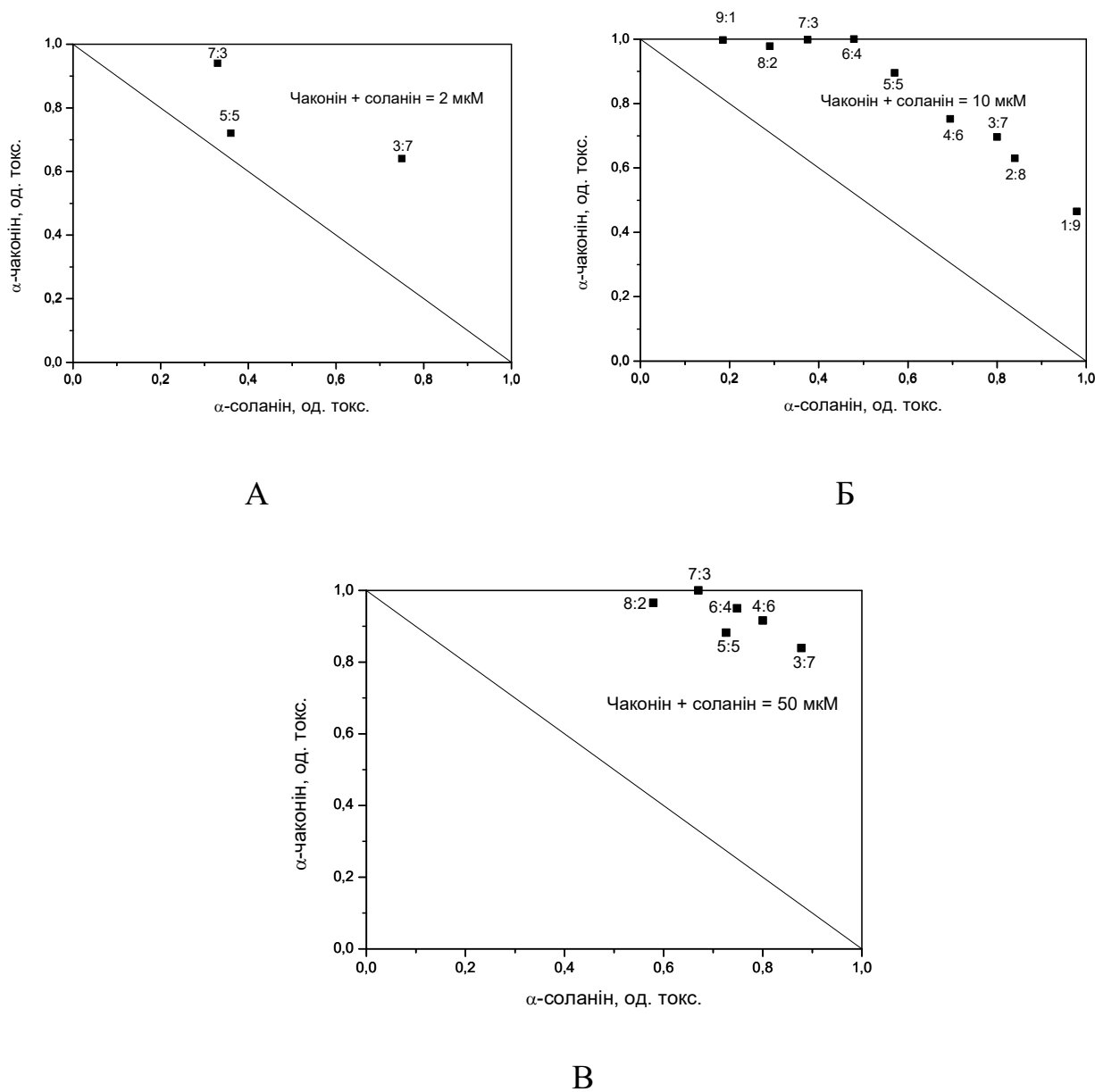


Рисунок 3.23 – Ізобольні діаграми інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази різними сумішами α-чаконіну та α-соланіну при їхніх сумарних концентраціях 2 мкМ (А), 10 мкМ (Б) та 50 мкМ (В)

Із рисунків чітко видно, що у всіх випадках інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази різними сумішами глікоалкалоїдів ми маємо ефект додавання, тобто інгібування окремими компонентами і їх сумішшю просто сумується, а не збільшується в декілька разів, як могло бути у випадку синергізму. Це підтверджується даними роботи [18], в якій автори також не спостерігали синергізму між чаконіном та соланіном при інгібуванні ацетилхолінестерази на відміну від праць, в яких показано синергетичну дію суміші глікоалкалоїдів при руйнуванні клітинних мембран у порівнянні з їхньою дією окремо [14-17, 20-26]. Така різниця в ефектах може бути пов'язана з тим, що у випадку клітинних мембран відбувається зв'язування карбогідратних ланцюгів глікоалкалоїдів з рецепторними сайтами мембран, що призводить до змін в структурах мембран, розріджуючи їх. На протилежність цьому, механізм інгібування холінестераз скоріше за все обумовлений природою стероїдної частки глікоалкалоїдів, а саме з соланідіном. Протонована частка соланідина може розпізнаватись активним сайтом холінестераз як четвертична амонійна компонента, ідентична четвертичній структурі бутирилхоліну, який є субстратом бутирилхолінестерази. В цьому випадку і чаконін, і соланін мають подібні можливості до інгібування холінестераз на відміну від впливу на структуру мембран, коли чаконін значно активніший за соланін. Але в роботі [27] нами було показано, що аглікон соланідин не інгібує холінестерази так сильно, як соланін та чаконін. Це свідчить про те, що карбогідратні ланцюги глікоалкалоїдів також впливають на процес інгібування бутирилхолінестерази. Все це може пояснити механізм ефекту додавання при інгібуванні бутирилхолінестерази різними комбінаціями глікоалкалоїдів.

Таким чином, використовуючи біосенсор та метод ізоболограм було показано, що суміші α -чаконіну з α -соланіном притаманний ефект додавання, при якому рівень інгібування сумішшю складається з рівней інгібування окремих компонентів.

3.7 Математичне моделювання

Використання математичного моделювання може бути корисним інструментом для кращого розуміння біохімічних процесів та використовується для оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів. Починаючи з сімдесятих років та до сьогодні, різні математичні моделі були розроблені та успішно застосовані для оптимізації роботи біосенсорів [28-30]. Так, наприклад, за останні десять років S. Loghambal, L. Rajendran та ін. запропонували декілька математичних моделей для амперометричного біосенсора з іммобілізованим ензимом на основі нелінійних диференціальних рівнянь, які описують кінетику Міхаеліса-Ментена та дифузію субстрата та інгібітора до активного центру ензиму [31-32], а також математичну модель роботи амперометричного та потенціометричного біосенсорів [33]. В цих моделях використовують метод гомотопічних збурень для вирішення системи рівнянь в умовах стаціонарності. Ашеріс і співавтори описали математичні моделі амперометричних біосенсорів [34-35], в яких змінюючи входні параметри (такі як концентрація реагентів, кінетичні константи та товщина мембрани), їм вдалось поліпшити чутливість розроблених біосенсорів. В цих моделях для вирішення системи рівнянь використовували метод кінцевих різниць при стаціонарних та нестаціонарних умовах. Переважна більшість розроблених математичних моделей описують ензимні біосенсиори для прямого визначення субстрату. Нашим завданням було розробити математичну модель на прикладі біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну.

При інгібіторному визначенні α -чаконіну за допомогою БуХЕ-біосенсора функціонування останнього умовно можна поділити на наступні етапи (рис. 3.24): отримання базової ліній (0), відгук на робочу концентрацію БуХ як субстрата (I), та відгук на α -чаконін як інгібітора (II).

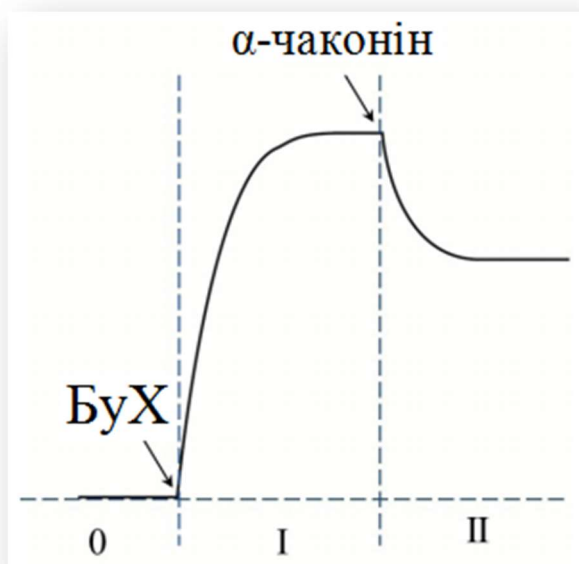


Рисунок 3.24 – Схематичне зображення роботи БуХЕ-біосенсора на основі ІСПТ при інгібиторному визначенні α -чаконіну

На нульовому етапі, коли біоселективна мембрана знаходиться в контакті тільки з робочим буфером, в мембрані не відбувається ніяких реакцій, сигнал біосенсора відображає «базову лінію» (рис.3.24, етап 0). На першому етапі відбувається ензиматична реакція за участю субстрата, який додається у робочу комірку. В результаті цієї реакції утворюється продукт, в результаті чого змінюється локальна концентрація протонів в приелектродній області, що реєструється потенціометричним перетворювачем. Ця зміна візуалізується у вигляді відгуку на субстрат (рис.3.24, етап I). На другому етапі роботи біосенсора, при додаванні у вимірювальну комірку α -чаконіну, який є оборотнім інгібітором БуХЕ, відбувається реакція інгібування ферменту. Як було показано раніше, механізм інгібування БуХЕ α -чаконіном відноситься до змішаного типу інгібування, який можна схематично представити таким чином (рис. 3.25):

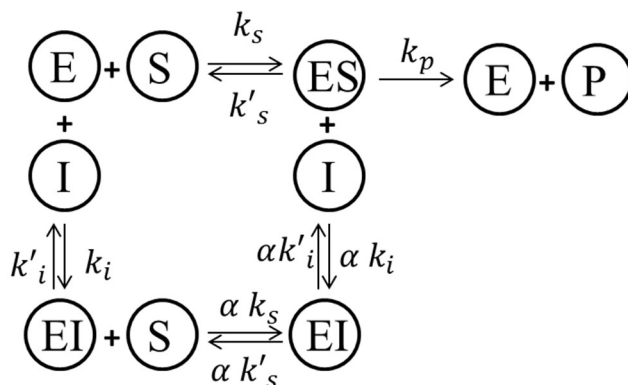


Рисунок 3.25 – Схематичне зображення ферментативної реакції у біоселективній мембрані потенціометричного біосенсора на основі БУХЕ при інгібіторному визначенні α -чаконіну (E – фермент, S – субстрат, I – інгібітор)

На рис. 3.25 k_s та k'_s – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (ES), k_p – константа швидкості утворення продукту (P), а k_i та k'_i – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (EI).

Математичну модель ферментативної реакції у потенціометричному біосенсорі на основі БУХЕ-ІСПТ при інгібіторному визначенні α -чаконіну можна описати наступною системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{dn_e(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - k_i n_e(t) n_i(t) + k'_s n_{es}(t) + k'_i n_{ei}(t) + k_p n_{es}(t) \quad (3.2)$$

$$\frac{dn_s(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + k'_s n_{es}(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (3.3)$$

$$\frac{dn_{es}(t)}{dt} = k_s n_e(t) n_s(t) - k'_s n_{es}(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) - k_p n_{es}(t) \quad (3.4)$$

$$\frac{dn_i(t)}{dt} = -k_i n_e(t) n_i(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + k'_i n_{ei}(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) \quad (3.5)$$

$$\frac{dn_{ei}(t)}{dt} = k_i n_e(t) n_i(t) - k'_i n_{ei}(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (3.6)$$

$$\frac{dn_{esi}(t)}{dt} = \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) - \alpha k'_i n_{esi}(t) + \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) - \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (3.7)$$

$$\frac{dn_p(t)}{dt} = k_p n_{es}(t) - k_w n_p(t) \quad (3.8)$$

де $k_s, k'_s, k_i, k'_i, k_p$ – відповідні константи швидкості реакцій утворення комплексів; k_w – константа вимивання; α – константа, чисельне значення якої визначає активування чи інгібування ензиму; $n_s(t), n_e(t), n_p(t), n_i(t), n_{ei}(t), n_{es}(t), n_{esi}(t)$ – концентрації субстрату, ензиму, продукту, інгібітору, а також ензим-інгібіторного, ензим-субстратного та ензим-субстрат-інгібіторного комплексів відповідно, що змінюються з часом. Зміна з часом концентрації продукту $n_p(t)$ є прямо пропорційною відгуку біосенсора.

Враховується також, що в системі зберігається постійна загальна концентрація ензиму E_0 , таким чином в будь-який момент часу сума концентрацій вільного (E) та зв'язаного (ES), (EI), (ESI) ензиму дорівнює $(E) + (ES) + (EI) + (ESI) = E_0$.

Система диференціальних рівнянь, яка описує математичну модель функціонування біосенсора для визначення α -чаконіну, розв'язувалась чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica 10 та вбудованого NDSolve алгоритму, а результати моделювання зображені на рис. 3.26.

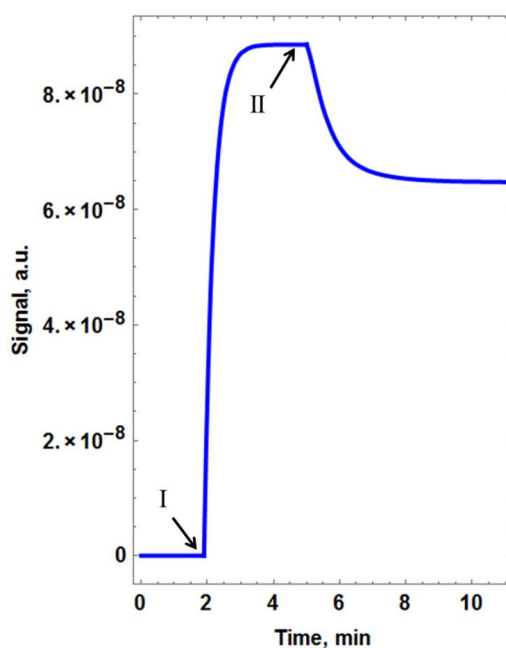


Рисунок 3.26 – Математичне моделювання ензиматичної реакції в мембрані БуХЕ/ІСПТ біосенсора, використовуючи кінетичні рівняння (3.2 – 3.8)

На нульовому етапі моделювання задаються наступні початкові умови $n_s(0) = n_i(0) = n_p(0) = n_{es}(0) = n_{ei}(0) = n_{esi}(0) = 0$, тобто коли в системі немає субстрату та інгібітору, а лише вводиться початкова концентрація ензиму у робочій мембрані біосенсора. При заданих початкових умовах та заданих параметрах знаходяться розв'язки системи, та будується похідна $n_p(t)$, що відповідатиме базовій лінії.

На першому етапі система розв'язується при початкових умовах, які задаються розв'язками системи нульового етапу, а також задається початкова концентрація субстрату, що додається у робочу комірку.

На другому етапі моделюється відгук на інгібітор, при підстановці попередніх розв'язків та початкової концентрації інгібітору $n_i(t)$, яка відома за умовами експерименту.

Розв'язок системи знаходиться за заданих початкових умовах та вхідних параметрах, та розраховується його похідна. Саме похідна концентрації протонів пропорційна сигналу біосенсора. Це можна пояснити наступним чином. Робоча схема вимірювального приладу передбачає виміри струму в каналі транзистора, струм в свою чергу є похідною заряду у часі:

$$I(t) = \frac{dQ(t)}{dt} \quad (3.9)$$

В нашому випадку рішення системи відповідає саме заряду або кількості згенерованих протонів, тому доцільним є будувати похідну розв'язку для моделювання роботи описаного біосенсора.

Важливими вхідними параметрами для моделювання роботи біосенсора є концентрація субстрата (n_s), інгібітора (n_{i_1} , n_{i_2} , n_{i_3} та n_{i_4}) та ензиму (n_e) в біоселективній мембрані біосенсора. Ці початкові концентрації були отримані з експериментальних даних (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Параметри математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну, які були використані для її чисельного моделювання

Позначення	Числові значення концентрацій	Одиниці вимірювання
n_e	$5,8 \times 10^{-4}$	моль/л
n_s	1×10^{-3}	моль/л
n_{i_1}	1×10^{-6}	моль/л
n_{i_2}	2×10^{-6}	моль/л
n_{i_3}	5×10^{-6}	моль/л
n_{i_4}	10×10^{-6}	моль/л

Біохімічні константи швидкості реакцій k важко отримати прямо з експерименту. В даному дослідженні ці константи були підібрані таким чином, щоб модельний відгук співпадав із експериментальними відгуками. Встановлено, що стабільна робота біосенсора (при даних концентраціях ензиму, субстрату та інгібітору) досягається при обмеженому балансі між параметрами k . В нашому випадку взаємодія інгібітора з ензимом сильніша, ніж взаємодія субстрату з ензимом приблизно в 100 раз ($k_i \sim 100 k_s$). Швидкість дисоціації комплексів (EI) і (ES) набагато менша, ніж швидкість їх формування ($k_{i'} = 10^{-4} k_i$, $k_{s'} = 0.01 k_s$).

Для отримання більш точної оцінки швидкостей реакцій, ми досліджували, як на роботу біосенсора впливають параметри констант швидкості: k_s , k_e , k_i .

Таким чином, константа швидкості формування ензим-субстратного комплексу (k_s) відповідає за форму кривої відгуку біосенсора на субстрат: при збільшенні цієї константи форма відгуку біосенсора на субстрат стає більш різкою, а при зменшенні – більш округлою (рис. 3.27).

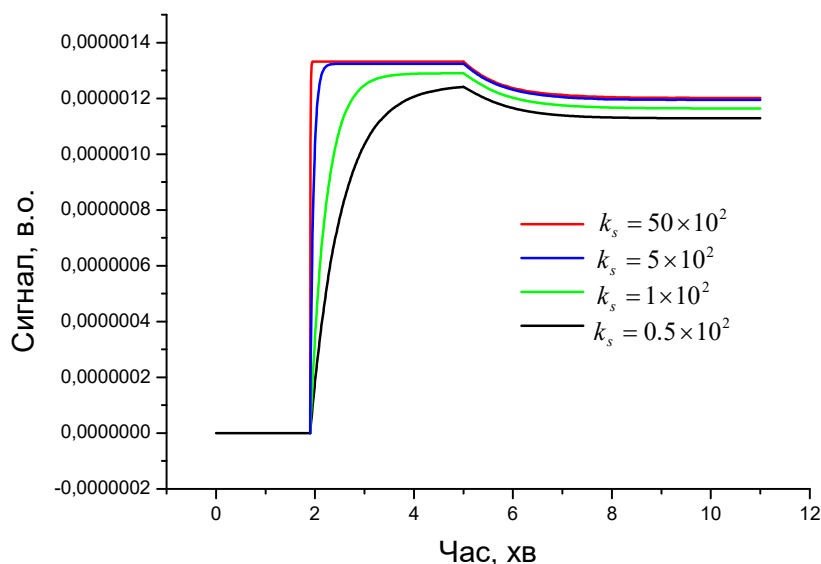


Рисунок 3.27 – Моделювання ензиматичних реакцій в мембрані біосенсора з використанням метода кінетичних рівнянь та експериментальних даних при різних значеннях константи k_s

Константа швидкості формування інгібіторних комплексів (EI та EIS), аналогічно до константи формування субстратного комплексу, відповідає за форму відгуку біосенсора на інгібітор. При збільшенні константи форма кривої стає більш різкою, при зменшенні – більш округлою (рис. 3.28).

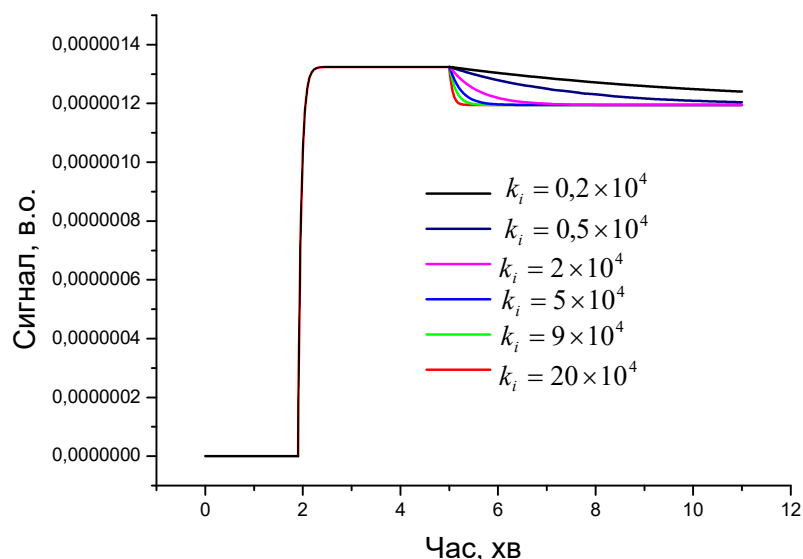


Рисунок 3.28 – Моделювання ензиматичних реакцій в мембрані біосенсора з використанням метода кінетичних рівнянь та експериментальних даних при різних значеннях константи k_i

Що стосується константи швидкості утворення продукту k_p , то її значення впливає на величину відгуків біосенсора (рис.3.29). І в той же час спостерігається незначне зменшення рівня інгібування.

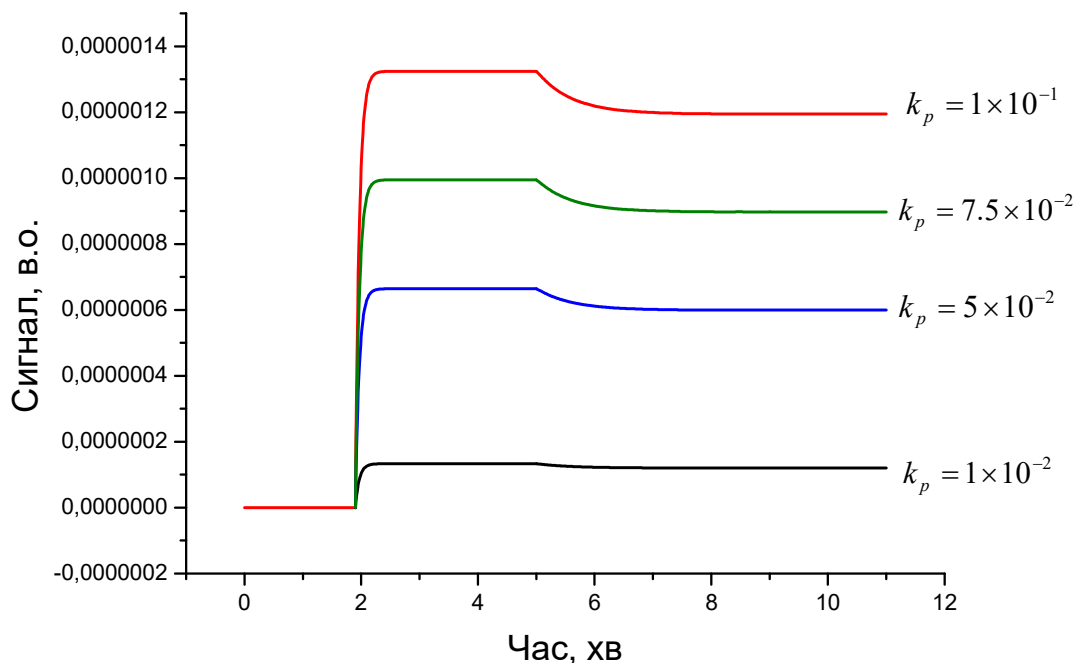


Рисунок 3.29 – Моделювання ензиматичних реакцій в мембрані біосенсора з використанням метода кінетичних рівнянь та експериментальних даних при різних значеннях константи k_p

При подальшому збільшенні k_p (більш ніж 1×10^{-1}) модельні відгуки біосенсора перестають співпадати за формою із експериментальними.

Коефіцієнт α відповідає за характер інгібіторної взаємодії. При $\alpha = 1$ схема інгібування відповідає безконкурентному типу інгібування, при, $\alpha = 0$ – відповідає конкурентному типу, при $\alpha > 1$ матимемо випадок активації ферменту.

Для того, щоб дослідити вплив коефіцієнту інгібування на поведінку системи, було побудовано графіки залежності величини рівня інгібування від концентрації субстрату при різних α -коефіцієнтах (рис. 3.30).

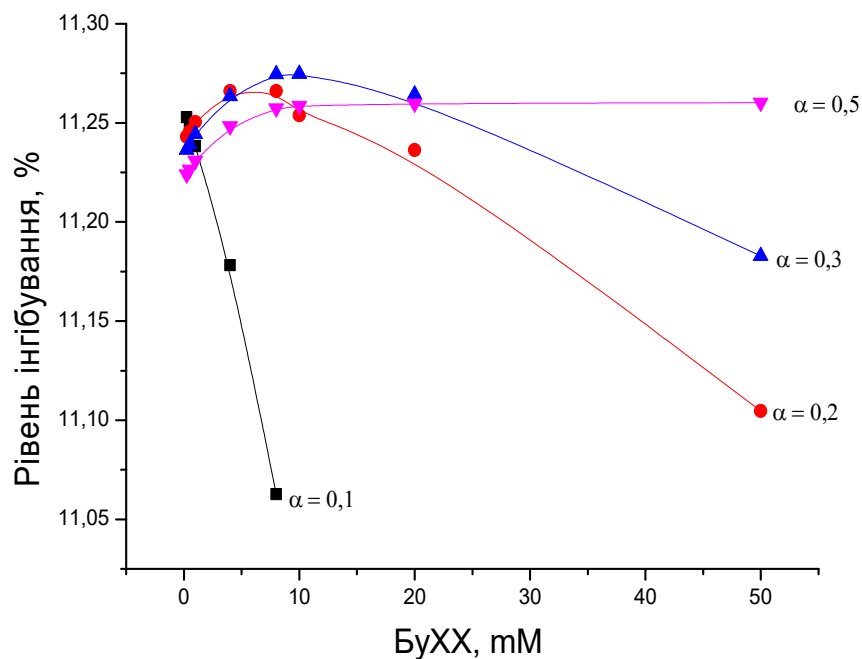


Рисунок 3.30 – Модель залежності рівня інгібування від різних концентрацій субстрату БуХХ за різних значень коефіцієнта інгібування α

Як можна бачити на рис.3.30, для $\alpha = 0,1$, при збільшенні концентрації субстрату рівень інгібування зменшується. Ця залежність притаманна конкурентному типу інгібування. Для $\alpha = 0,5$, при збільшенні концентрації субстрату рівень інгібування теж збільшується. Ця залежність характерна для неконкурентного типу інгібування. Для $\alpha = 0,2$ і $\alpha = 0,3$ спостерігається колоколоподібна залежність, що характерна для нашого випадку інгібування.

Після детального дослідження вхідних параметрів системи, було проведено підбір параметрів (таблиця 3.5) таким чином, щоб модельний відгук біосенсора співпадав із експериментальним (рис. 3.31).

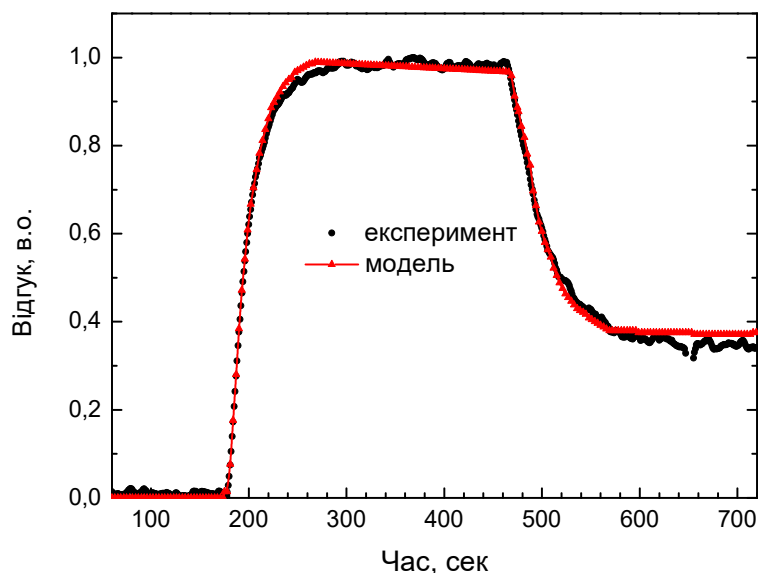


Рисунок 3.31 – Моделювання ензиматичних реакцій в мембрані біосенсора з використанням метода кінетичних рівнянь та експериментальних даних. Порівняння модельного відгуку (червоні точки) із відгуком, отриманим експериментально (чорні точки)

Таблиця 3.5 – Параметри математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну, які були використані для її чисельного моделювання

Позначення	Числові значення	Одиниці вимірювання
k_s	600	л/(моль*с)
k_i	$1,3 \times 10^4$	л/(моль*с)
k'_s	20,23	1/с
k'_i	0,0167	1/с
k_p	0,05	1/с
k_w	0,168	1/с
α	0,3	-

На наступному етапі необхідно було переконатись, що підібрані коефіцієнти підходять для моделювання роботи біосенсора при визначенні

α -чаконіну, тобто при різних концентраціях інгібітору. Для цього було проведено моделювання відгуків біосенсора на різні концентрації α -чаконіну із діапазону визначення, а саме 1×10^{-6} моль/л, 2×10^{-6} моль/л, 5×10^{-6} моль/л, 1×10^{-5} моль/л (рис. 3.32).

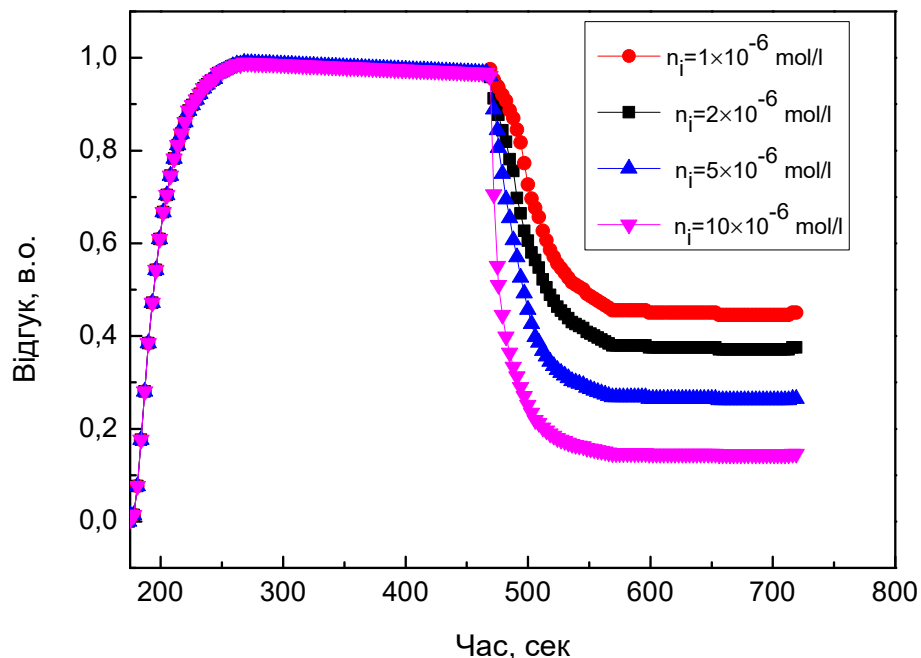


Рисунок 3.32 – Результати чисельного моделювання відгуку біосенсора для визначення α -чаконіну.

За результатами перевірки співпадіння результатів експериментального та змодельованого відгуків отримано залежність зміни абсолютної похибки на різних етапах проходження ензиматичної реакції: наявності ензиму ($t=0\ldots180$ с), додавання в комірку субстрату ($t=180\ldots460$ с) та додавання інгібітору ($t=460\ldots700$ с) (рис.3.33).

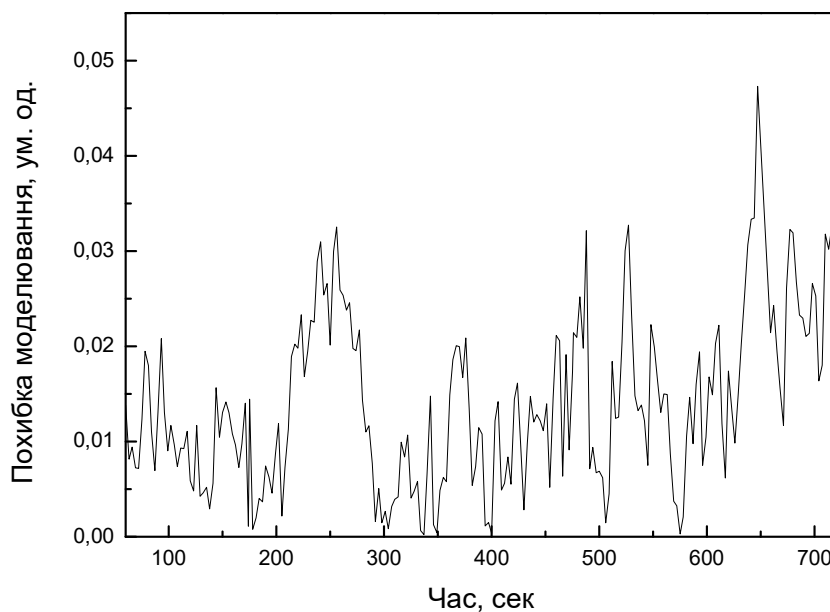


Рисунок 3.33 – Результат розрахунку абсолютної похибки моделювання роботи потенціометричного біосенсора на основі іммобілізованої бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну

Максимальна похибка моделювання за наявності субстрату та ензиму становить 0,03 ум. од., що відповідає 3%. При взаємодії з інгібітором максимальна похибка верифікації була отримана на ділянці стабілізації відгука біосенсора та не перевищує 0,045 ум. од., що відповідає 4,5%. Збільшення похибки теоретичної кривої у порівнянні з експериментальною кривою в останній області можна пояснити особливостями функціонування біосенсора при стабілізації його відгуку після впливу на ензим інгібітора.

Таким чином розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі іммобілізованої бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну. Запропонована модель описує біохімічні реакції, що відбуваються всередині біоселективної мембрани під час вимірювання α -чаконіну у формі системи диференціальних рівнянь, що чисельно розв'язується з використанням програмного забезпечення Wolfram Mathematica. При цьому відповідні константи підібрані таким чином, щоб змодельований відгук максимально співпадав з отриманим експериментально відгуком біосенсора. Ці

підібрані константи були використанні в подальшому для моделювання відгуків біосенсора на додавання субстратів та інгібіторів. Таке чисельне моделювання є особливо актуальним при створенні нових біосенсорів та при роботі із різними токсичними речовинами.

3.8 Висновки

Розроблено, досліджено та оптимізовано метод іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів. Детально досліджено вплив модифікацій поверхні та вплив додаткових зовнішніх факторів на характеристики як самих перетворювачів, так і біосенсорів в цілому. Запропоновано декілька варіантів модифікації для покращення процедури іммобілізації, в тому числі з використанням наночастинок.

Вперше проведено детальне дослідження біохімічних параметрів іммобілізованих холінестераз, а саме констант Міхаеліса-Ментена та констант інгібування. Отримані нами величини певною мірою свідчать про відсутність значних конформаційних змін у холінестераз після процедури їхньої іммобілізації. Суттєва різниця в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсинами дозволяє адаптувати характеристики сенсорів під конкретні прикладні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсичними речовинами.

Вперше розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, яка повністю описує біохімічні реакції, що відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів. Отримані результати чисельного моделювання є особливо актуальними при розробці нових біосенсорів та при роботі із різноманітними токсичними речовинами.

3.9 Література

1. Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. Київ: Наукова думка; 2006. 261 с.
2. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Electrochemical enzyme biosensors. Kiev: Akademperiodika; 2006. 72 p.
3. Архипова ВН, Дзядевич СВ, Щувайло ОН, Солдаткин АП, Ельская АВ, Жафрезик-Рено Н, Жафрезик Г, Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа. Биополимеры и клетка. 2001;17(1):70–77.
4. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Jaffrezic H, Martelet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. Talanta. 2001;55:919–927.
5. Weckhuysen BM, Yu J. Recent advances in zeolite chemistry and catalysis. Chem Soc Rev. 2015;44:7022–7024.
6. Kerman K, Saito M, Tamiya E, Yamamura S, Takamura Y. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. Trends Anal Chem. 2008;27: 585–592.
7. Hondred JA, Breger JC, Garland NT, Oh E, Susumu K, Walper SA, Medintz IL, Claussen JC. Enhanced enzymatic activity from phosphotriesterase trimer gold nanoparticle bioconjugates for pesticide detection. Analyst. 2017;142:3261–3271.
8. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. Sensors Actuators B. 2004;103:416–422.
9. Костерін СО, Прилуцький ЮІ, Бориско ПО, Мірошніченко МС. Кінетичний аналіз дії оборотних ефекторів (інгібіторів та активаторів) на

ферментативну (транспортну) активність білків. Укр біохім журн. 2005;77(1):113–125

10. Main A, Tarkan E, Aull J, Soucie W. Purification of horse serum cholinesterase by preparative Polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. 1972;247:566–571.
11. Kovacs K, Szajani B, Boross L. Preparation and properties of a novel immobilized cholinesterase. J Appl Biochem. 1982;4:11–18.
12. Reiner E, Simeon-Rudolf V, Skrinjaric-Spoljar M. Catalytic properties and distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in human sera. Toxicol Lett. 1995;82/83:447–452.
13. Cornish-Bowden A. Enzyme kinetics from a metabolic perspective. Biochem Soc Trans. 1999;27:281–284.
14. Swinyard CA, Chaube S. Are potatoes teratogenic for experimental animals? Teratology. 1973;8:349–357.
15. Roddick JG, Rijnenberg AL. Synergistic interaction between the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to lysis of phospholipid/sterol liposomes. Phytochemistry. 1987;26:1325–1328.
16. Roddick JG, Rijnenberg AL, Weissenberg M. Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasonine and solamargine. Phytochemistry. 1990;29:1513–1518.
17. Roddick JG, Weissenberg M, Leonard AL. Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. Phytochemistry. 200;56:603–610.
18. Roddick JG. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. Phytochemistry. 1989;28:2631–2634.
19. Pösch G, Reiffenstein RJ, Unkelbach H-D. Application of the isobologram technique for the analysis of combined effects with respect to additivity as well as independence. Can J Physiol Pharmacol. 1990;68:682–688.

20. Roddick JG, Rijnenberg AL, Osman SF. Synergistic interaction between potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to destabilization of cell membranes: ecological implications. *J Chem Ecology*. 1988;14:889–902.
21. Smith DB. PhD thesis. Exeter, UK; University of Exeter; 1997.
22. Gee JM, Wortley GM, Johnson IT, Price KR, Rutten AAJJL, Houben GF, Penninks AH. Effect of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations in vitro. *Toxicology In Vitro*. 1996;10:117–128.
23. Blankemeyer JT, Atherton R, Friedman M. Effect of Potato Glycoalkaloids Alpha-Chaconine and Alpha-Solanine on sodium active transport in frog skin. *J Agric Food Chem*. 1995;43:636–639.
24. Fewell AM, Roddick JG. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and chaconine. *Phytochemistry*. 1993;3:323–328.
25. Rayburn JR, Friedman M, Bantle JA. Synergistic interaction of glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine on developmental toxicity in *Xenopus* embryos. *Food Chemistry Toxicology*. 1995;33:1013–1019.
26. Smith DB, Roddick JG, Jones JL. Synergism between the Potato Glycoalkaloids α -Chaconine and α -Solanine in Inhibition of Snail Feeding. *Phytochemistry*. 2001;57:229–234.
27. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosens Bioelectron*. 2003;18:1047–1053.
28. Mell LD, Maloy JT. A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Anal Chem*. 1975;47(2):299–307.
29. Gajovic N, Warsinke A, Huang T, Schulmeister T, Scheller FW. Characterization and Mathematical Modeling of a Bienzyme Electrode for l - Malate with Cofactor Recycling. *Anal Chem*. 1999;71(20):4657–4662.

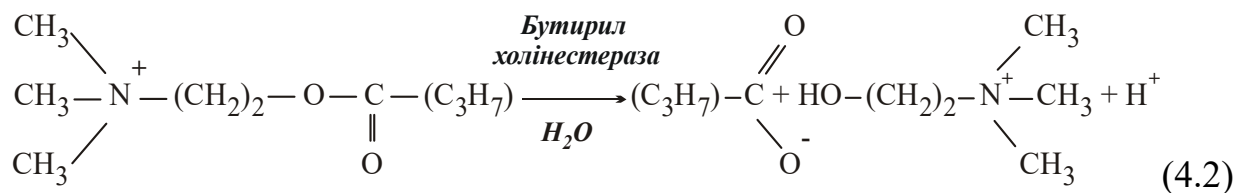
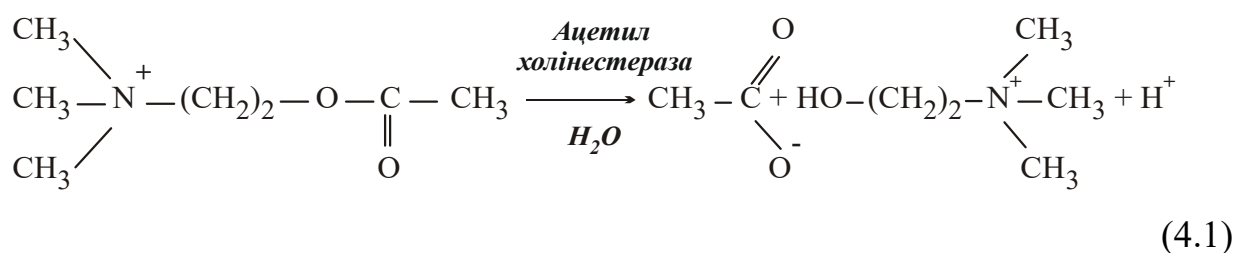
30. Romero MR, Baruzzi AM, Garay F. Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor. *Sensors Actuators B*. 2012;162(1):284–291.
31. Loghambal S, Rajendran L. Mathematical modeling of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes. *Electrochim Acta*. 2010;55(18):5230–5238.
32. Loghambal S, Rajendran L. Mathematical modeling in amperometric oxidase enzyme-membrane electrodes. *J Memb Sci*. 2011;373(1–2):20–28.
33. Meena A, Rajendran L. Mathematical modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations – Homotopy perturbation approach. *J Electroanal Chem*. 2010;644(1):50–59.
34. Ašeris V, Gaidamauskaitė E, Kulys J, Baronas R. Modelling glucose dehydrogenase-based amperometric biosensor utilizing synergistic substrates conversion. *Electrochim Acta*. 2014;146:752–758.
35. Ašeris V, Baronas R, Kulys J. Modelling the biosensor utilising parallel substrates conversion. *J Electroanal Chem*. 2012;685:63–71.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ ХОЛІНЕСТЕРАЗ В СКЛАДІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ ТА СТВОРЕННЯ ЇХНІХ ЛАБОРАТОРНИХ ПРОТОТИПІВ

4.1. Вступ

Робота біосенсорів на основі холінестераз базується на наступних ферментативних реакціях:



В результаті цих ферментативних реакцій генеруються протони, що призводить до зміни рН чи провідності розчину всередині мембрани, тому ми можемо використовувати для створення біосенсорів потенціометричні датчики на основі рН-чутливих польових транзисторів чи кондуктометричні перетворювачі для визначення зміни провідності.

Обидва ферменти відповідають за гідроліз як ацетилхоліна, так і бутирилхоліна, але з різним ступенем спорідненості до цих субстратів і демонструють різну афінність до ряду інгібіторів [1].

Деякі класи хімічних токсинів, такі як органофосфорні та карбаматні пестициди, глікоалкалоїди, та інші проявляють себе як інгібітори холінестераз. Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних

сполук, інгібіторів холінестераз, у довкіллі. Для біосенсорів такого типу, активність іммобілізованого ензиму вимірюється до і після інгібування, що дозволяє оцінити рівень інгібування, який, в свою чергу, пропорційний концентрації токсичної речовини. Тому необхідно було дослідити можливості застосування холінестераз в складі електрохімічних біосенсорів на основі ефекту інгібування ензимів. Від типу інгібування залежить і тип токсинів, на які розробляються біосенсиори.

4.2 Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення пестицидів та гербіцидів

Тонни пестицидів, які щорічно використовуються в сільському господарстві та садівництві, можуть деградувати в навколишньому середовищі різними шляхами: мікробна та фотодеградація, хімічний гідроліз тощо. Під час цих процесів трансформації утворюються проміжні продукти, які можуть бути іноді більш токсичними, ніж вихідні продукти. Ці токсичні сполуки разом зі своїми попередниками забруднюють повітря, ґрунт та воду на значних площах. Отже, необхідно розробити тести для оцінки токсичності зразків навколишнього середовища.

На даний час використовується величезна кількість аналітичних методів для виявлення токсичних речовин. Ці методи засновані на спектрофотометрії, хроматографії, мас-спектрометрії та різних інших техніках, вони вимагають складного та дорогого обладнання, висококваліфікованого персоналу та зазвичай є трудомісткими [2, 3]. Протягом останніх 20-30 років було запропоновано та розроблено ряд біосенсорів для визначення різних пестицидів у водних розчинах, зокрема біосенсиори на основі іон-селективних та рН-чутливих скляних та металевих електродів [4, 5], кондуктометричні планарні електроди [6] та рН-чутливі польові транзистори [7].

Визначення фосфорорганічних та карбаматних сполук базується на їх здатності інгібувати холінестерази шляхом взаємодії з групою серин-ОН в активному центрі ензиму. Зниження активності холінестерази після її взаємодії з

пестицидами можна ефективно контролювати за допомогою кондуктометричних та потенціометричних біосенсорів, полегшуючи оцінку токсичності фосфорорганічних та карбаматних пестицидів.

У випадку біосенсорів на основі необоротного інгібування, після відгуку сенсора на субстрат (A_0) біосенсиори інкубують в розчині інгібітора протягом певного часу, а потім відмивають від надлишку інгібітора та знову отримують відгук на субстрат (A_i) (рис.4.1).

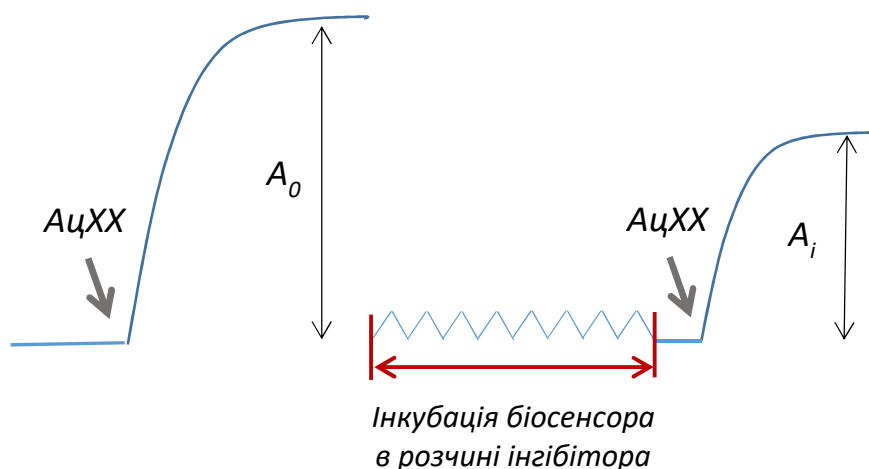


Рисунок 4.1 – Схема інгібіторного аналізу при необоротному інгібуванні

Рівень інгібування розраховується наступним чином:

$$I = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad (4.3)$$

Оскільки необоротні інгібітори, міцно зв'язуються з біоселективним елементом, перш ніж біосенсор може бути повторно використаний, він повинен бути інкубований в розчині з реактиватором. Реактиватори ензимів представляють собою з'єднання, які відновлюють ензиматичну активність шляхом видалення інгібуючої групи.

Оптимальна концентрація субстрату для біосенсора на основі АцХЕ для проведення інгібіторного аналізу були визначені шляхом отримання

калібрувальних кривих до та після інкубації з розчином пестицида. Дані на рис. 4.2 представляють вплив концентрації субстрату на співвідношення між відгуками датчиків до та після інкубації з метил-параоксоном (співвідношення є показником залишкової активності іммобілізованої АцХЕ). З цього рисунку видно, що найкраща чутливість ацетилхолінестерази до цього токсиканту досягається при концентраціях АцХХ вище 2,0 мМ.

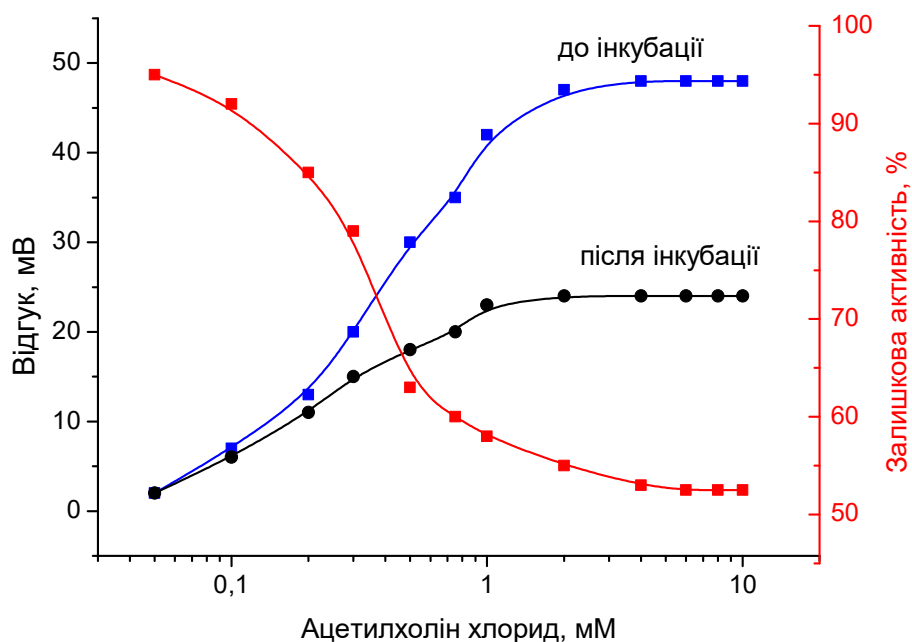


Рисунок 4.2 – Залежність відгуків біосенсора на основі АцХЕ та ІСПТ до (1) та після (2) інкубації з $3,0 \times 10^{-5}$ М метил-параоксоном від концентрації АцХХ. Залежність залишкової активності іммобілізованої АцХЕ (відношення відгуків) від концентрації ацетилхолін хлориду (3). Вимірювання проводили у трьох повторях у 5,0 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, час інгібування 10 хв

Для вибору інших умов для кращого інгібування ферментів було отримано залежність інгібування біосенсора від часу інкубації у присутності різних пестицидів. Рівень інгібування нелінійно залежить від часу інкубації (рис. 4.3); час інкубації 20 хв було обрано як компроміс між ефективністю інгібування та загальним часом аналізу. Це значення часу інкубації (інгібування) використовувалось у всіх подальших експериментах.

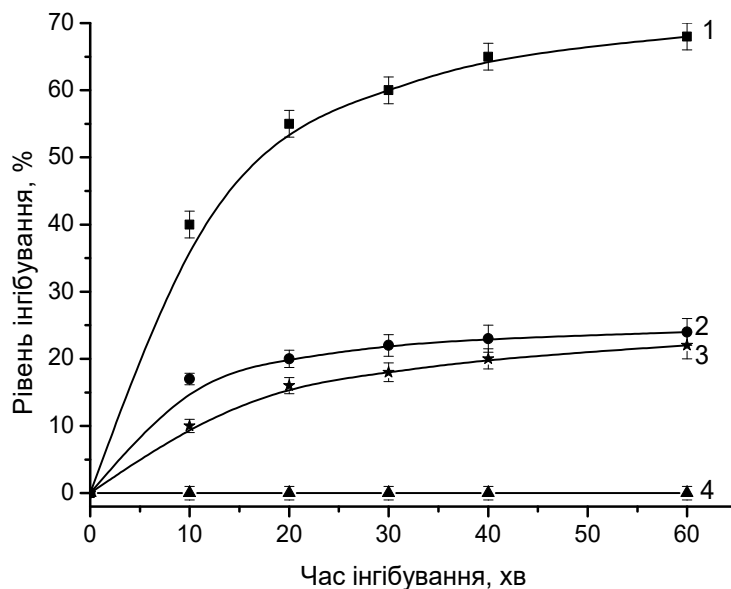


Рисунок 4.3 – Залежність рівня інгібування біосенсора на основі АцХЕ від часу інкубації в розчинах 1.0×10^{-8} М диізопропілфторфосфату (1), $1,0 \times 10^{-5}$ М параоксон-метилу (2), $1,0 \times 10^{-4}$ М паратіон-метилу (3) та $1,0 \times 10^{-4}$ М 4-нітрофенолу (4). Вимірювання проводили у трьох повторях у 5,0 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату - 2,0 мМ

Добре відомо, що концентрація буферу може впливати на відгук біосенсора. Рис. 4.4 демонструє калібрувальні криві визначення субстрату АцХХ біосенсором на основі ІСПТ, отримані у фосфатному буфері різної концентрації, а відповідно з різними буферними ємностями. З рисунку видно, що діапазони роботи сенсору були різними і залежали від концентрації буфера. При збільшенні концентрації буферного розчину від 1 мМ до 20 мМ, вихідний сигнал зменшувався у 8-10 разів. У той же час, рівень інгібування не залежав від концентрації буферу. Подібні результати були також отримані і для залежності відгуку сенсора від концентрації NaCl у робочому розчині [8]. Тому необхідно відмітити, що варіація буферної ємності чи іонної сили не є важливим параметром при визначенні інгібіторів.

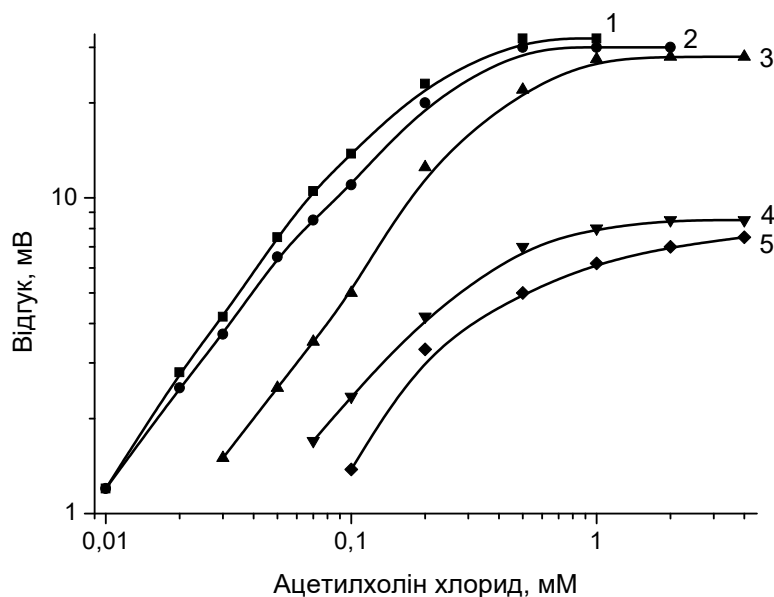


Рисунок 4.4 – Калібрувальні криві потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ для різних концентрацій фосфатного буфера, рН 7,5 (1 – 1 мМ, 2 – 2 мМ, 3 – 5 мМ, 4 – 10 мМ, 5 – 20 мМ)

Інгібування іммобілізованих холінестераз фосforoорганічними пестицидами є досить сильним та необоротним, тому за звичайних умов відмивання робочим буферним розчином ензим не відновлює свою активність, що зумовлює одноразове використання біосенсора. Наприклад, ДФФ в ході реакції приєднується до гідроксильної групи залишку серина в активному центрі. Ковалентний зв'язок, що утворюється, не порушується в водних розчинах однак, може бути порушений більш нуклеофільними реагентами, такими, наприклад, як оксими [9]. В даній роботі в експериментах використовувався піридин-2-альдоксим метйодид (ПАМ-2), який під час реакції порушує каталітично неактивний комплекс діізопропилфторфосфатного ефіру та відновлює активний центр фермента (рис. 4.5).

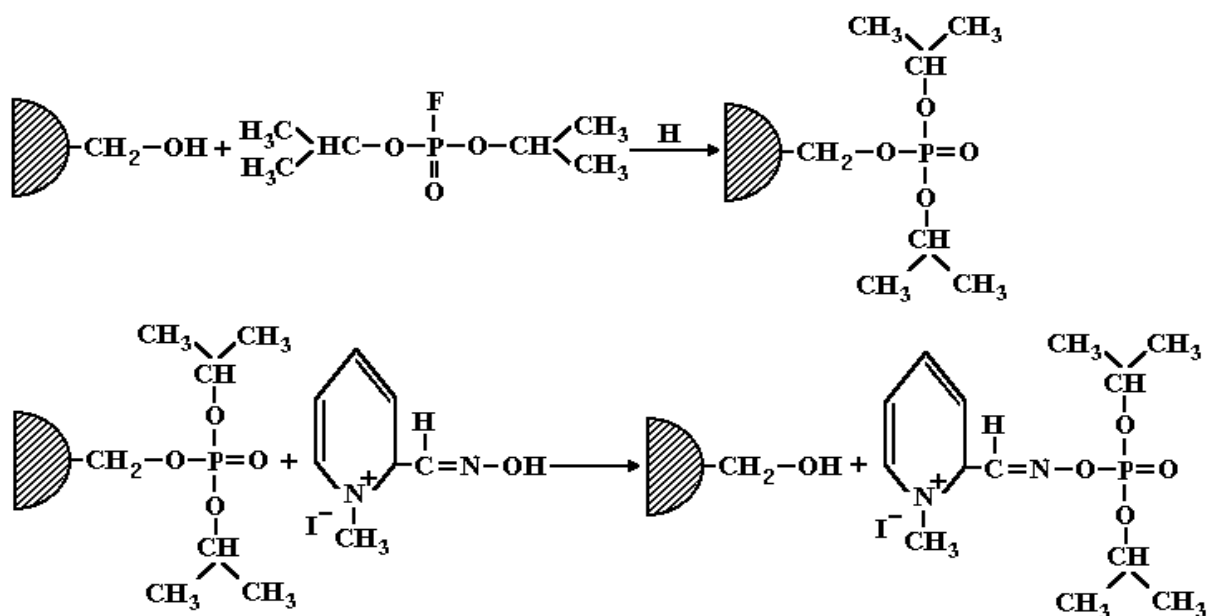


Рисунок 4.5 – Схема інгібування АцХЕ діізопропилфторфосфатом з наступною реактивацією ПАМ-2

На Рис. 4.6 представлено відгуки сенсора за відсутності та в присутності пестицида, а також до та після додавання 10^{-4} М реактиватора ПАМ-2 (відгук, отриманий за відсутності інгібітора, приймається за 100 %). Можна бачити, що у випадку високого ступеня інгібування АцХЕ величина відгуку відновлюється реактиватором не повністю. Це може бути пов'язано з дифузійними проблемами (коли оксими всередині мембрани модифікуються під дією фосфорорганічних компонент і виникають труднощі з їхнім виходом з мембрани) чи з присутністю на холінестеразах двох різних за спорідненістю сайтів зв'язування пестицидів.

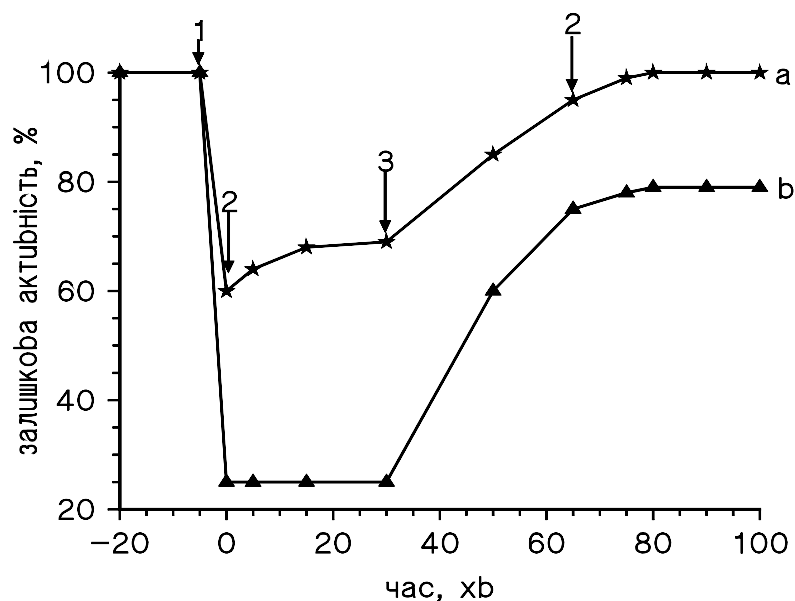


Рисунок 4.6 – Інгібування АцХЕ, іммобілізованої в мембрані, 10^{-8} М ДФФ з часом інкубації 10 хв (а) та 80 хв (б) та її реактивація. 1 - інгібування, 2 - відмивка в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, 3 - відмивка реактиватором ПАМ-2

Питання реактивації іммобілізованої холінестерази, що інактивується необоротними інгібіторами, є дуже важливим, тому що це дозволяє багаторазово використовувати біосенсор для визначення фосфорорганічних пестицидів.

Рис. 4.7 показує ефект багаторазового інгібування ензиму 10 мкМ параоксон-метилом та впливу ПАМ-2 на активність іммобілізованої АцХЕ. Повторне застосування біосенсора для визначення тієї ж концентрації пестициду після реактивації дає подібний рівень інгібування. Біосенсор показує майже відтворювані значення рівня інгібування принаймні 20 послідовних циклів інгібування-реактивації, хоча початковий відгук біосенсора зменшується протягом такої серії на 20-40%.

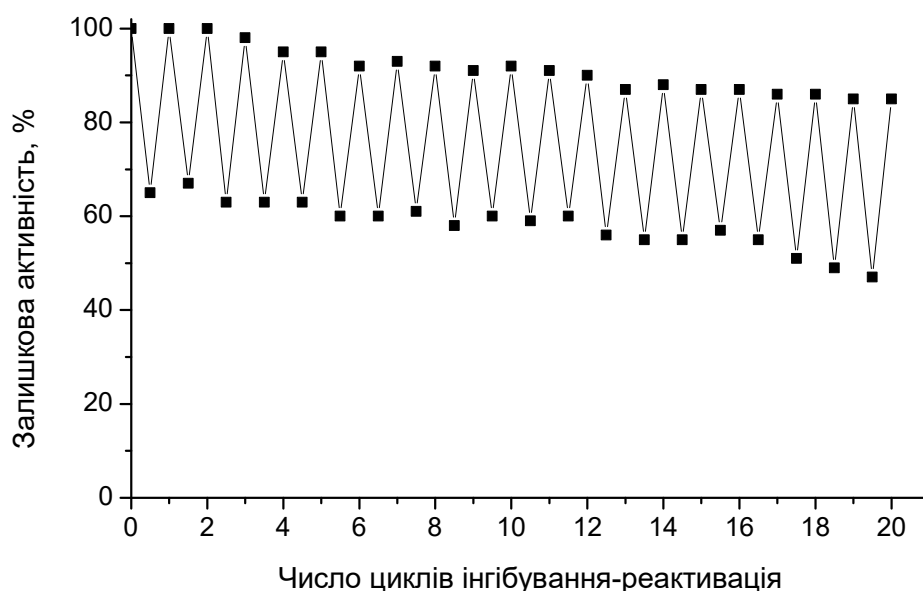


Рисунок 4.7 – Інгібування та реактивація ензиму АцХЕ 10 мкМ параоксон-метилом (20 хв) та 15 мМ ПАМ-2 (60 хв)

Калібрувальні криві кондуктометричного біосенсора на основі АцХЕ для визначення різних пестицидів наведено на рис. 4.8.

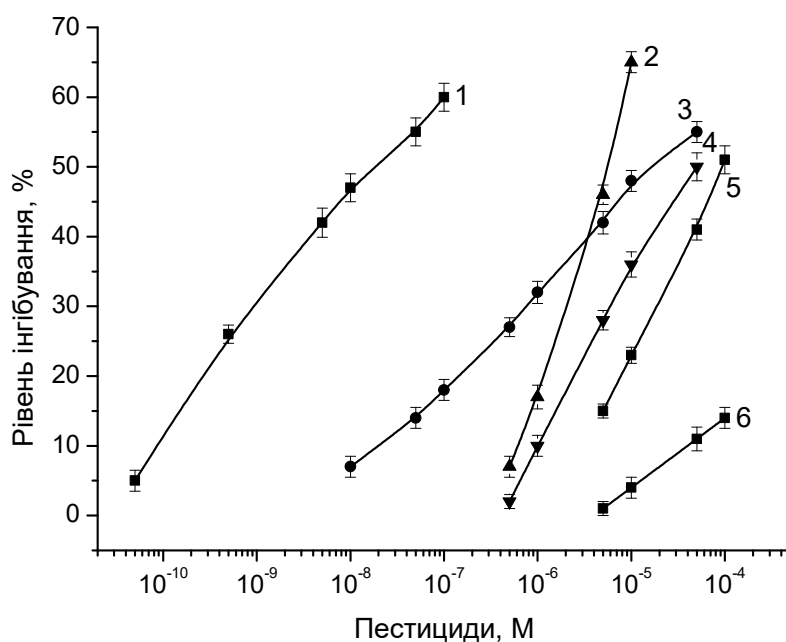


Рисунок 4.8 – Калібрувальні криві кондуктометричного біосенсора на основі АцХЕ для визначення діізопропілфторфосфату (1), трихлорфону (2), параоксон-етилену (3), параоксону-метилу (4), карбофурану (5) та паратіон-метилу (6).

Вимірювання проводили у трьох повторах у 5,0 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату - 2,0 мМ, час інгібування - 20 хв

Було отримано криві, лінійні за напівлогарифмічним масштабом для всіх випробуваних пестицидів. Межі виявлення визначалися як мінімальна концентрація інгібітора, що призводить до відгуку, що в три рази перевищує величину шумів, і становили: $5,0 \times 10^{-11}$ М для діізопропілфторфосфату, $1,0 \times 10^{-8}$ М для параоксон-ети́лу, $5,0 \times 10^{-7}$ М для параоксон-мети́лу, $3,0 \times 10^{-7}$ М для трихлорфону, $5,0 \times 10^{-6}$ М для паратіон-мети́лу та $2,0 \times 10^{-6}$ М для карбофурану. Таким чином, максимальну токсичність спостерігали для діізопропілфторфосфату, тоді як мінімальну для паратіон-мети́лу для обох ензимів (таблиця 4.1). Аналітичні характеристики біосенсорів на основі двох різних перетворювачів виявилися досить близькими одна до одної як щодо меж виявлення, так і динамічного діапазону для різних пестицидів. Ось чому представлено калібрувальні криві лише для одного типу біосенсора.

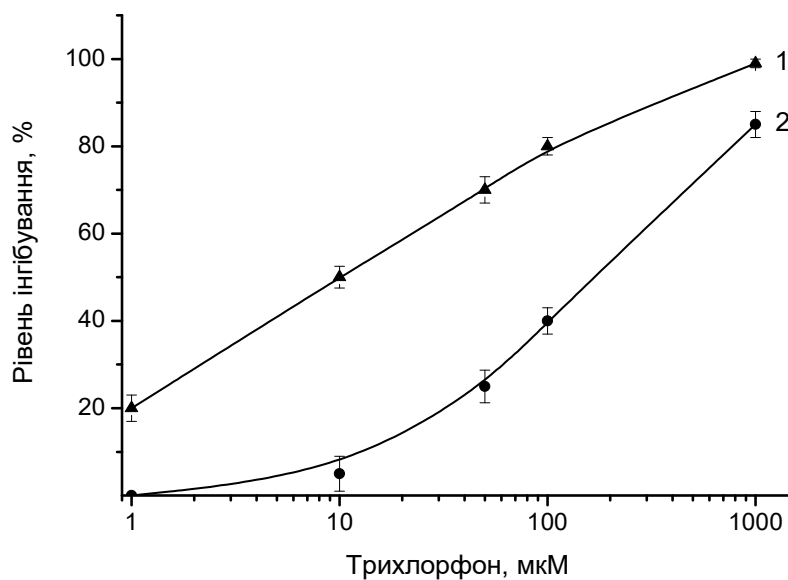
Таблиця 4.1 – Динамічний діапазон роботи розроблених біосенсорів для визначення пестицидів. Нижня концентрація динамічного діапазону є межею виявлення

	Динамічний діапазон, М			
	Кондуктометричний біосенсор		Потенціометричний біосенсор	
	АцХЕ	БуХЕ	АцХЕ	БуХЕ
	1	2	3	4
Діізопропілфтор-фосфат	$5,0 \times 10^{-11}$ – $1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-11}$ – $5,0 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-11}$ – $5,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-11}$ – $1,0 \times 10^{-7}$
Параоксон-етил	$1,0 \times 10^{-8}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-5}$
Параоксон-метил	$5,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$

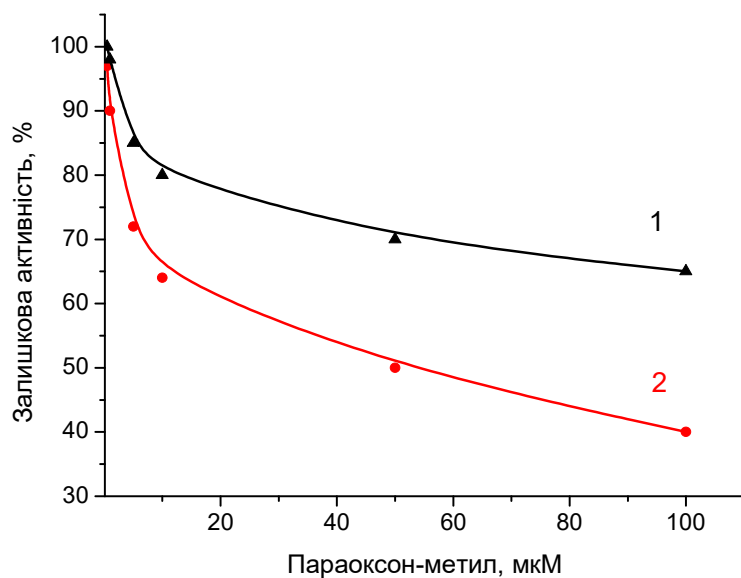
	1	2	3	4
Трихлорфон	$3,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5}$
Паратіон-метил	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$		
Карбофуран	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$		

Отже, розроблений біосенсор може бути використаний як система швидкого виявлення („система раннього попередження”) для інгібіторів холінестерази, присутніх у навколишньому середовищі. Однак очевидно, що біосенсор є селективним не для окремих пестицидів, а для класів пестицидів. Тому аналіз, заснований на таких біосенсорах, може бути застосованим для селективного визначення окремих пестицидів в певних географічних районах, де пестицид для виявлення заздалегідь відомий як єдиний. У будь-якому іншому випадку цей біосенсор може бути використаний лише для оцінки загального рівня токсичності зразка, його найбільш токсичний компонент є основним фактором, що сприяє отриманню результату.

Дані, представлені в [10], демонструють, що зразки, що містять суміш інгібіторів, не можуть бути адекватно проаналізовані лише за допомогою біосенсорів на основі інгібування АцХЕ. Діапазон виявлених забруднюючих речовин можна розширити шляхом розробки мультиферментних масивів біосенсорів [11], заснованих на підході, що різні пестициди різним чином інгібують різні ензими. Це показано на рис. 4.9, де представлені типові стандартні криві для інгібування двох ензимів трихлорфоном та параоксон-метилом.



(А)



(Б)

Рисунок 4.9 – Калібрувальні криві для інгібування різних ферментів (БуХЕ (1) та АцХЕ (2)) трихлорфоном (А) та параоксон-метилом (Б). Вимірювання проводили в трьох повторях у 5,0 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, час інгібування 20 хв при використанні 2,0 мМ еквімолярної суміші субстратів

Експериментальні дані, отримані для біосенсорів, що включають різні ензими, можуть бути оброблені з використанням диференційного

функціонального аналізу чи методу нейронних сіток, в результаті чого можна розрізнити різні пестициди [12]. У цьому контексті такі масиви біосенсорів будуть конкурентоспроможними з іншими аналітичними методами.

4.3 Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення глікоалкалоїдів

Картопля, що входить до сімейства пасльонових, служить основним, недорогим джерелом їжі, тому що є як джерелом енергії (крохмаль), так і доброякісного білка. Її щорічне виробництво у всьому світі становить близько 350 мільйонів тонн [13]. Споживання картоплі на душу населення в США неухильно зростає і становить близько 61 кг/рік [14]. Картопля виробляє потенційно токсичні глікоалкалоїди як під час росту, так і після збору врожаю. У промисловій культивованій картоплі основними природними токсичними сполуками є α -соланін та α -чаконін, глікозиди стероїдного алкалоїду соланідину. Хоча існують певні суперечки щодо їх фактичної функції в рослині, було показано, що ці та подібні сполуки мають токсичну дію на організм людини [15; 16]. Глікоалкалоїди виявляються більш токсичними для людей, ніж для тварин. Токсичність може бути зумовлена їх антихолінестеразною активністю щодо центральної нервової системи та порушенням клітинних мембран, що впливає на травну систему та інші органи. Таким чином, слід подбати про виробництво нових сортів картоплі, в яких рівень глікоалкалоїдів не перевищував би безпечних значень.

Томати – це також важливе джерело харчування людей; вони також можуть акумулювати глікоалкалоїди. Світове виробництво томатів сягає 24 млн. тон. В молодих зелених томатах вміст глікоалкалоїду томатину підчас сягає 500 мг на 1 кг свіжої ваги. При визріванні рівень томатину зменшується і для зрілих червоних томатів може бути близько 5 мг на 1 кг свіжої ваги овочів.

Споживання картоплі та томатів з високим вмістом глікоалкалоїдів і продуктів, виготовлених з них, може бути потенційно небезпечним, оскільки високі концентрації алкалоїдів призводять до отруєння, іноді навіть з летальним кінцем як для людей, так і тварин. Отруєння глікоалкалоїдами, що пов'язане з

центральною нервовою системою, проявляється такими симптомами, як прискорений та слабкий пульс, прискорене та поверхневе дихання, марення та іноді навіть кома. Це зумовлене здатністю глікоалкалоїдів інгібувати холінестеразу. Вперше антихолінестеразна активність глікоалкалоїдів була продемонстрована 1956 р., з тих пір цей ефект було підтверджено багатьма дослідниками як *in vitro*, так і *in vivo* [17, 18, 19].

Основними глікоалкалоїдами картоплі є α -соланін та α -чаконін, обидва триглікозиди соланідину, стероїдного алкалоїду, що отримується з холестерину. Їхні молекулярні структури показані на рис. 4.10. Соланідин - це стероїдний кістяк без прикріплених цукрових фрагментів.

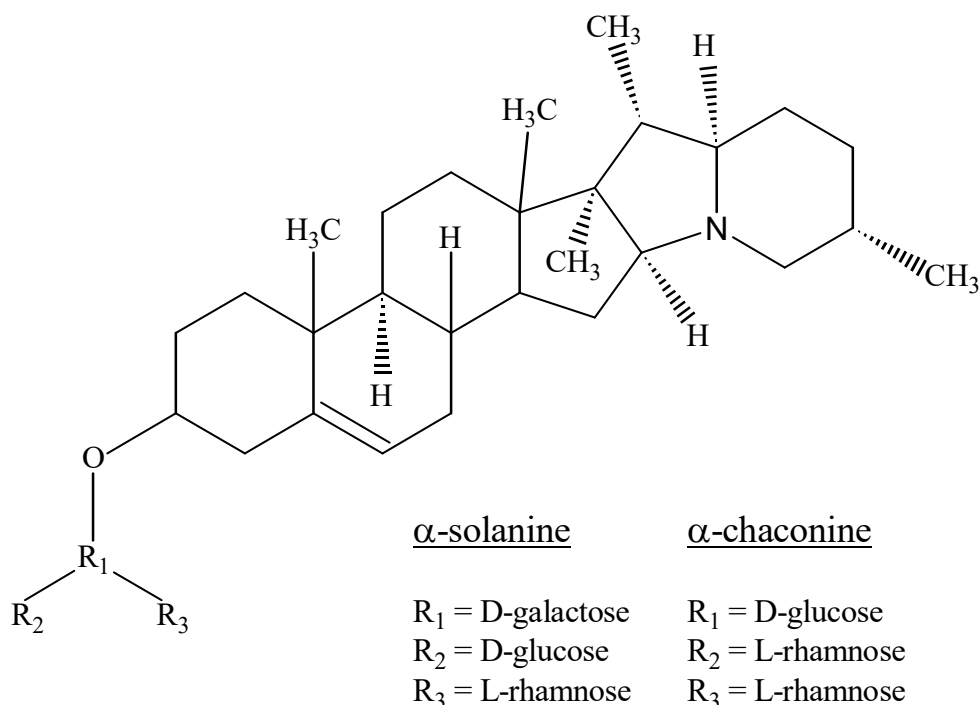


Рисунок 4.10 – Молекулярні структури α -соланіну та α -чаконіну

Основним глікоалкалоїдом томатів є томатин, його молекулярна структура показана на рис. 4.11. Томатидин - це стероїдний кістяк без прикріплених цукрових фрагментів.

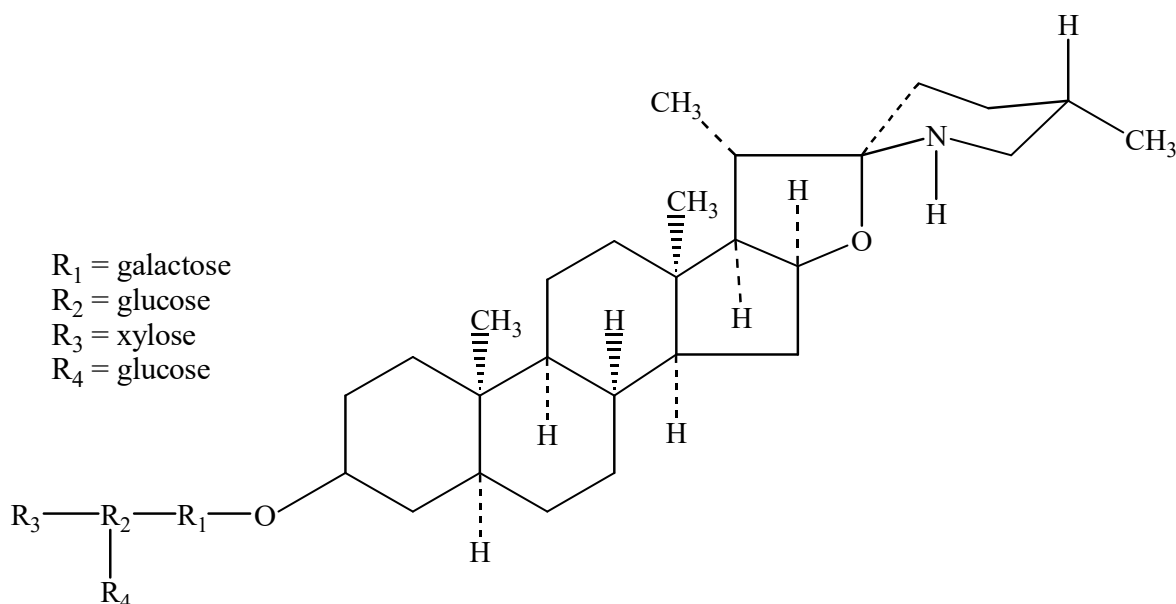


Рисунок 4.11 – Молекулярна структура томатину

Сучасні методи аналізу глікоалкалоїдів було детально розглянуто в роботах [20; 21]. Вони включають: (1) колориметрію [22]; (2) тонкошарову хроматографію [23]; (3) газову хроматографію [24]; (4) високоефективну рідинну хроматографію [25, 26, 27]; та (5) імуноаналізи (ІФА) [28]. Ці методи є складними і вимагають вилучення, розділення та очищення компонентів зразків перед вимірами. Крім того, усі ці методи використовують дороге і громіздке обладнання з високим енергоспоживанням, яке потребує для обслуговування добре навчених операторів.

В дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показано, що глікоалкалоїди пригнічують активність як БуХЕ, так і АцХЕ, як [17, 18, 19, 29]. Рівень інгібування внаслідок дії глікоалкалоїдів можна оцінити шляхом порівняння відгуків біосенсорів до та після їхнього контакту з розчином глікоалкалоїдів [30].

У разі оборотного інгібування, інгібітор додається безпосередньо у вимірювальну комірку після отримання відгуку на субстрат (рис.4.12). Для повторного проведення процедури вимірювання необхідне лише відмивання біосенсора робочим буферним розчином, після чого біосенсор знову готовий до наступного вимірювання.

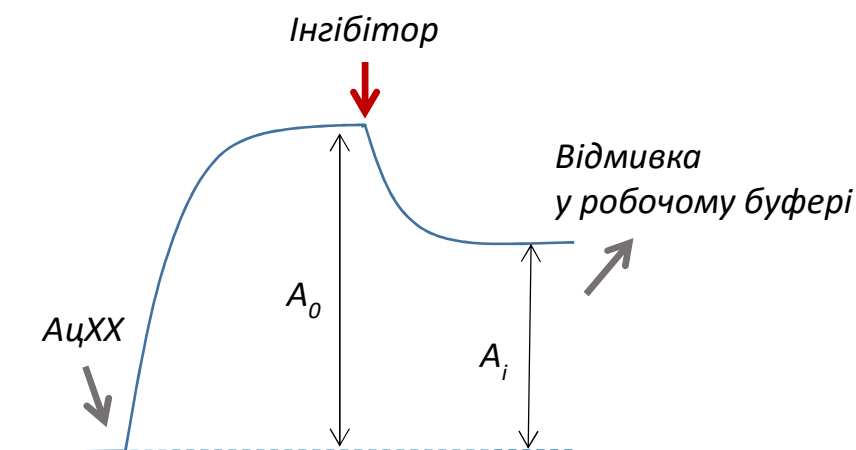


Рисунок 4.12 – Схема інгібиторного аналізу при оборотному інгібуванні

Залишкова активність іммобілізованого ензиму розраховується наступним чином:

$$I = \frac{A_i}{A_0} \times 100\% \quad (4.4)$$

Рівень інгібування розраховується згідно формули 4.4.

Основні аналітичні характеристики розроблених біосенсорів вивчали в різних експериментальних умовах відповідно до рекомендованих визначень та класифікації електрохімічних біосенсорів [31].

Залежність залишкової активності іммобілізованої БуХЕ та АцХЕ від концентрації α -чаконіну показана на рис. 4.13. Як видно з рисунку, біосенсор на основі БуХЕ є більш чутливим до α -чаконіну, ніж біосенсор на основі АцХЕ. Для інших типів алкалоїдів, таких як α -соланін та соланідин, були отримані подібні результати.

Для того, щоб вибрати оптимальні умови для визначення глікоалкалоїдів, отримували відгуки біосенсора на основі БуХЕ на додавання БуХХ без та з різними глікоалкалоїдами у розчині. На рис. 4.14 представлено калібрувальну криву для визначення БуХХ разом із залежностями рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ для різних інгібіторів.

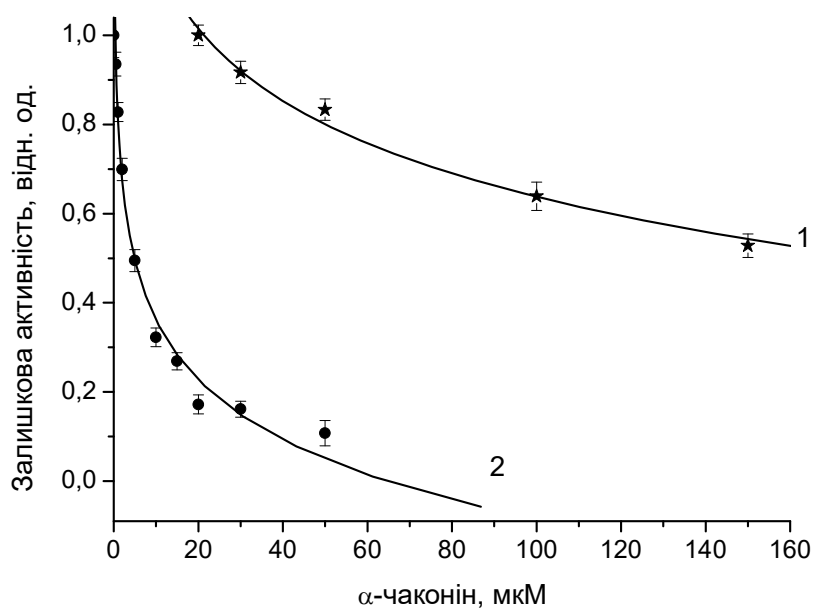


Рисунок 4.13 – Залежність залишкової активності іммобілізованих АцХЕ (1) та БуХЕ (2) від концентрації α -чаконіну. Відгук біосенсора на додавання 1 мМ субстрату вимірювали у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

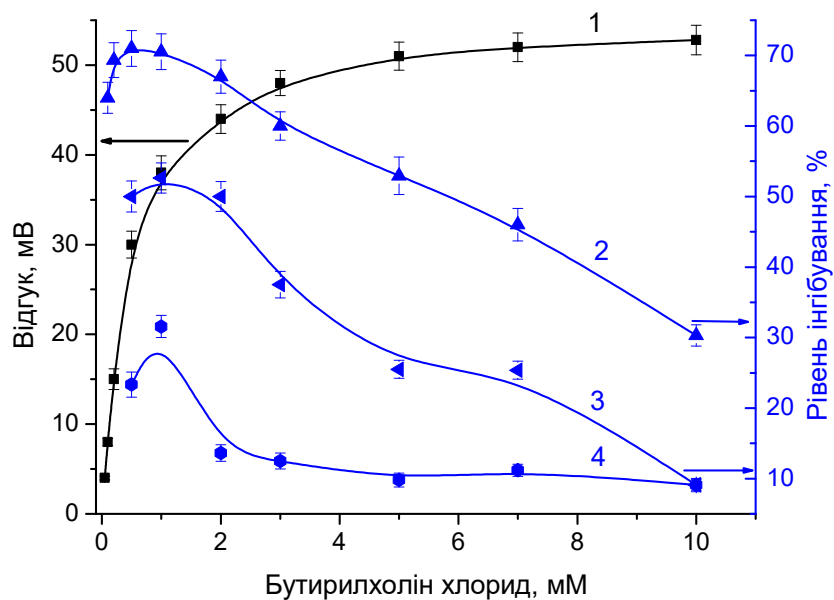


Рисунок 4.14 – Калібрувальна крива потенціометричного біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ для визначення БуХХ (1) та залежність рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ від концентрації субстрату для 20 мкМ α -чаконіну (2), α -соланіну (3) та соланідину (4) у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

Рівень інгібування розраховували як відносне зниження відгуку біосенсора після його контакту з інгібітором. З цього показника видно, що найкраща чутливість досягалась для концентрації БуХХ близько 1 мМ. Для нижчих концентрацій субстрату фермент у мембрані знаходиться в надлишку і бере участь у перетворенні субстрату відповідно до ферментативної реакції продукту лише частково (тобто решта ферменту не бере участі у ферментативній реакції). У цьому випадку молекули ферментів, зв'язані з інгібітором, можуть бути компенсовані залученням вільних молекул ферменту в реакцію. Як результат, експериментальне зниження відгуку біосенсора буде нижчим за фактичне зниження активності ферменту внаслідок інгібування. Цей ефект характерний для іммобілізованих ферментів незалежно від механізму інгібування або системи, що використовується для виявлення ферментативної активності [32]. Для високих концентрацій субстрату і субстрат, і інгібітор взаємодіють з іммобілізованим ферментом одночасно, а чутливість до інгібітора зменшується зі збільшенням концентрації субстрату. Це стосується лише необоротного механізму інгібування фермента. Тому в подальших експериментах використовували 1 мМ концентрацію БуХХ. Також було показано, що інгібування не залежить від тривалості контакту біосенсора з гліоалкалоїдами. Протягом 1-30 хв періоду інкубації біосенсора з гліоалкалоїдами змін рівня інгібування не спостерігалось.

Загальновідомо, що вибір буфера може впливати на активність ферменту. рН-залежність активності іммобілізованої БуХЕ від субстрату та інгібітора вивчали в буферному розчині "Polymix". Цей складний буфер був обраний у цій роботі, щоб уникнути будь-якого впливу ємності буфера на відгук датчика, оскільки такий буфер демонструє однакову буферну ємність у широкому діапазоні рН - від 5,0 до 9,0. На рис. 4.15 наведено залежність відгуку біосенсора на основі БуХЕ на додавання 1 мМ БуХХ та рівень інгібування ферменту після контакту з α -чаконіном, α -соланіном та томатином при різних значеннях рН.

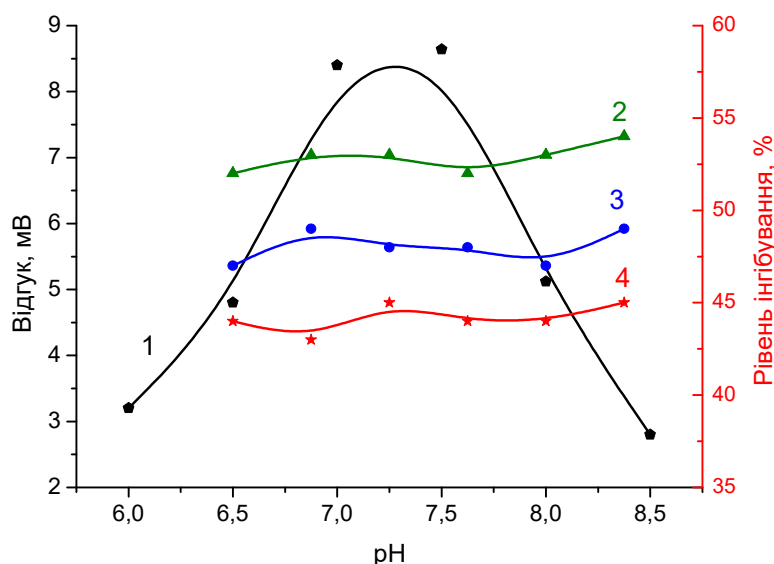


Рис. 4.15 – Залежність відгуку біосенсора на додавання 1 мМ БуХХ (1) та рівні інгібування іммобілізованої БуХЕ для 5 мкМ α -чаконіну (2), 5 мкМ α -соланіну (3) та 5 мкМ томатину (4) від рН. Вимірювання проводили в 2,5 мМ буфері “polymix”

Найвищий відгук біосенсора на додавання субстрату був отриманий для буферного розчину рН 7,2, тоді як рівень інгібування не залежав від рН розчину у дослідженому діапазоні. Ці дані добре узгоджуються з результатами оцінки активності холінестераз щодо субстратів та глікоалкалоїдів, отриманими іншими авторами [33, 19], але відрізняються від результатів, що демонстрували високу рН-залежність при руйнуванні мембран глікоалкалоїдами [34, 35]. У всіх наступних експериментах для вимірювань використовували оптимальні значення рН, щоб отримати найкращу роздільну здатність для подальшого визначення інгібіторів.

Іншими важливими характеристиками біосенсора є залежність його відгуку від концентрації буфера та іонної сили розчину. Результати, представлені на рис. 4.16 та 4.17, показують, що вихідні сигнали потенціометричного біосенсора при до додавання субстрату пригнічуються при збільшенні концентрації буфера і NaCl.

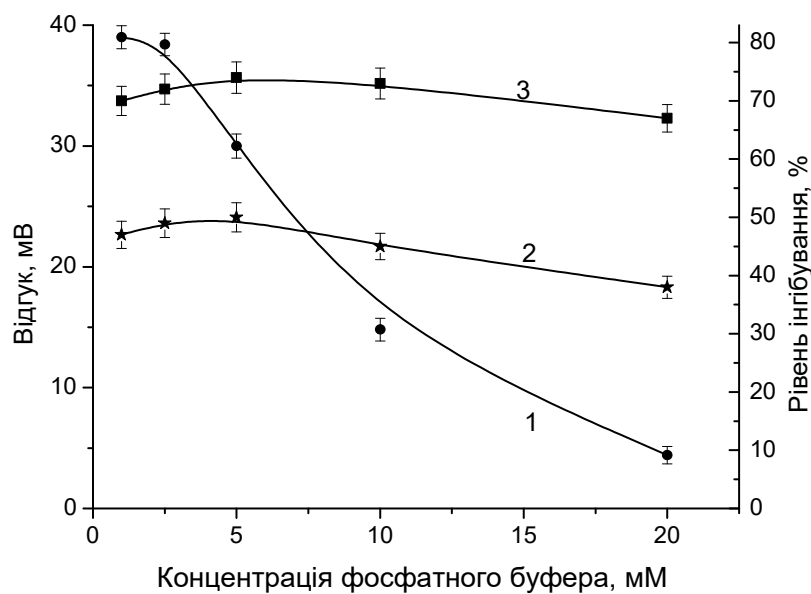


Рис. 4.16 – Залежність відгуків біосенсора на додавання 1 мМ БуХХ (1) та наступні рівні інгібування іммобілізовані БуХЕ для 2 мкМ (2) та 5 мкМ (3) α -чаконіну від концентрацій буфера, рН 7,2

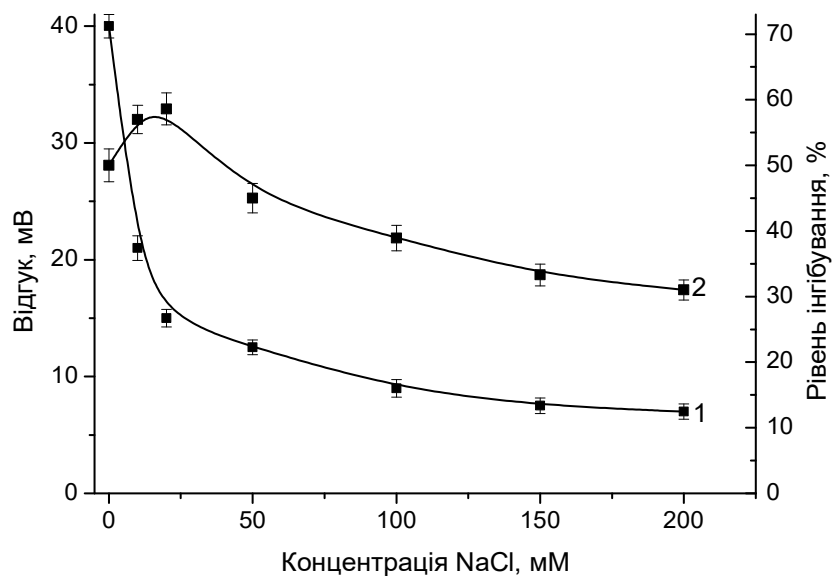


Рис. 4.17 – Залежність відгуків біосенсора на додавання 1 мМ БуХХ (1) та наступні рівні інгібування іммобілізовані БуХЕ для 2 мкМ α -чаконіну від концентрацій NaCl в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2

Збільшення концентрації фосфатного буфера з 2 мМ до 20 мМ та збільшення концентрації NaCl до 200 мМ призводять до 8-9-кратного зменшення вихідного сигналу. Це явище добре відоме для ферментних біосенсорів і може бути пов'язане зі збільшенням буферної ємності та іонної сили розчину [36]. У той же час рівень інгібування не сильно залежить від буфера та концентрації NaCl. Отже, зміна концентрації буфера та NaCl не є важливим параметром для визначення глікоалкалоїдів і не впливає на рівень інгібування. Ось чому в подальших вимірах був обраний 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,2, без додавання NaCl.

Існує кілька підходів до оцінки рівня інгібування ферментів, які відповідають різним експериментальним процедурам. Типові криві відгуків біосенсора на додавання субстрату БуХХ та α -соланіну в буферний розчин були отримані завдяки двом різним протоколам вимірювань (рис. 4.18).

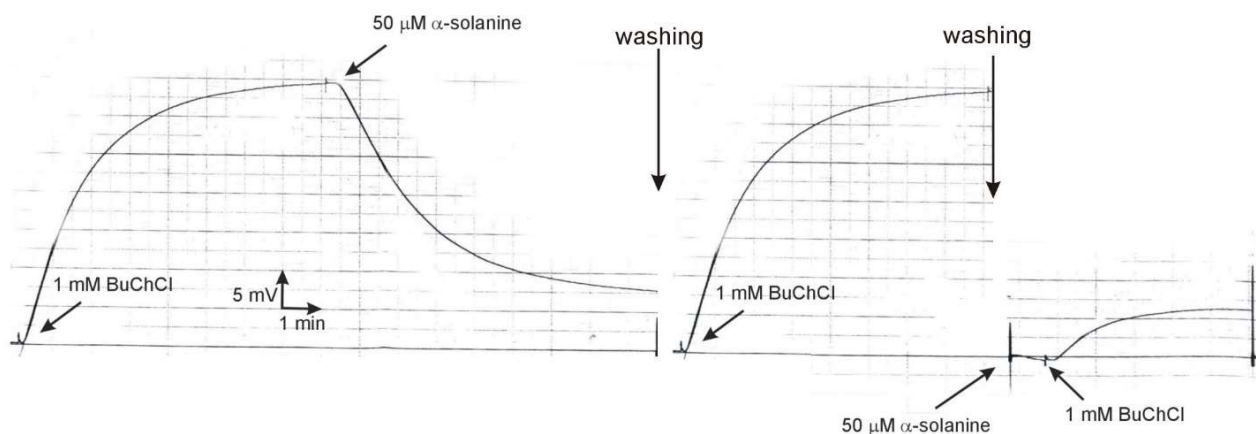


Рис. 4.18 – Типові криві відгуків біосенсора на основі БуХЕ для двох різних протоколів вимірювань. Умови вимірювання: базова лінія вимірюється у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2; стрілки вказують точки додавання різних аліквот БуХХ та α -соланіну

У першому випадку спочатку додавали субстрат та отримували відгук. Після стабілізації відгуку додавали інгібітор та вимірювали ефект інгібування. У другому випадку субстрат спочатку змішували з інгібітором, потім додавали відповідний об'єм суміші і вимірювали відгук. Як видно з рисунку, кінцеві рівні сигналу в обох випадках однакові, отже, можна використовувати обидва протоколи.

Загальновідомо, що принаймні 95% усіх глікоалкалоїдів у товарній картоплі складають α -соланін та α -чаконін. На рис. 4.19 представлено калібрувальні криві для виявлення таких глікоалкалоїдів та їх аглікону соланідину.

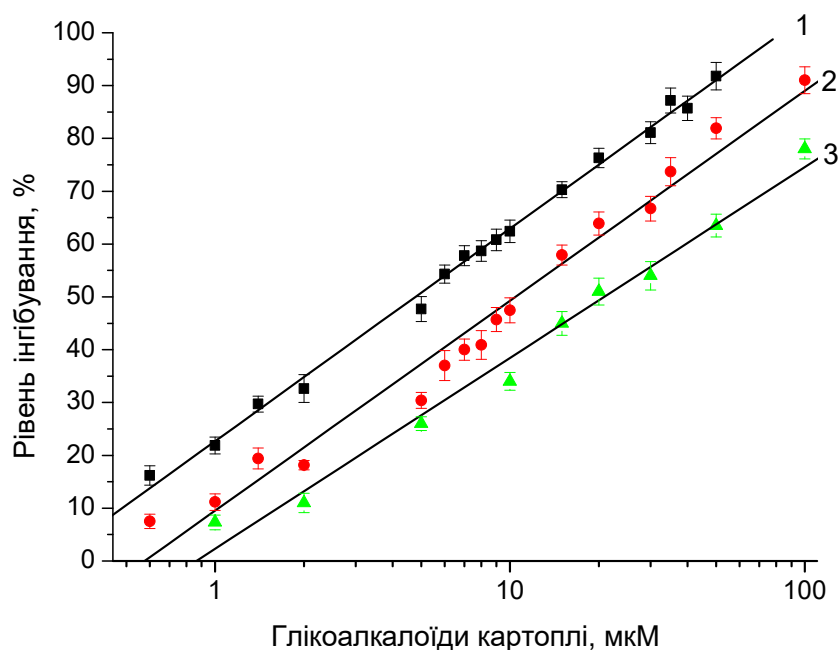


Рис. 4.19 – Калібрувальні криві для виявлення α -чаконіну (1), α -соланіну (2) та соланідину (3) за допомогою біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 та 1 мМ БуХХ

Як бачимо, загальний вміст глікоалкалоїдів картоплі може бути виявлений в межах 0,2-100 мкМ залежно від типу алкалоїду, з межами виявлення 0,2 мкМ для α -чаконіну, 0,5 мкМ для α -соланіну та 1 мкМ для соланідину. Згідно рекомендації ІУРАС межа виявлення - це найменша концентрація, яку аналітик може розраховувати чи виявити з певною мірою впевненості. Згідно з цим визначенням межу виявлення визначали наступним чином: $DL = 3s_b/S$, де s_b - стандартне відхилення базової лінії, а S - чутливість (виражена як нахил калібрувальної кривої). Динамічні діапазони досліджуваних сполук демонстрували, що такі біосенсори придатні для кількісного виявлення глікоалкалоїдів у зразках картоплі.

На рис. 4.20 представлено калібрувальні криві для виявлення глікоалкалоїдів томатів, а саме томатину та його аглікону томатидину.

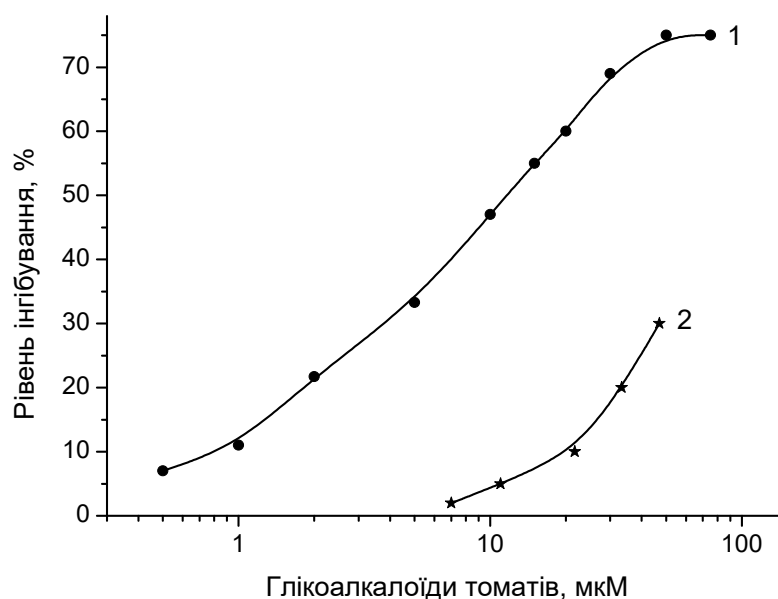


Рис. 4.20 – Калібрувальні криві для виявлення томатину (1) та томатидину (2) за допомогою біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 та 1 мМ БуХХ

Як видно, томатин можна виявити в межах 0,5 - 50 мкМ з межами виявлення 0,2 мкМ. Динамічні діапазони показують, що такі біосенсори підходять для кількісного виявлення томатину у зразках томатів.

Практичність застосування біосенсорів часто обмежується його відтворюваністю, операційною стабільністю та стабільністю при зберіганні. Тому ці характеристики були детально досліджені. Комбінований тест на відтворюваність, операційну стабільність та стабільність при зберіганні для розробленого біосенсора показує дуже добрі результати (рис. 4.21).

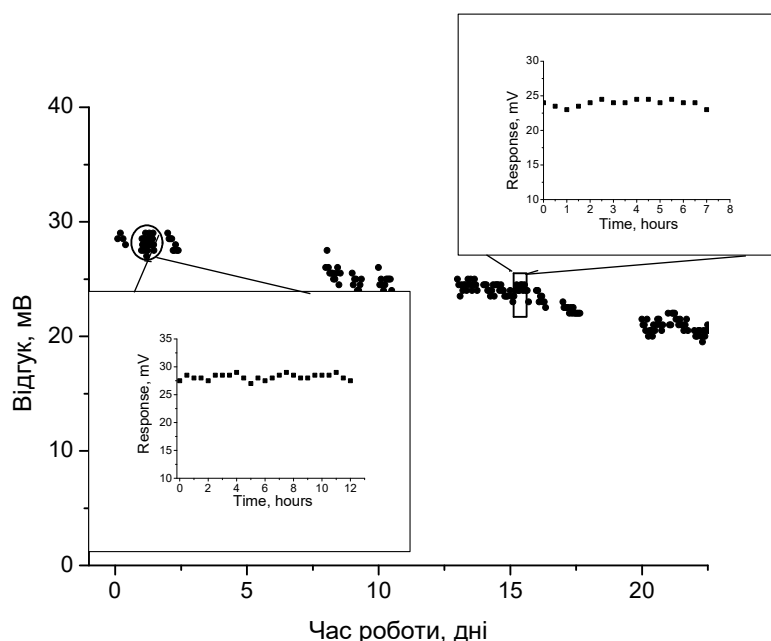


Рис. 4.21 – Відтворюваність, операційна стабільність та стабільність при зберіганні біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 та 1 мМ БуХХ

У цьому дослідженні відтворюваність та операційну стабільність аналізували протягом однієї доби або кількох годин, потім біосенсор зберігали в робочому буферному розчині при кімнатній температурі протягом ночі, а після цього перевіряли ще раз. Цю процедуру повторювали протягом декількох днів. Відгуки біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ були відтворюваними; відносне стандартне відхилення становило близько 3%. Тест на операційну стабільність продемонстрував, що відгуки біосенсорів залишаються стабільними зі зменшення відгуку близько 1% на день, коли сенсор знаходився в робочих умовах. Крім того, стабільність при зберіганні в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 при температурі +4°C була високою, відгуки біосенсора залишалися стабільними протягом більше трьох місяців.

Таким чином представлені результати демонструють доцільність використання біосенсорів на основі бутирилхолінестерази та рН-чутливих польових транзисторів для чутливого виявлення глюкоалкоголідів. Запропонований

біосенсор досить дешевий, простий в експлуатації і потребує короткого часу аналізу у порівнянні з традиційними методами оцінки глікоалкалоїдів. Основні аналітичні характеристики розроблених біосенсорів вивчали в модельних розчинах за різних умов.

Розроблені біосенсори для визначення глікоалкалоїдів можуть успішно застосовуватись в різних сферах людської діяльності для (i) контролю вмісту алкалоїдів у посівних лініях та потенційних комерційних сортах, щоб уникнути перевищення концентрацій алкалоїдів, безпечних для споживання, (ii) вибору відповідних умов вирощування та процедур після збирання врожаю для мінімізації рівня алкалоїдів, та (iii) розробка алкалоїдів, що володіють інсектицидною, антимікробною та фунгітоксичною активністю.

4.4 Застосування холінестераз в біосенсорах для визначення афлатоксинів

Афлатоксини – це продукти життєдіяльності мікроскопічних грибів *Aspergillus* [37]. Мікроміцети *Aspergillus* з'являються при неправильному зберіганні в багатьох продуктах. Афлатоксини забруднюють широкий спектр продуктів харчування та кормів, як правило, це плоди рослин з високим вмістом олії. Найбільш підверженні ураженню афлатоксинами кукурудза, рис, пшениця та інші зернові, а також горіхи та спеції [38].

Сімейство афлатоксинів налічує чотири основних представники, які зустрічаються в природі, ними є афлатоксини B1, B2, G1 та G2 (рис. 4.22). Також були ідентифіковані інші сполуки (метаболіти або їхні похідні) з цього сімейства, такі як афлатоксини M1, M2, V2A, G2a, GM1, P1, Q1.

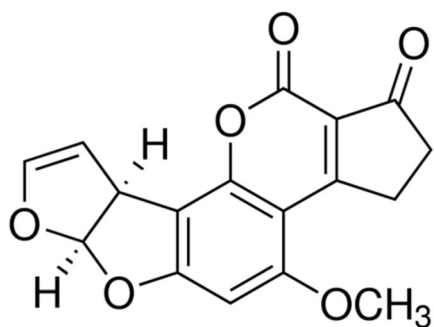
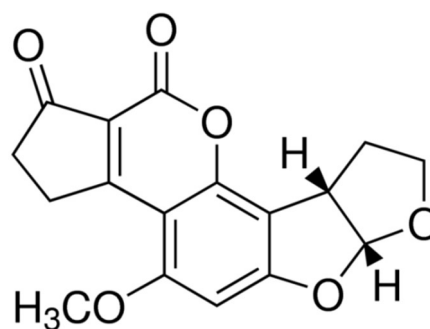
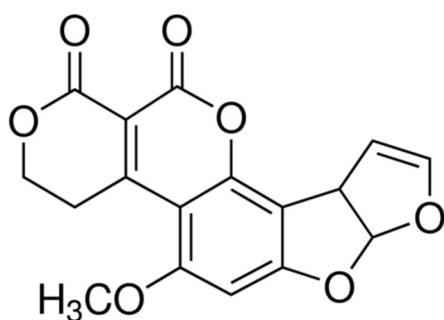
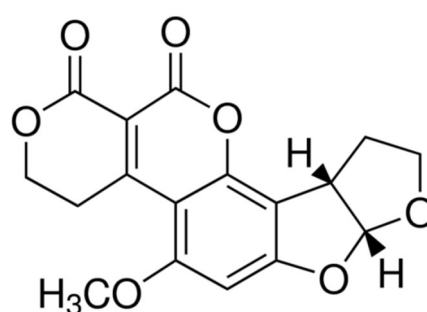
*Афлатоксин В1**Афлатоксин В2**Афлатоксин G1**Афлатоксин G2*

Рис. 4.22 – Хімічна будова натуральних афлатоксинів В1, В2, G1 та G2

Афлатоксин В1 (АФВ1) - найбільш токсичний та канцерогенний серед всіх афлатоксинів. Міжнародне агентство з вивчення раку відносить його до 1 категорії канцерогенів для людини [39]. У зв'язку з великою поширеністю і високою токсичністю багато країн прийняли правила, які регулюють рівень АФВ1 в продуктах, сировині та кормах. Регламентований рівень норми визначення АФВ1 в різних продуктах складає від 0,05 – 20 нг/мл [40]. До класичних методів визначення АФВ1 відносять тонкошарову хроматографію [41], високоефективну рідинну хроматографію [42], різні поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [43] та імуноферментний аналіз [44]. Між тим, сьогодні велика увага приділяється розробці експрес-методів аналізу афлатоксинів, таких як біосенсиори.

Спочатку був підібраний протокол проведення аналізу афлатоксину на основі інгібування АцХЕ.

Додавання афлатоксинів у вимірювальну комірку з біосенсором на основі холінестераз призводить до зменшення числа протонів, що утворюються в результаті ензиматичної реакції, і відгук біосенсора зменшується (рис. 4.23).

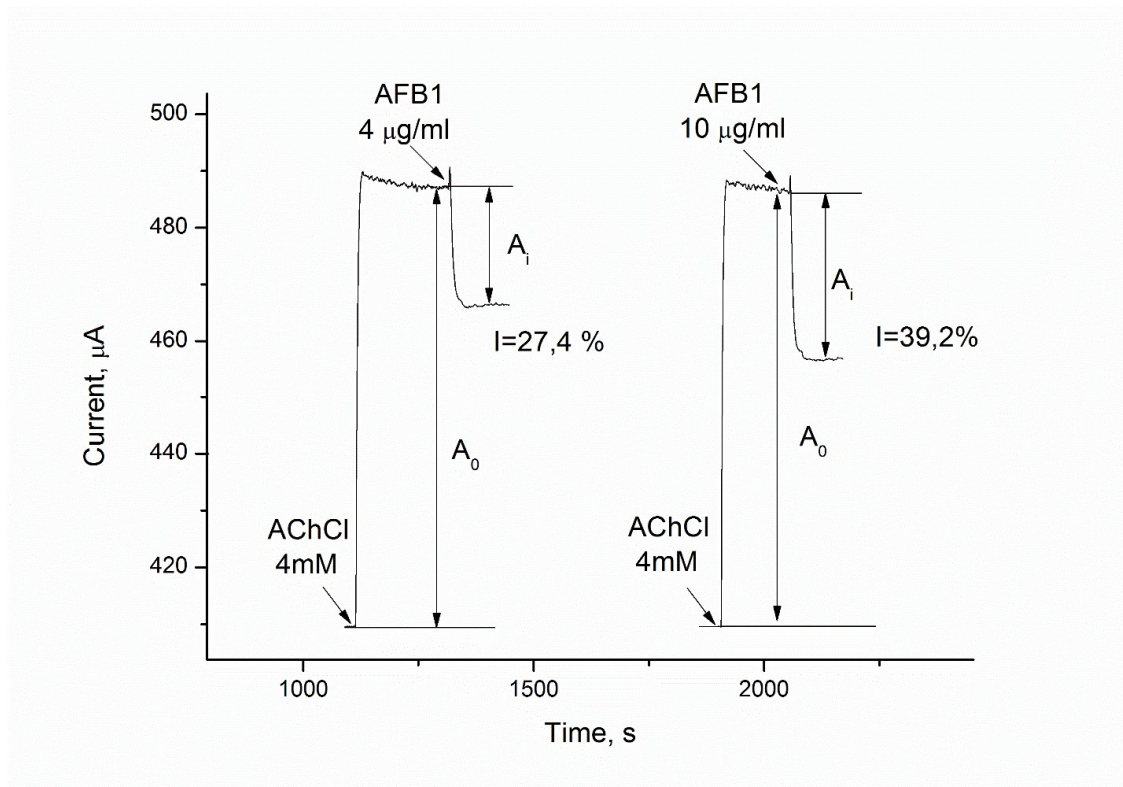


Рисунок 4.23 – Відгук потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ на додавання 4 мМ АцХХ до та після інгібування двома різними концентраціями АФВ1. Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 7,0

Порівнюючи відгуки біосенсора на субстрат до та після інгібування, можна обчислити рівень інгібування відповідно до формули 4.3. Рівень інгібування пропорційний до концентрації інгібітора в вимірювальній комірці. На рис. 4.23 наведені типові відгуки біосенсора на субстрат (АцХХ), концентрацією 4 мМ, та дві різні концентрації афлатоксину В1 (АФВ1) 4 мкг/мл (12,8 мкМ) та 10 мкг/мл (32 мкМ). В подальшому розробка біосенсора спрямована на аналіз впливу на його відгук речовин з сімейства афлатоксинів.

На першому етапі роботи необхідно було підібрати робочу концентрацію ацетилхолінхлориду, як субстрату, для подальшого інгібіторного аналізу. Для цього отримували відгуки на різні концентрації АцХХ. Концентрації субстрату в комірці об'ємом 2 мл задавали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованого 500 мМ розчину АцХХ. Для визначення оптимальної робочої концентрації саме для інгібіторного аналізу відгуки на різні концентрації субстрату були проаналізовані до та після інгібування 10 мг/мл АФВ1.

За результатами дослідження побудовано калібрувальну криву залежності величини відгуку біосенсора від концентрації субстрату (рис. 4.24, крива 1) та криву залежності рівня інгібування біосенсора від різних концентрації АцХХ в присутності інгібітора (рис. 4.24, крива 2).

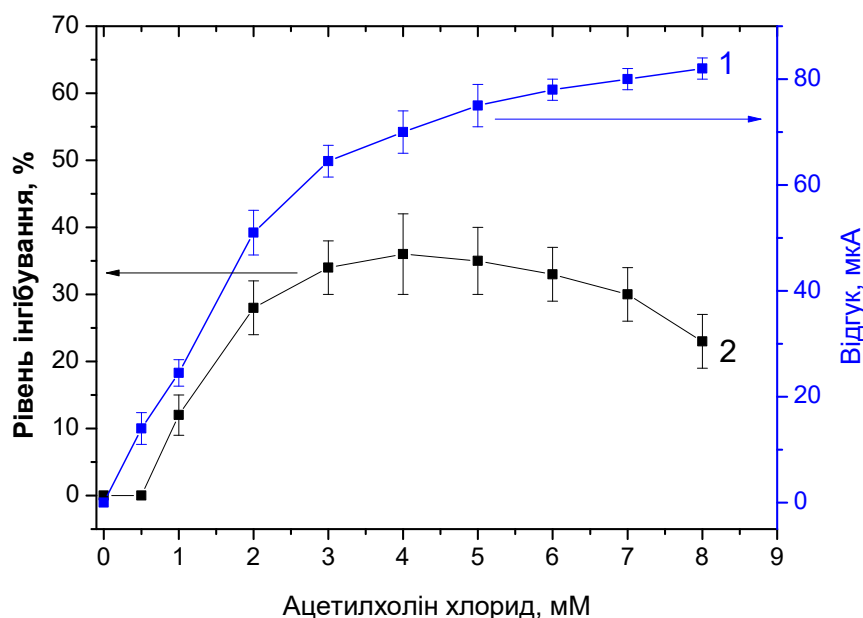


Рисунок 4.24 – Вплив різних концентрації АцХХ на відгуки потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ (1) та на величину рівня інгібування біосенсора концентрацією 10 мкг/мл афлатоксинуВ1 (2). Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 7,0

Як видно з рис. 4.24, відгук біосенсора на додавання субстрату лінійно зростає зі збільшенням концентрації субстрату до 2 мМ, і поступово виходить на плато за межами цього значення. Найбільший рівень інгібування спостерігався при концентрації 4 мМ АцХХ, а при більш високих концентраціях спостерігалось

повільне зниження ефекту інгібування. Така картина характерна для конкурентного інгібування де субстрат та інгібітор конкурують за той же сайт зв'язування. Тому для проведення інгібіторного аналізу АФВ1 у подальших експериментах ми використовували концентрацію ацетилхолін хлориду 4 мМ, яка є близькою до насичуючої.

На наступному етапі роботи було досліджено як зміна концентрації АцХЕ в біомембрані буде впливати на робочі характеристики біосенсора при інгібіторному аналізі афлатоксину В1. Для цього були виготовлені біосенсиори з різною концентрацією АцХЕ в біоселективній мембрані: 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 5%. Для кожного біосенсора були отримані відгуки на 4 мМ ацетилхолінхлориду та відгуки на ту ж саму концентрацію АцХХ в присутності 4 мкг/мл афлатоксину В1. На основі цих даних були побудовані криві залежності відгука біосенсора (рис. 4.25, крива 1) та рівня інгібування (рис. 4.25, крива 2) від концентрації ензиму в біомембрані.

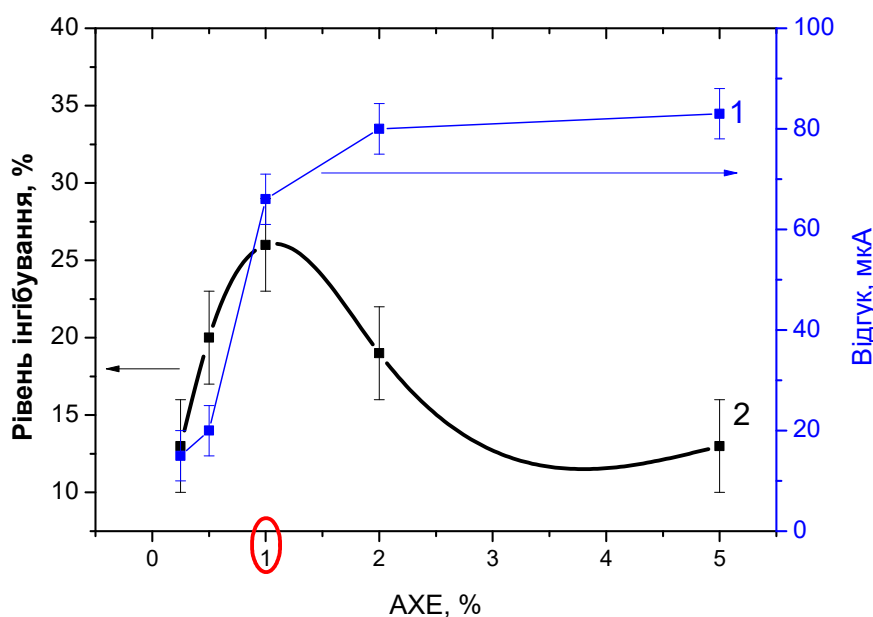


Рисунок 4.25 – Залежність відгуків біосенсора (1) та рівня інгібування (2) біоселективного елементу біосенсора від різних концентрацій ацетилхолінестерази в мембрані. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, концентрація АцХХ – 4 мМ

Найбільший рівень інгібування спостерігається при концентрації ферменту в мембрані 1%. Так як пріоритетним для вибору умов роботи у нас є саме рівень інгібування, для подальших досліджень були обрані біосенсиори на основі 1% АцХЕ. При такій концентрації ферменту в біоселективній мембрані ми спостерігаємо максимальний рівень інгібування, а величина відгуків на субстрат була достатньою для вимірювань.

При вивченні чутливості біосенсора на основі АцХЕ до афлатоксинів було показано, що біосенсор характеризувався лінійним діапазоном визначення в межах від 0,5 мкМ до 20 мкМ при побудові калібрувальної кривої в напівлогарифмічних координатах (рис. 4.26).

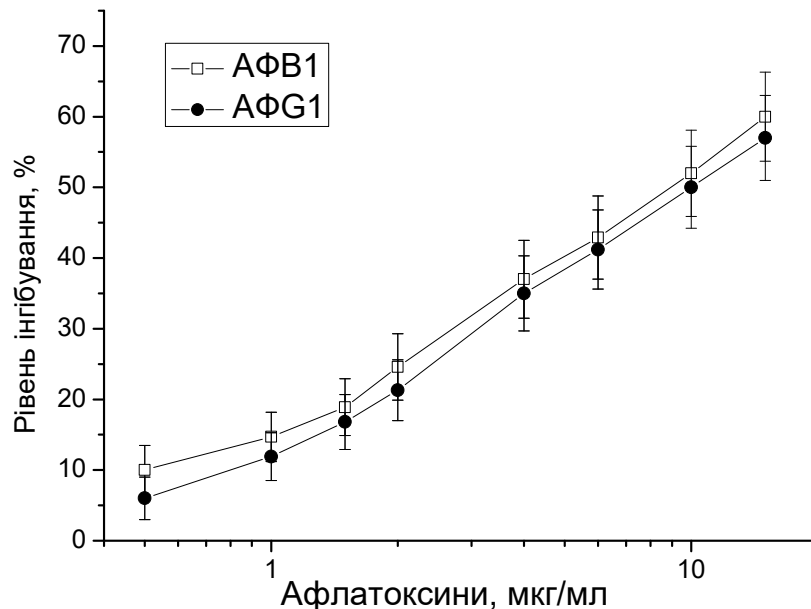


Рисунок 4.26 – Залежність рівня інгібування біосенсора від концентрації афлатоксина В1 та G1. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, концентрація АцХХл – 4 мМ, при кімнатній температурі

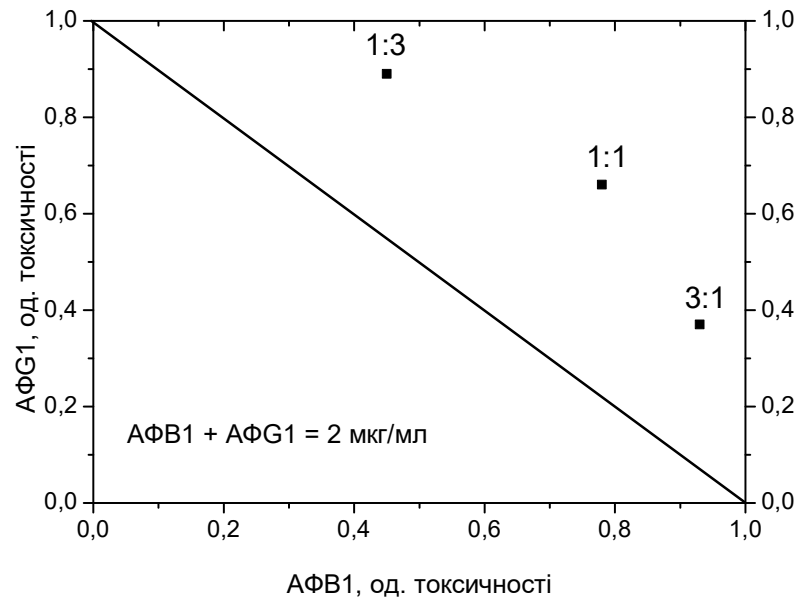
Також з рис. 5.26 видно, що чутливості біосенсора до АФВ1 і АФГ1 подібні (криві майже не відрізняються з урахуванням похибки вимірювання). Цілком логічно припустити, що величини відгуків на афлатоксин В2 будуть близькими до величин відгуків на АФВ1, і аналогічно з відгуками на афлатоксин G1 та G2. Це є досить цікавим результатом виходячи з того, що деякі гриби роду *Aspergillus*

можуть продукувати обидві групи токсинів. Якщо АФВ1 і АФГ1 при взаємодії мають адитивний ефект, то використовуючи калібрувальну криву для визначення АФВ1 можна визначати загальну концентрацію всіх афлатоксинів у зразку.

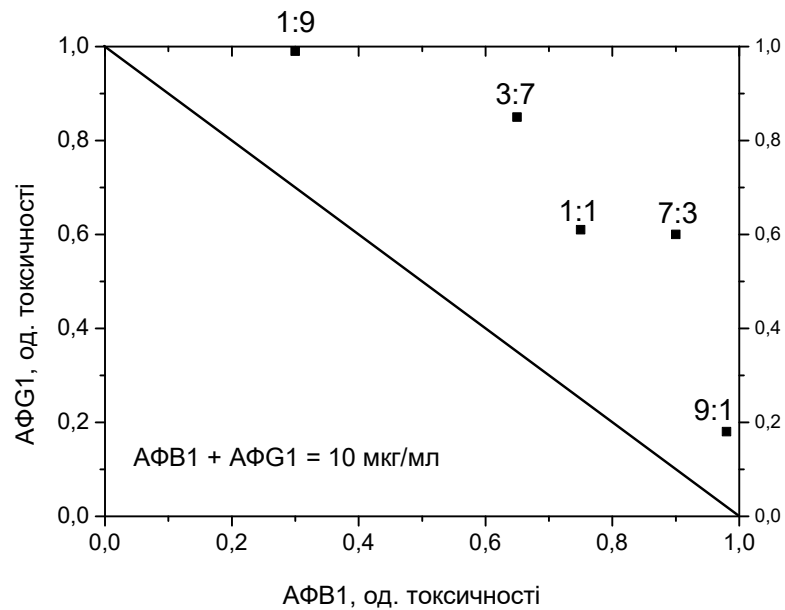
Для того щоб визначити вплив АФВ1 і АФГ1 на іммобілізовану на поверхні перетворювачів АцХЕ, було адаптовано метод ізобольних діаграм [45]. Ізобольні діаграми зазвичай використовуються для ідентифікації адитивного, синергетичного або антагоністичного токсичного впливу суміші кількох сполук. При побудові ізобольної діаграми кожна компонента (токсин) перераховується в комплексні одиниці токсичності, що відкладаються на осях Х та Y. Точки, що лежать нижче кривої концентраційного додавання, відповідають за ефект синергізму, тобто багатократного збільшення сумарного ефекту впливу суміші речовин у порівнянні із впливом цих токсичних компонентів окремо.

Точки, що лежать вище кривої концентраційного додавання, відповідають за ефект додавання, тобто коли ефект впливу суміші токсичних речовин дорівнює сумі ефектів впливу цих окремих компонентів. Точки, що знаходяться поза межами границі незалежності однієї компоненти від другої, визначаються як ефект антагонізму, при цьому відбувається зменшення комбінованого ефекту впливу суміші речовин у порівнянні із впливом окремих компонентів. Одиниці токсичності для кожної суміші визначають як відношення ефекту інгібування ензиму окремою компонентою до ефекту інгібування ензиму їхньою сумішшю.

Ізобольні діаграми, отримані для різних співвідношень АФВ1 та АФГ1 загальної концентрації суміші 2 і 10 мкг/мл (АФВ1 + АФГ1) показані на рис. 4.27.



(А)



(Б)

Рисунок 4.27 – Ізобольні діаграми для визначення ефектів взаємодії АФВ1 і АФГ1 інгібування АцХЕ, іммобілізованої на поверхню потенціометричного перетворювача. Загальна концентрація суміші 2 мкг/мл (А) і 10 мкг/мл (Б). Кожну компоненту було перетворено в одиниці токсичності

На рисунках чітко видно, що в усіх випадках інгібування іммобілізованої ацетилхолінестерази різними сумішами афлатоксинів визначається адитивний ефект, тобто інгібування окремими компонентами та їхньою сумішшю просто сумується, а не збільшується в декілька разів, як у випадку синергізму. Таким чином, у разі використання біосенсора на основі іон-селективних польових транзисторів та методу ізоболограм було показано, що афлатоксин В1 інгібує іммобілізовану ацетилхолінестеразу дещо більше за афлатоксин G1, а їхній суміші притаманний ефект додавання, за якого рівень інгібування сумішшю складається із суми рівней інгібування окремих компонентів. Таким чином використовуючи ацетилхолінестеразний біосенсор можна вимірювати сумарну концентрацію афлатоксинів у зразку.

Наступним кроком була оцінена одна з найважливіших характеристик біосенсора – операційна стабільність відгуків. На рис. 4.28 видно, що біосенсор характеризувався досить високою відтворюваністю сигналів, отриманих як при прямому визначенні субстрату, так і при інгібіторному визначенні АФВ1. Похибка не перевищувала 2,3% для визначення субстрату та 19,7% для визначення АФВ1.

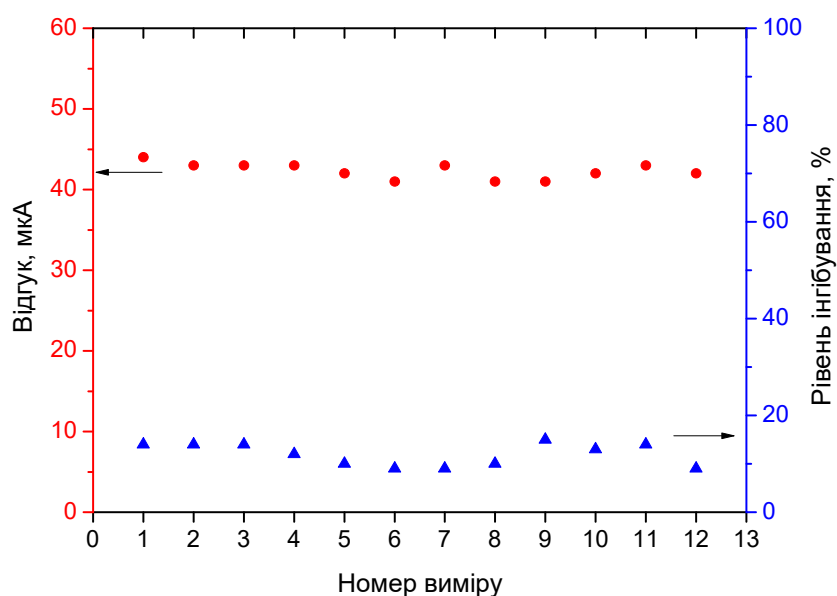


Рисунок 4.28 – Відтворюваність відгуків біосенсора на 4 мМ АцХХ та 4 мкг/мл афлатоксину В1. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, за кімнатної температури

Іншою важливою характеристикою біосенсора є його стабільність при зберіганні. Для дослідження цієї характеристики, відгуки біосенсорів на внесення 4 мМ субстрату вимірювали в різні дні під час зберігання в буферному розчині за різних температур. Один біосенсор зберігали при кімнатній температурі, а інший – зберігався в холодильнику ($+2^{\circ}\text{C}$ – $+5^{\circ}\text{C}$). Результати (тобто середні значення та стандартні відхилення, отримані від повторних вимірів) наведені на рис. 4.29.

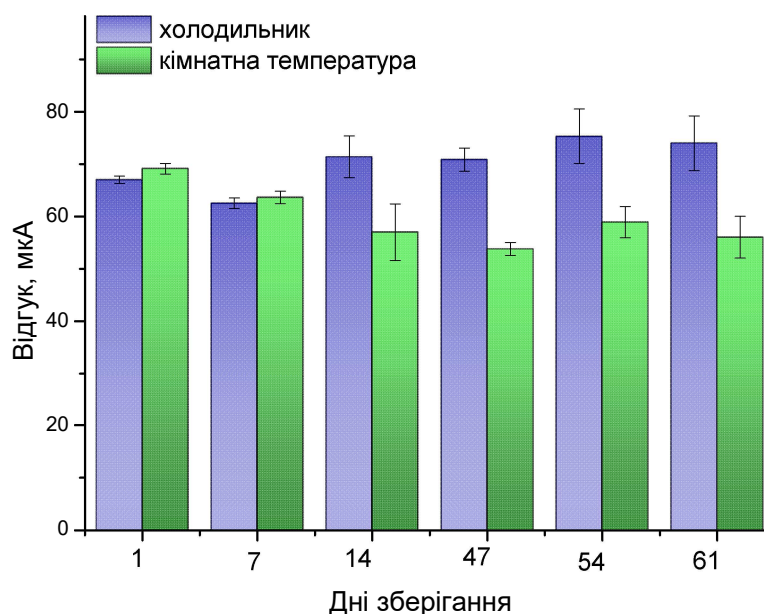


Рисунок 4.29 – Відгуки потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ під час зберігання в буферному розчині при кімнатній температурі та в холодильнику ($+2^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$)

Результати експерименту показують, що потенціометричні біосенсори на основі АцХЕ можуть зберігатися більше двох місяців, але зберігання в холодильнику більше підходить для наших цілей.

Таким чином розроблено біосенсор та створено лабораторний прототип потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ для інгібиторного визначення афлатоксинів. Для роботи було обрано біоселективну мембрану з 1% вмістом АцХЕ та 4 мМ АцХХ, як робочу концентрацію субстрату. Лінійний діапазон визначення АФВ1 складав 0,5 - 20 мкг/мл. Розроблений біосенсор характеризувався достатньою відтворюваністю сигналу протягом одного робочого дня та

можливістю зберігатись більше двох місяців. Показано схожу чутливість біосенсора до АФG1, встановлено, що між афлатоксинами груп В та G спостерігається адитивний ефект, що, в свою чергу, дає змогу використовувати розроблений біосенсор для загального визначення афлатосинів у зразках.

4.5 Використання холінестераз в біосенсорах для визначення поверхнево активних речовин

Поверхнево-активні речовини (ПАР) – це група хімічних сполук, що об'єднані своєю здатністю зменшувати поверхневий натяг на границі розподілу двох фаз. ПАР широко застосовуються в промисловості та побуті завдяки своїм властивостям. Вони входять до складу різноманітних дезінфікуючих та миючих розчинів, засобів особистої гігієни, тощо. Після використання таких розчинів, ПАР потрапляють у навколишнє середовище у великих кількостях, тим самим забруднюючи водні екосистеми [46, 47, 48]. Небезпечним є також те, що ПАР здатні підвищувати розчинність інших токсичних речовин, що призводить до загальної збільшення токсичності водних розчинів [49]. Все це свідчить про необхідність постійного контролю концентрацій цих токсикантів у навколишньому середовищі.

На сьогодні основними методами визначення ПАР є спектрофлуориметрія, рідинна хроматографія, спектрометрія, двофазне титрування, колориметрія [50, 51]. Однак перераховані методи мають ряд недоліків. Деякі з них потребують складного і дорогого обладнання, а також наявності висококваліфікованого персоналу. Також при проведенні аналізу існує необхідність в складній попередній підготовці проб, що виливається у великі затрати часу та коштів. Тому сьогодні постає актуальне питання створення більш точного, селективного, швидкого, зручного та дешевого методу визначення ПАР.

Розробка та створення біосенсорів для визначення ПАР може найкраще вирішити проблеми, пов'язані з перерахованими вище недоліками, та задовольнити усім вищезгаданим вимогам.

На даний момент існує кілька варіантів біосенсорів для визначення поверхнево-активних речовин. В одному з цих біосенсорів як біоселективний матеріал використовували клітини *Trichosporon cutaneum*, іммобілізовані на поверхню амперометричного перетворювача [52]. В інших варіантах біосенсорів в складі чутливого елементу були присутні вже клітини інших видів - *Pseudomonas rathonis* [53], *Comamonas testosteroni* [49] та *Lactobacillus plantarum* [48]. Але всі вже відомі біосенсиори для визначення ПАР були розроблені на основі мікроорганізмів. Відповідно, у порівнянні з біосенсорами на основі ферментів, вони мають ряд недоліків. Біосенсиори на основі бактерій дуже складно стандартизувати, а також вони є недостатньо чутливими та селективними.

Тому даний фрагмент роботи присвячено розробці ензимних біосенсорів на основі холінестераз для інгібіторного аналізу поверхнево-активних речовин.

При інгібуванні ензиму ПАРами зменшується кількість протонів, що утворюються в результаті ферментативної реакції, що призводить до зменшення сигналу біосенсора. Концентрацію ПАР у водних розчинах можна визначати в залежності від швидкості зменшення відгуку біосенсора.

Першим завданням було визначити оптимальні умови іммобілізації ацетилхолінестерази на поверхню біосенсора, для цього було підібрано оптимальний час іммобілізації ензиму в насичених парах ГА. На рис. 4.30 представлено результати дослідження величин відгуків біосенсорів для АцХЕ, іммобілізованих в парах ГА за різного часу (від 15 до 65 хв). Найвища і майже однакова чутливість біосенсорів до ацетилхоліну була при 35 та 65 хвилинах іммобілізації в парах ГА. При цьому час відгуку біосенсора при іммобілізації 65 хв. був у кілька разів довший, ніж при 35-хвилинній іммобілізації, тому для подальших експериментів використовувався час іммобілізації біосенсорів саме 35 хвилин.

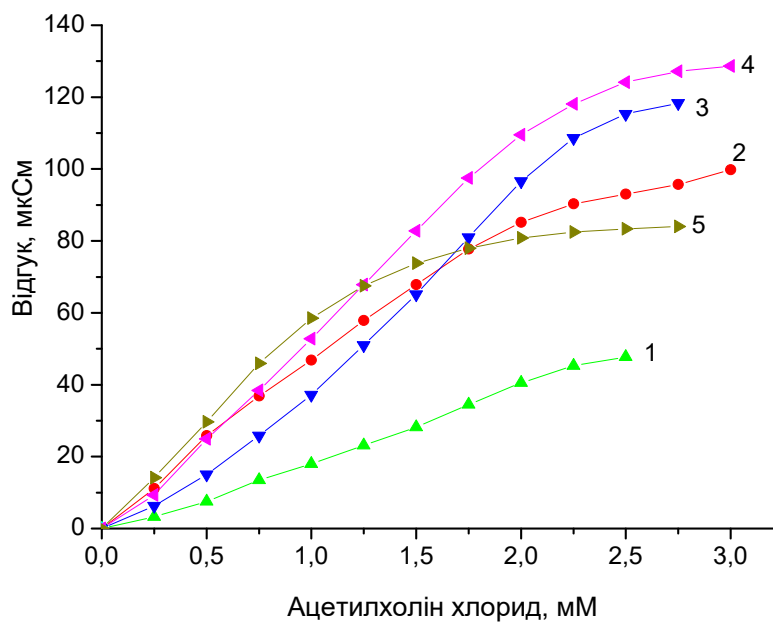


Рисунок 4.30 – Вплив тривалості часу іммобілізації ацетилхолінестерази в парах ГА на величину відгуку біосенсора для різних концентрацій субстрату (1 – 15 хв, 2 – 25 хв, 3 – 35 хв, 4 – 65 хв, 5 – 120 хв). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,5

Після вибору оптимальних умов іммобілізації АцХЕ, необхідно було відпрацювати методику проведення експериментів по інгібуванню біоселективного елементу біосенсора ПАР-ами. Для цього було вирішено використовувати різні способи додавання ПАР та ацетилхолін хлориду до вимірювальної комірки. Для підтвердження правильності вибору методики проведення інгібування було проведено експерименти з використанням концентрацій субстрату, що знаходяться на трьох різних ділянках калібрувальної кривої біосенсора (початок, середина та верхня частина).

Використовували наступні підходи для досліджень:

1) Отримували максимальний відгук біосенсора на субстрат, після чого додавали ПАР. Сигнал поступово зменшувався на 5 – 90 % від максимального, в залежності від концентрації ПАР. Інгібування проходило в середньому за 70 хвилин. Недолік методики – довгий час аналізу.

2) Спочатку біосенсор інкубувався в водному розчині ПАР протягом 70 хвилин, після чого додавали субстрат і отримували відгук біосенсора. Він становив ті ж самі 5 – 90 % від відгуку на субстрат до інгібування (результати співпадали з результатами отриманими першою методикою). Недолік методики – довгий час аналізу.

3) Отримували відгуки біосенсора при додаванні суміші ПАР з субстратом. Залишкова активність (зменшення сигналу) була також пропорційне концентрації інгібітору (рис. 4.31) при відносно невеликому часі аналізу, але чутливість біосенсора до ПАР була меншою за перші два підходи. За 100 % приймали відгук біосенсора на додавання тільки субстрату.

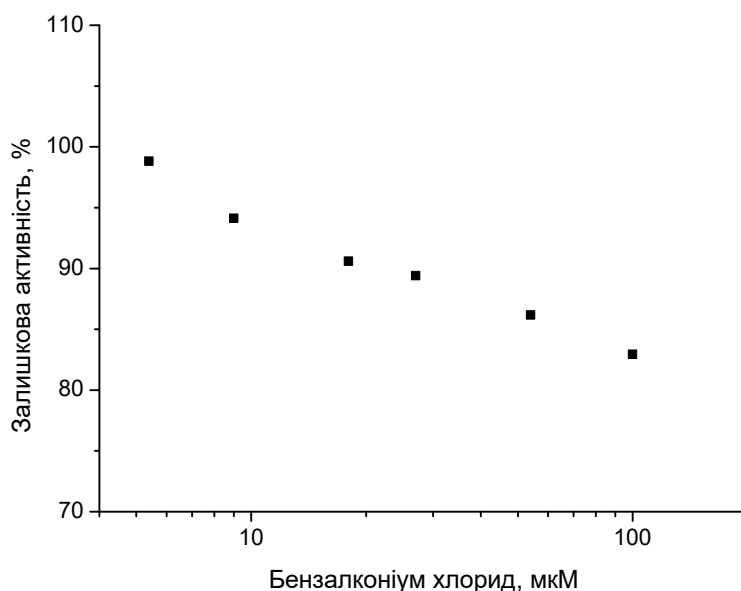


Рисунок 4.31 – Залежність залишкової активності біоселективного елементу від концентрації бензалконіум хлориду при додаванні його в комірку разом з 3 мМ ацетилхолін хлоридом. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,5

Недолік цього підходу - недостатня чутливість біосенсора до ПАР. Межа визначення – 5 мкМ.

4) Останній підхід був дуже схожим з першим, ПАР додавався до комірки після додавання субстрату та отримання максимального відгуку, але детекцію вже проводили не оцінкою величини зменшення відгуку, а по швидкості інгібування.

На рис. 4.32 зображений реальний експеримент з інгібіторного аналізу ПАР за допомогою останнього підходу. Спочатку отримували відгук на насичуючу концентрацію субстрату, після чого додавали ПАР і спостерігали падіння сигналу, обумовлене інгібуванням ферменту. При різних концентраціях ПАР швидкість інгібування біоселективного елементу (мкСм/хв) відрізняється, що дозволяє отримати калібрувальні графіки для визначення ПАР в досліджуваному зразку.

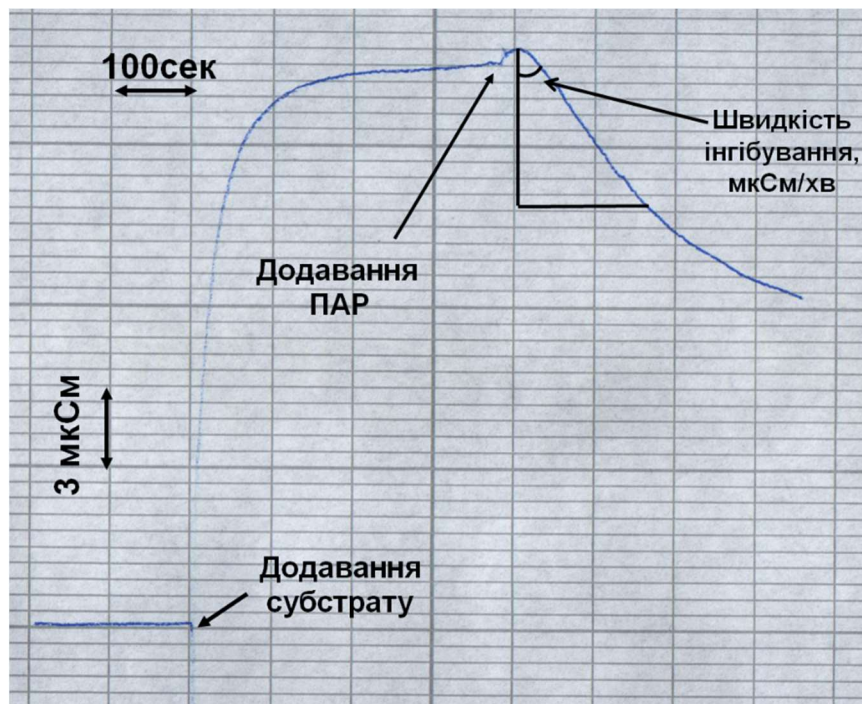


Рисунок 4.32 – Варіант методики визначення ПАР через оцінку швидкості інгібування ацетилхолінестерази біоселективного елементу біосенсора (четвертий підхід, реальний приклад проведення експерименту). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,5, концентрація АцХХ в комірці – 3 мМ

Переваги методики: найменша мінімальна концентрація визначення бензалконіум хлориду – 1 мкМ (0,35 мг/л); час всього аналізу – до 10 хвилин; досить широкий концентраційний діапазон визначення біосенсора для ПАР.

Тому в подальшому було вирішено використовувати останній варіант (четвертий) методики визначення ПАР за допомогою розробленого біосенсора, при якій ПАР додавався до комірки після додавання субстрату, а детекцію вже проводили не за зменшенням величини стаціонарного відгуку, а по швидкості інгібування.

Як відомо, параметри роботи біосенсора залежать як від його власних характеристик, так і від параметрів розчину, в якому виконують вимірювання. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу параметрів розчину, таких як рН, іонна сила та буферна ємність, на величини відгуків біосенсора на основі АцХЕ та на швидкість інгібування біоселективного елементу поверхнево-активними речовинами.

На рис. 4.33 представлено залежність відгуків розробленого біосенсора на субстрат та швидкості його інгібування поверхнево-активною речовиною (бензалконіум хлорид) від концентрації робочого буферного розчину.

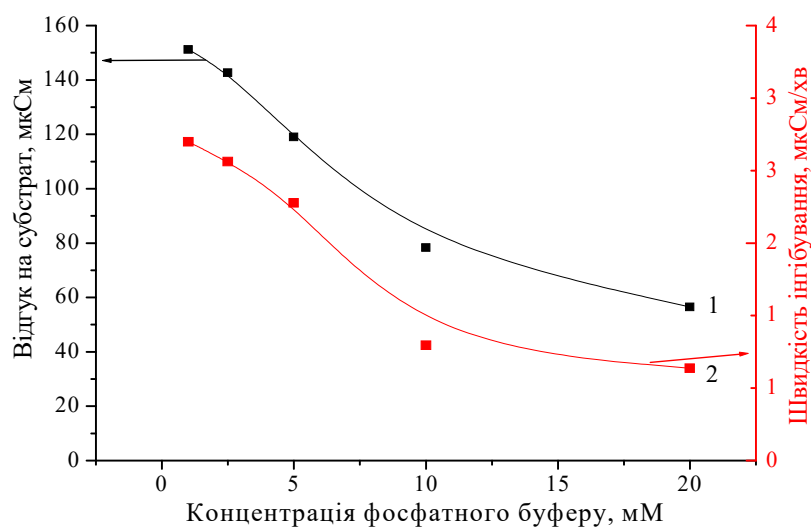


Рисунок 4.33 – Залежності величини відгуку біосенсора на субстрат (1) і швидкості інгібування поверхнево-активними речовинами фермента АцХЕ (2) від концентрації фосфатного буферного розчину. Вимірювання проводили у фосфатному буферному розчині з рН 6,5, концентрація ацетилхолін хлориду – 3 мМ, бензалконіум хлориду – 25 мкМ

З графіку видно, що при підвищенні концентрації буферу від 1 до 20 мМ значно зменшується величина відгуку біосенсора та швидкість його інгібування. В подальших експериментах використовувалась концентрація буферу 5 мМ, при якій залишаються значна буферна ємність робочого розчину та спостерігаються високі відгуки біосенсора на субстрат та достатня швидкість інгібування ферменту поверхнево-активними речовинами.

Як відомо, внаслідок іммобілізації ферменту може змінюється рН-оптимум його роботи. Тому наступним етапом роботи було дослідження впливу рН розчину на роботу розробленого кондуктометричного біосенсора. При проведенні цього експерименту використовувався універсальний буфер, що має однакову буферну ємність в широкому діапазоні рН. Оптимум визначення субстрату біосенсором спостерігався при рН 6,5, а найвища швидкість інгібування біоселективного елементу ПАР-ами – при рН 6,0 (рис. 4.34). Тому надалі в експериментах використовувався буферний розчин з рН 6,0, при якому спостерігається найвища швидкість інгібування АцХЕ поверхнево-активними речовинами та достатньо високі відгуки на субстрат.

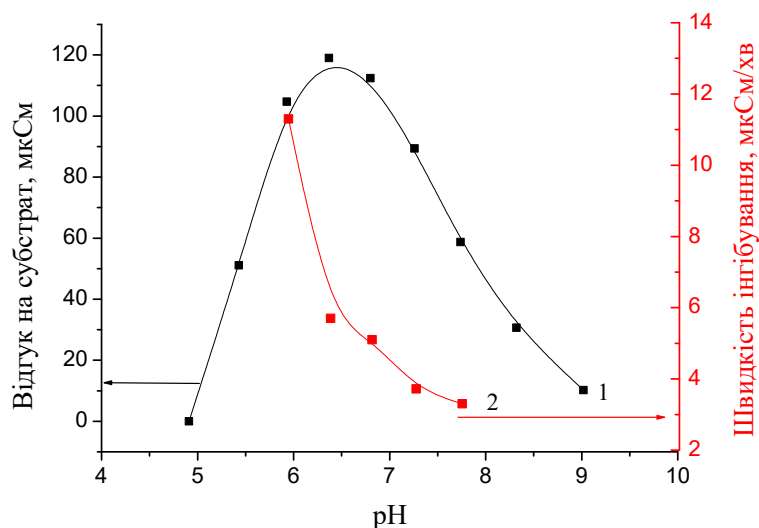


Рисунок 4.34 – Залежності величини відгуку біосенсора на субстрат (1) та швидкості його інгібування бензалконіум хлоридом (2) від рН робочого буферу.

Вимірювання проводили в універсальному буферному розчині, концентрація ацетилхолінхлориду – 3 мМ, бензалконіум хлориду – 25 мкМ

Ще однією характеристикою буферного розчину, що може впливати на роботу розробленого біосенсора, є іонна сила. Було показано, що підвищення іонної сили розчину значно зменшує швидкість інгібування біосенсора поверхнево-активними речовинами і величину відгуку на субстрат (рис. 4.35). Тому при роботі з реальними зразками довілля потрібно постійно контролювати іонну силу розчину.

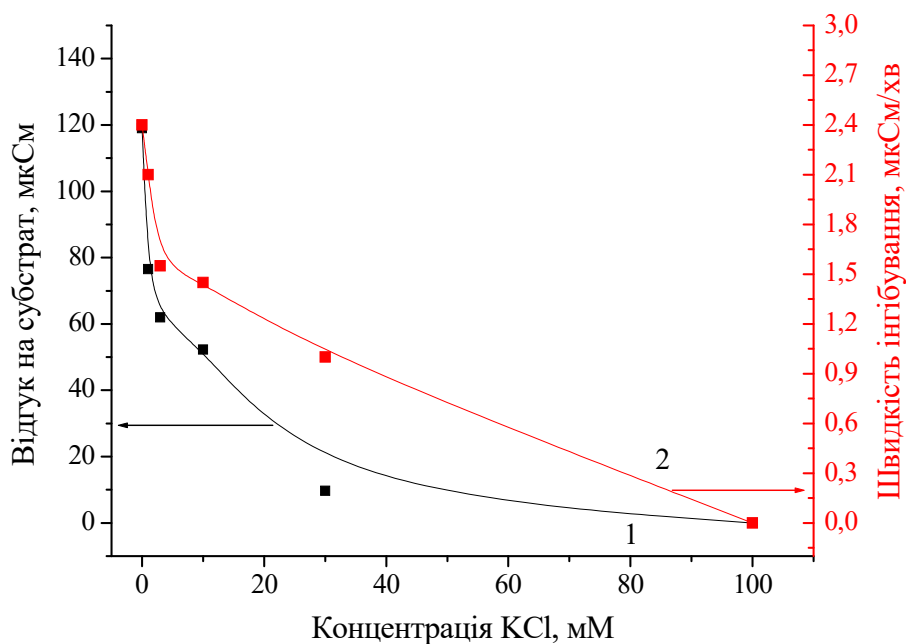


Рисунок 4.35 – Залежності величини відгуку біосенсора на субстрат (1) та швидкості інгібування біоселективного елементу бензалконіум хлоридом (2) від іонної сили розчину. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині з рН 6,0, концентрація субстрату – 3 мМ, бензалконіум хлориду – 25 мкМ

Аналізуючи отримані дані по впливу характеристик розчину на роботу біосенсора при прямому та інгібіторному аналізах, було вирішено використовувати 5 мМ фосфатний буфер, рН 6,0, та постійно контролювати іонну силу.

За оптимальних умов роботи біосенсора, було отримано залежність швидкості інгібування біоселективного елементу від концентрації бензалконіум хлориду (рис. 4.36).

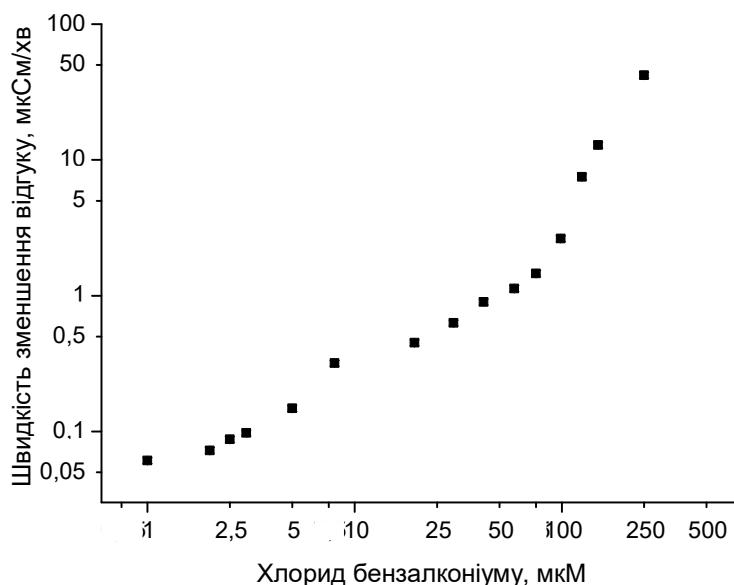


Рисунок 4.36 – Калібрувальний графік для визначення концентрації бензалконіум хлориду в логарифмічному масштабі кондуктометричним біосенсором. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату – 3 мМ

На рис. 4.37 наведено калібрувальний графік залежності швидкості зменшення відгуку біосенсора на основі АцХЕ та рН-ІСПТ від концентрації додецилсульфату натрію ($C_{12}H_{25}O_4NaS$ - аніонна поверхнево-активна речовина).

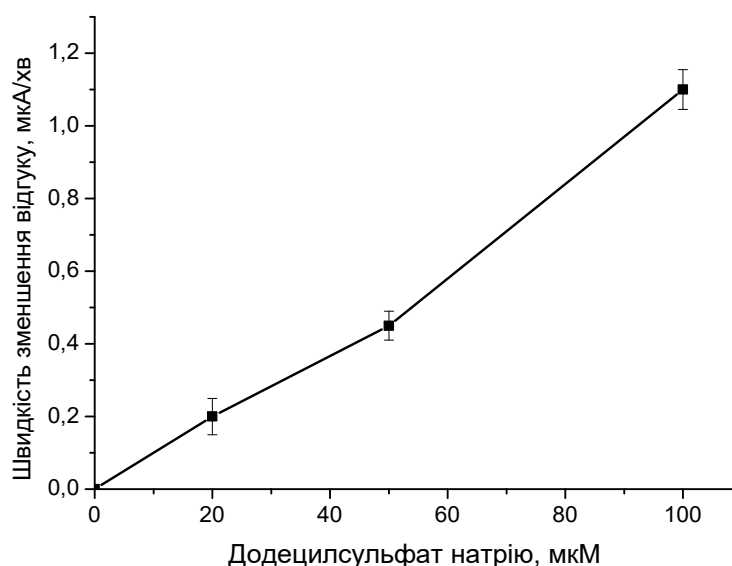


Рисунок 4.37 – Калібрувальний графік для визначення концентрації додецилсульфату натрію біосенсором на основі АцХЕ та рН-ІСПТ. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату – 3 мМ

Одними з найбільш важливих характеристик кожного біосенсора є операційна стабільність та відтворюваність сигналу. Тому наступним етапом нашої роботи було перевірити операційну стабільність розробленого біосенсора. Результати дослідження представлені на рис. 4.38.

Розроблений біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів як при прямому визначенні основного субстрату – ацетилхоліну, так і при інгібіторному визначенні ПАР (рис. 4.37). Стандартне відхилення (S_d) для визначення бензалконіум хлориду становило $\pm 11\%$, а для визначення ацетилхоліну – $\pm 1,9\%$.

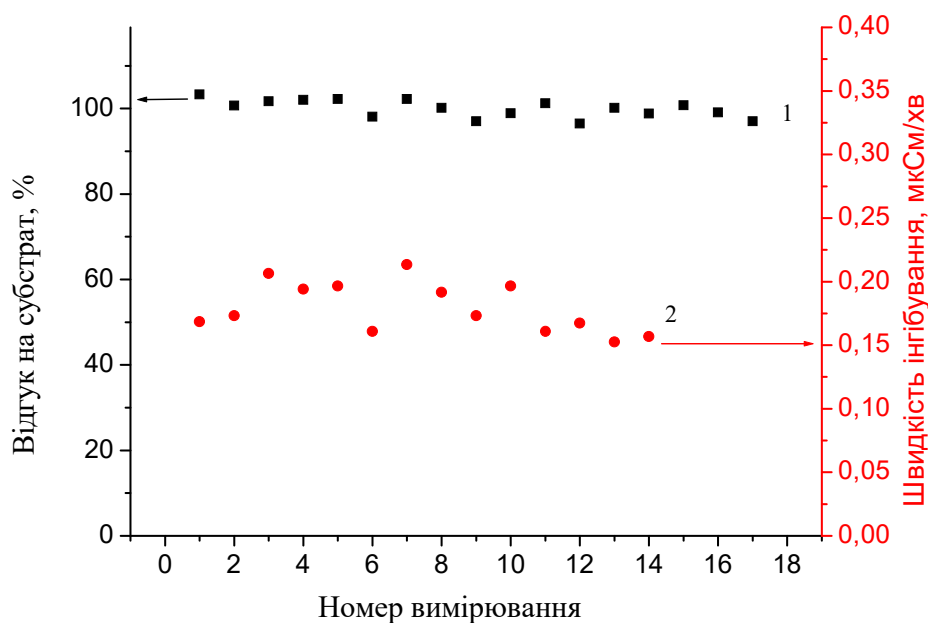


Рисунок 4.38 – Відтворюваність сигналів розробленого біосенсора при визначенні ацетилхоліну (1) та поверхнево-активних речовин (2). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату – 3 мМ, концентрація інгібітора – 25 мкМ

Таким чином, вперше розроблено електрохімічні біосенсори на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази для визначення поверхнево-активних речовин. Оптимальний час іммобілізації АцХЕ в парах глутарового альдегіду складав 35 хв. В роботі було перевірено декілька варіантів інгібіторного визначення ПАР та перевірено чутливість біосенсора до різних концентрацій ПАР

таких як бензалконіум хлориду та додецилсульфат натрію. Визначено рН-оптимум роботи створеного біосенсора, який становить рН 6,0. Перевірено вплив буферної ємності та іонної сили на чутливість біосенсора до субстрату та інгібітору, вибрано оптимальний склад та концентрацію робочого буферу. Показано, що розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю сигналів як при прямому визначенні основного субстрату – ацетилхоліну, так і при інгібіторному визначенні ПАР.

Запропоновані ензимні біосенсори в подальшому можуть бути використані для експрес-аналізу вмісту поверхнево-активних речовин в реальних зразках довкілля.

4.6 Використання холінестераз в біосенсорах для визначення індольних алкалоїдів

На сьогодні велика увага в медичній практиці приділяється індольним алкалоїдам, які володіють помітною фізіологічною активністю.

Індольні алкалоїди - це клас алкалоїдів, які містять у своїй структурі ядро індолу або його похідних. Велика кількість цих алкалоїдів володіють фізіологічною активністю, деякі з них знаходять застосування в медицині [54]. Більша частина фізіологічних ефектів цих алкалоїдів пов'язана з їх дією на центральну і периферичну нервові системи [55].

Велика увага приділяється раувольфії зміїній (*Rauwolfia serpentina*), яка протягом тисячоліть культивується в Індії як лікарська і декоративна рослина. Коріння і кореневища раувольфії зміїної містять до 3 % алкалоїдів, монотерпеноїдних похідних індолу (резерпін, ресцінамін, аймалін, аймаліцин, ізоаймалін, раухімбін, ізораухімбін, раувольфінін, резерпілін, резерпенін, сарпагін, серпентин, серпентінін, серпін, 3-епі-7-іохімбін, аллохімбін, 7-іохімбін, тебаїн, папаверин, чаїндрін - всього понад 50 алкалоїдів) [56]. Найбільш важливі з них резерпін, аймалін і аймаліцин (рис. 4.29).

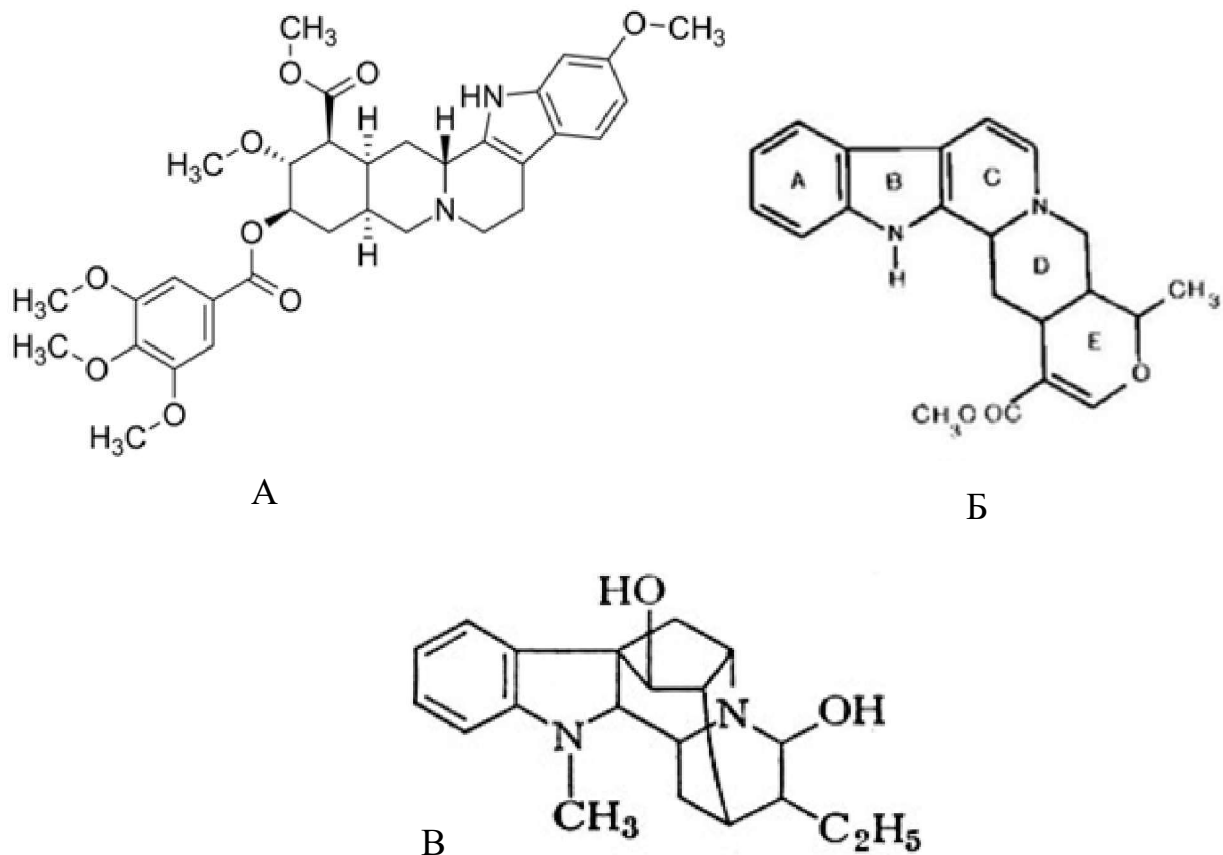


Рисунок 4.29 – Структурні формули а) резерпіну, б) аймаліцину і в) аймаліну

Коріння і кореневища раувольфії зміїної здавна застосовувалися в народній медицині при різних захворюваннях людини та у ветеринарній практиці як ліки від зміїних укусів, лихоманки, божевілля, для зниження кров'яного тиску при гіпертонічній хворобі, а також при лікуванні периферичних і церебральних судинних захворювань. На основі сумарних екстрактів раувольфії або окремих очищених алкалоїдів розроблений ряд фармацевтичних препаратів: Aritmina™, Aphrodyne™, Lamuran™, Raunatin™, Rauwasan™, Rauwopur™, Pressimed™, Serpasil™, Yohimex™ та інші. Дефіцит природної сировини – коренів раувольфії зміїної, зумовив розробку нових біотехнологій отримання рослинної біомаси, а саме вирощування клітинної біомаси раувольфії зміїної в умовах *in vitro*. Розроблено технології і створено клітинні лінії і штами раувольфії зміїної, що накопичують до 2-3% індольних алкалоїдів. Технологію отримання алкалоїдів із біомаси культивованих клітин раувольфії зміїної апробовано у

заводських умовах [57]. Тому достатньо важливим є контроль цих алкалоїдів у сучасних біотехнологічних і фармацевтичних процесах виробництва ліків.

Існує ряд методів для якісного та кількісного визначення індольних алкалоїдів, а саме об'ємний, колориметричний, спектрофотометричний, флуориметричний та інші методи визначення [58]. Ці способи добре вивчені та широко використовуються, але мають деякі недоліки, основні з яких є довготривалість та складна методика підготовки проб, яка може призвести до суттєвих похибок результатів аналізу. Крім того, усі ці методи є відносно дорогими. Тому сьогодні постає дуже актуальне питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів.

Відомо що алкалоїди оборотно інгібують холінестерази, тому для визначення рівня інгібування ензиму ми використовували процедуру вимірювань, що представлена на рис. 4.12.

Відпрацювання умов вимірювань проводилася за допомогою АцХЕ біосенсора. Перш за все були отримані калібрувальні криві на субстрат (АцХХ) двома методами - так званою «драбинкою», коли концентрація субстрату в комірці змінюється шляхом послідовного додавання певних аліквот стокового розчину без проміжного відмивання, а результат цих додавань підсумовується; а також більш точним методом з проміжним відмиванням між додаваннями різних концентрацій субстрату. За отриманими даними були побудовані залежності відгуку від різних концентрацій субстрату, які представлені на рис. 4.30.

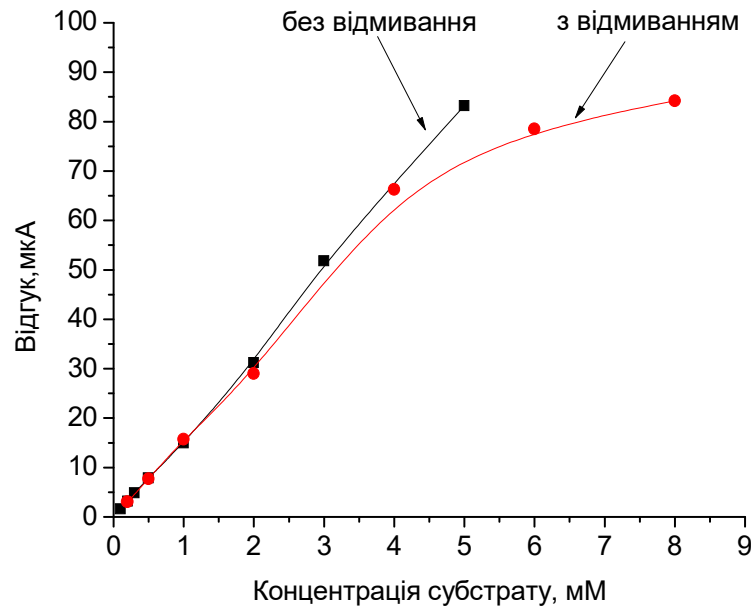


Рисунок 4.30 – Калібрувальні криві, отримані "драбинкою" та з відмиванням буферним розчином після кожного додавання субстрату

З рис. 4.30 видно, що калібрувальні криві, отримані двома методами, майже однакові в межах лінійного діапазону, тому для вимірювань можна застосовувати обидва методи. Однак, для попередніх досліджень зручніше використовувати метод «драбинкою», так як він дозволяє прискорити час експерименту.

На наступному етапі було визначено, оптимальну концентрацію субстрату АцХХ для інгібування соком раувольфії. В експериментальну комірку спочатку вносили субстрат, чекали виходу сигналу на плато та вимірювали його величину. Після стабілізації в комірку вносили 50 мкл соку та за величиною падіння сигналу оцінювали ефект інгібування. Потім не відмиваючи вносили ще 50 мкл соку і знову оцінювали величину падіння сигналу, а відповідно рівень інгібування біоселективного елементу при додаванні 50 та 100 мкл досліджуваного зразка. За отриманими даними була побудована залежність рівня інгібування від концентрації субстрату (рис. 4.31).

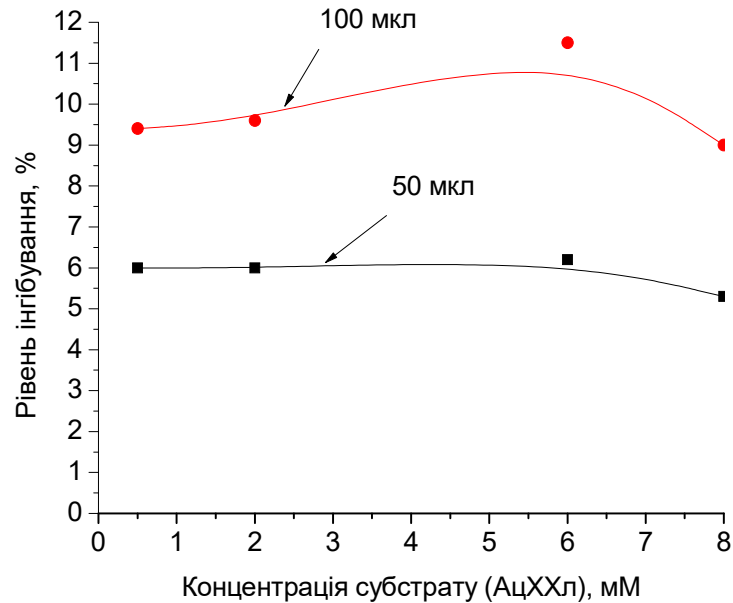


Рисунок 4.31 – Залежність рівня інгібування від концентрації субстрату АцХХ

Було показано, що дещо більший рівень інгібування спостерігався при насичуючих концентраціях субстрату (4 - 6 мМ). Тому для подальшої роботи була обрана концентрація АцХХ 6 мМ.

Також було визначено, що величина рівню інгібування не залежить від об'єму проби. Для цього було підготовлено кілька зразків різного об'єму, але з рівним змістом досліджуваного соку раувольфії. Різниці між рівнем інгібування чистим та розбавленим буферним розчином соком раувольфії практично не було, тобто основний внесок у величину інгібування вносить саме досліджуваний зразок, а об'ємна похибка додавання є незначною.

На рис. 4.32 продемонстровано відгуки біосенсора на основі рН-ПТ на додавання субстрату та соку культури тканин раувольфії зміїна на реальному прикладі проведення експерименту.

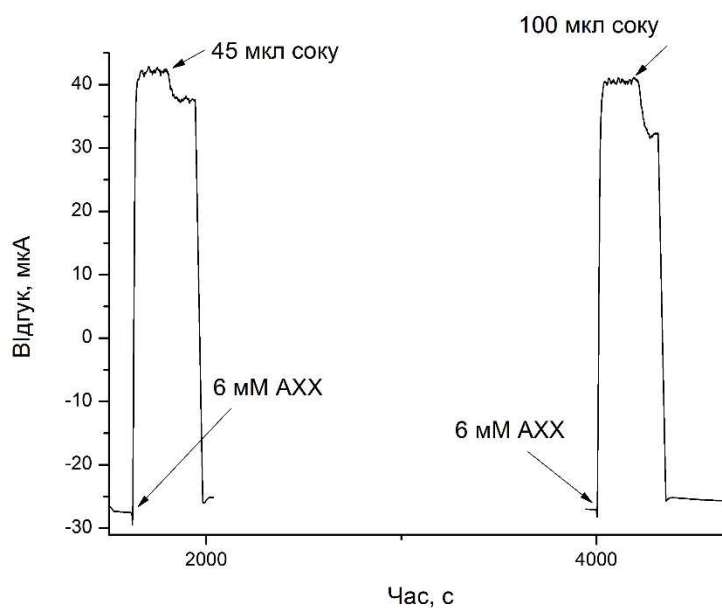


Рисунок 4.32 – Відгуки біосенсора на додавання 6 мМ АцХХ та різних об'ємів соку культури тканин раувольфії зміїної

Далі було визначено залежність рівня інгібування від об'єму зразка раувольфії, що додається. В експериментальну комірку спочатку вносили субстрат, чекали виходу сигналу на плато та вимірювали його величину. Після стабілізації сигналу в комірку вносили сік раувольфії об'ємом від 5 мкл до 180 мкл, кожен раз виконували відмивку буферним розчином, після чого від 200 мкл до 500 мкл робили виміри без відмивання буферним розчином (метод "драбинкою"). За отриманими даними була побудована залежність рівня інгібування від концентрації даного інгібітора, яка представлена на рис. 4.33.

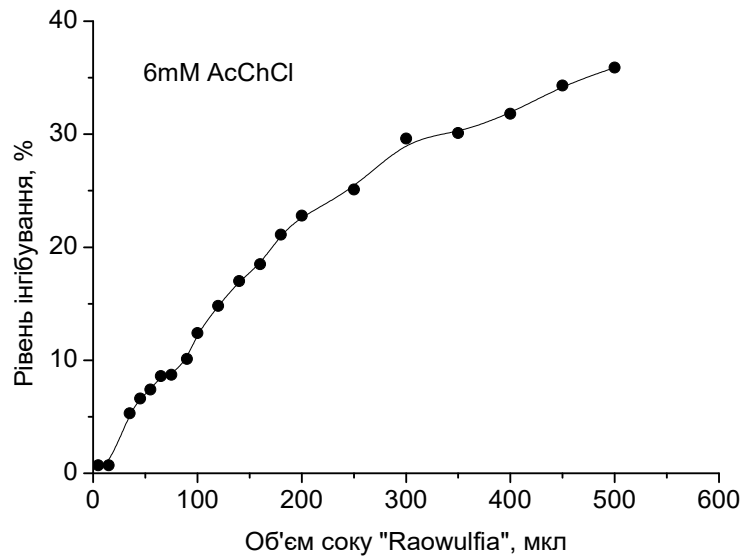


Рисунок 4.33 – Залежність рівня інгібування від об'єму соку раувольфії

З рис. 4.33 видно, що вже при об'ємі соку від 400 мкл рівень інгібування починає плавно виходити на плато і при подальшому додаванні соку змінюється повільніше.

Наступним етапом була проведена попередня перевірка можливості використання іншого ферменту - бутирилхолінестерази (БуХЕ) для створення біосенсора для оцінки вмісту індольних алкалоїдів. Для цього були іммобілізовані мембрани з 1% ферментом БуХЕ та проведена калібровка біосенсорів за субстратом бутирилхолін хлоридом (БуХХ), яка представлена на рис. 4.34.

Далі було перевірено, на якій концентрації субстрату БуХХ найкраще відбувається інгібування соком раувольфії. Оптимальною концентрацією для роботи з БуХЕ сенсором є 1 мМ БуХХ. Також при використанні БуХЕ біосенсора ми отримуємо більш високу чутливість до індольних алкалоїдів, що містяться в соку раувольфії. Наприклад, рівень інгібування 50 мкл соку на 1 мМ субстрату досягає 37%, в той час як рівень інгібування АцХЕ мембрани 50 мкл соку раувольфії не перевищує 6-7% для будь-якої концентрації субстрату.

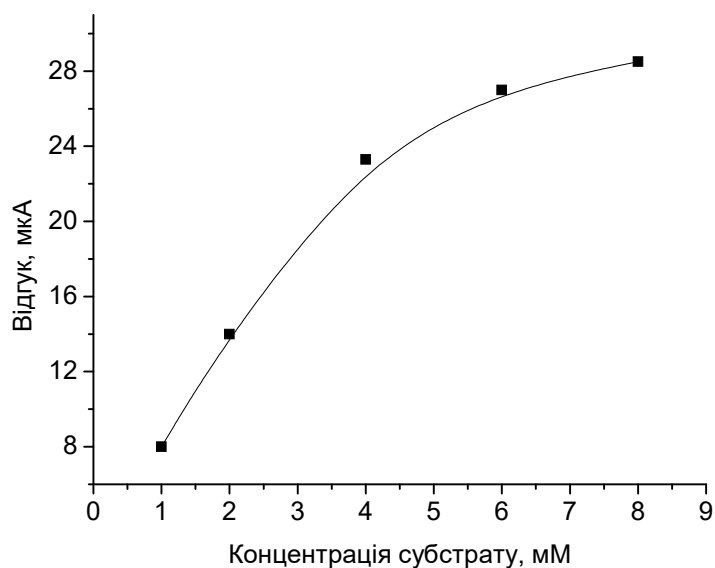


Рисунок 4.34 – Калібрувальна крива для біосенсора на основі БуХЕ, отримана "драбинкою"

Далі було визначено залежність рівня інгібування від об'єму зразка, що додається, тобто від кінцевої концентрації індольних алкалоїдів в ньому. Виміри проводилися таким же чином, як і з АцХЕ сенсором. Залежність рівня інгібування від об'єму представлена на рис. 4.35.

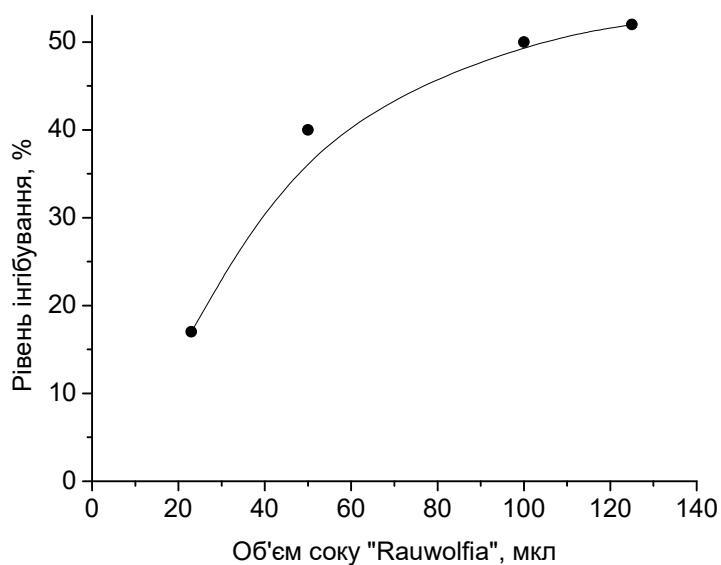


Рисунок 4.35 – Залежність рівня інгібування від об'єму соку "Rauwolfia" для БуХЕ сенсору

З рисунка видно, що вже при концентрації соку від 100 мкл рівень інгібування починає виходити на плато і при подальшому додаванні соку майже не змінюється. Тобто при використанні БуХЕ в якості селективного елемента біосенсора ми з одного боку отримуємо збільшення чутливості до досліджуваних зразків, але з іншого боку бачимо зменшення лінійного (динамічного) діапазону роботи сенсора.

На рис. 4.36 наведено залежність рівня інгібування від концентрації аймаліну, який знаходиться в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної.

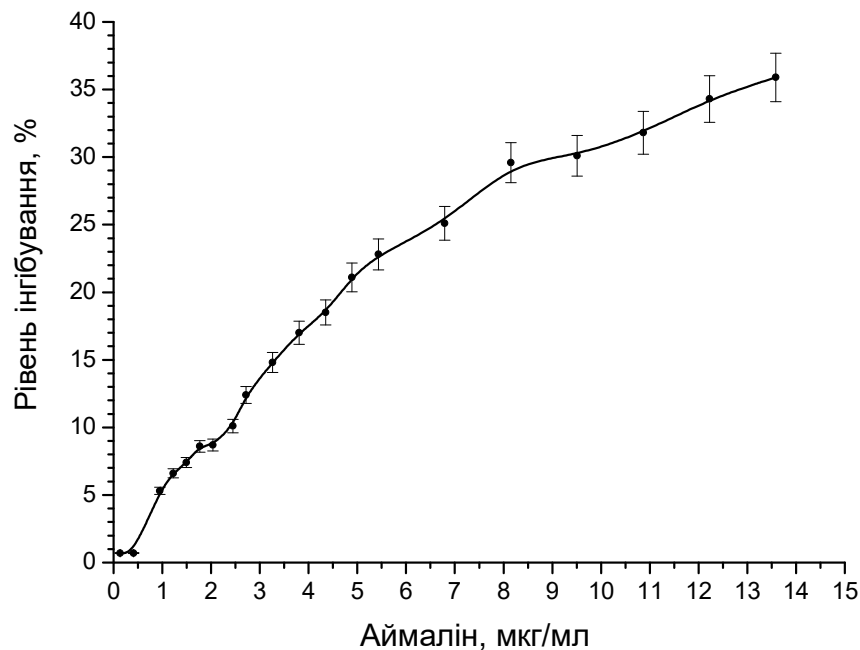


Рисунок 4.36 – Залежність рівня інгібування біосенсора на основі АцХЕ від концентрації аймаліну, який знаходиться в соці, отриманому із культури тканин раувольфії зміїної

Таким чином, можна зробити висновок, що біосенсори на основі холінестераз можна використовувати для аналізу вмісту індольних алкалоїдів. Більш того, варіюючи параметри біоселективного елемента - вибір ферменту АцХЕ або БуХЕ, процентний вміст ферменту в селективній мембрані, можна підбирати біосенсор з більш придатними робочими характеристиками (динамічний діапазон, чутливість). Біосенсори на основі БуХЕ володіють вищою чутливістю, а АцХЕ сенсори демонструють більш широкий динамічний діапазон роботи.

4.7 Висновки

Розроблено біосенсиори на основі холінестераз та створено їхні лабораторні прототипи для визначення пестицидів, глікалкалоїдів, афлатоксинів, поверхнево активних речовин та індольних алкалоїдів.

Хочеться наголосити, що розроблені біосенсиори не виступають проти традиційних аналітичних методів. Біосенсиори - це додаткова система швидкого та раннього попередження про наявність небезпечних речовин. Більш точні, але трудомісткі та дорогі традиційні методи можуть бути використані для подальшої валідації та додаткових досліджень зразків навколишнього середовища, попередньо випробуваних на масивах біосенсорів. Більше того, біосенсорні масиви можуть виступати як високоякісна аналітична система для екологічного скринінгу. Вони можуть забезпечити економію часу та витрат, з можливістю швидкого прийняття рішення щодо місцевих екологічних проблем.

4.8 Література

1. Chatonnet A, Lockrudge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* 1989;260(3):625–634.
2. Verscheuren K. Handbook of environmental data on organic chemicals. 2nd Ed. Van Norstrand Reinhold: New York; 1983. 673 p.
3. Sherma J, Zweig G. Pesticides. *Anal Chem.* 1983;55:57R.
4. Durand P, Nicaud JM, Mallevialle J. Detection of organophosphorous pesticides with an immobilized cholinesterase electrode. *J Anal Toxicol.* 1984;8:112–117.
5. Tranh-Minh C. Immobilized enzyme probes for determining inhibitors. *Ion-Selective Electrode Rev.* 1985;7:41–75.
6. Dzyadevich SV, Shul'ga AA, Soldatkin AP, Nyamsi Hendji AM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides. *Electroanalysis.* 1994;6:752–758.
7. Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Clechet P, Nyamsi Hendji AM, Shul'ga AA, Dzyadevich SV, Nechiporuk LI, Soldatkin AP. Comparison of two transduction

- modes for design of microbiosensors applicable to detection of pesticides. *Sens Materials*. 1996;8(3):161–167.
8. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, El'skaya AV, Soldatkin AP. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases. *Electroanalysis*. 2004;16:1873–1882.
 9. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;377:496–506.
 10. Simonian AL, Efremenko EN, Wild JR. Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples. *Anal Chim Acta*. 2001;444:179–186.
 11. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Jaffrezic H, Martelet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta*. 2001;55:919–927.
 12. Архипова ВН, Дзядевич СВ, Щувайло ОН, Солдаткин АП, Ельская АВ, Жафрезик-Рено Н, Жафрезик Г, Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа. *Biopolym Cell*. 2001;17(1):70–77.
 13. *FAO Production Yearbook*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1992; 46.
 14. Willard M. Potato processing: past, present and future. *Am Potato J*. 1993;70:405–418.
 15. Ripakh LA, Kim A. Case of mass poisoning by solanine. *Sovetskaia Meditsina*. 1968;22:129–131.
 16. McMillan M, Thompson JC. An outbreak of suspected solanine poisoning in schoolboys: examination of criteria of solanine poisoning. *Quat J Med*. 1979;48:227–243.
 17. Orgell WH, Vaidya KA, Dahm PA. Inhibition of human plasma cholinesterase in vitro by extracts of solanaceous plants. *Science*. 1958;128:1136–1137.

18. Bushway RJ, Savage SA, Ferguson BS. Inhibition of acetyl cholinesterase by solanaceous glycoalkaloids and alkaloids. *Am Potato J.* 1987;64:409–413.
19. Roddick JG. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochemistry.* 1989;28:2631–2634.
20. Coxon DT. Methodology for glycoalkaloid analysis. *Am Potato J.* 1984;61:169–183.
21. Friedman M, McDonald G. Potato Glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit Rev Plant Sci.* 1997;16:55–132.
22. Clement E, Verbist JF. Determination of solanine in *Solanum tuberosum* L. tubers: comparative study of 9 colorimetric methods. *Lebensm-Wissen U Technol.* 1980;13:202–206.
23. Ferreira F, Moyna P, Soule S, Vazquez A. Rapid determination of *Solanum* glycoalkaloids by thin-layer chromatographic scanning. *J Chromatogr.* 1993;653:380–384.
24. Herb SF, Fitzpatrick TJ, Osman SF. Separation of potato glycoalkaloids by gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 1975;23:520–523.
25. Jonker HH, Koops AJ, HoogenDoorn JC. A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC. *Potato Res.* 1992;35:451–455.
26. Crabbe PG, Fryer C. Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and solasodiene by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1980;187:87–100.
27. Houben RJ, Brunt K. Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1994;661:169–174.
28. Morgan MRA, McNerney R, Coxon DT, Chan HW-S. An enzyme-linked immunosorbent assay for total glycoalkaloids in potato tubers. *J Sci Food Agric.* 1983;34:593–598.
29. Krasowski MD. Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. *Can J Anaesth.* 1997;44:525–534.

30. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistor and cholinesterase for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosensors Bioelectron.* 2003;18:1047–1053.
31. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors Bioelectron.* 2001;16:121–131.
32. Trevan MD. Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons; 1980. 138 p.
33. Imato T, Ishibashi N. Potentiometric butyrylcholine sensor for organophosphate pesticides. *Biosensors Bioelectron.* 1995;10:435–441.
34. McKee R. Factors affecting the toxicity of solanine and related alkaloids to *Fusarium caeruleum*. *J Gen Microbiol.* 1959;20:686–696.
35. Roddick JG, Rijnenberg AL. Effect of steroidal glycoalkaloids of potato on the permeability of liposome membranes. *Phisiol Plantarum.* 1986;68:436–440.
36. Dzyadevich SV, KorpanYI, Arkhipova VN, Alesina MY, Martelet C, El'skaya AV, Soldatkin AP. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum. *Biosensors Bioelectron.* 1999;14:283–287.
37. Shivender SS, Anupreet K. Aflatoxin B1: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review. *Global Advanced Research Journal of Chemistry and Material Science.* 2012;1(4):063–070.
38. Rejeb IB, Arduini F, Arvinte A, Amine A, Gargouri M, Micheli L, Bala C, Moscone D, Palleschi G. Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil. *Biosensors Bioelectron.* 2009;24:1962–1968.
39. Ren M, Xu H, Huang X, Kuang M, Xiong Y, Xu Y, Xu Y, Chen H, Wang A. Immunochromatographic Assay for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 in Maize by Highly Luminescent Quantum Dot Beads. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6:14215–14222.

40. Guo X, Wen F, Zheng N, Luo Q, Wang H, Wang H, Li S, Wang J. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B1. *Biosensors Bioelectron.* 2014;56:340–344.
41. Var I, Kabak B, Gok F. Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control.* 2007;18:59–62.
42. Shakir KW, Wejdan K, Bahruddin S, ChewBee Y, NorHasani H, Abdussalam SalhinMohamed A, MuhammadIdiris S, Baharuddin S. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chemistry.* 2010;118:882–886.
43. Solfrizzo M, De Girolamo A, Lattanzio VMT, Visconti A, Stroka J, Alldrick A, Van Egmond HP. Results of a proficiency test for multi-mycotoxin determination in maize by using methods based on LC-MS/(MS). *Quality Assurance and Safety of crops & foods.* 2013;5(1):15–48.
44. Jiang W, Wang Z, Nölke G, Zhang J, Niu L, Shen J. Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Food Anal Methods.* 2012;6(3):767–774.
45. Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартлє К, Солдаткін ОП. Дослідження взаємодії основних глікоалкалоїдів картоплі за інгібування ними іммобілізованої бутирилхолінестерази. *Укр Біохим журнал.* 2006;78(5):138–144.
46. Taranova L, Semenchuk I, Manolov T, Ilyasov P, Reshetilov A. Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants. *Biosensors Bioelectron.* 2002;1:635–640.
47. Perez L, Pinazo A, Garcia MT, Lozano M, Manresa A, Angelet M, Infante MR. Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2009;44:1884–1892.
48. Seki A, Tokita K. Surfactant cytotoxicity assay based on a silicon transducer. *Chemosphere.* 2009;76:341–344.
49. Taranova L A, Fesay A P, Ivashchenko G V, Reshetilov A N, Winther-Nielsen M, Emneus J. Comamonas testosteroni strain TI as a potential base for a microbial

- sensor detecting surfactants. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004;40:404–408.
50. Madunić-Čačić D, Sak-Bosnar M, Galović O, Sakac N, Matesic-Puac R. Determination of cationic surfactants in pharmaceutical disinfectants using a new sensitive potentiometric sensor. *Talanta*. 2008;76:259–264.
51. Merino F, Rubio S, Perez-Bendito D. Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*. 2003;998:143–154.
52. Nomura Y, Ikebukuro K, Yokoyama K, Takeuchi T, Arikawa Y, Ohno S, Karube I. Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring. *Biosensors Bioelectron*. 1998;13:1047–1053.
53. Reshetilov A, Semenchuk I, Iliasov P, Taranova L. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate. *Analytica Chimica Acta*. 1997;347:19–26.
54. Кнунянц ИЛ. Индольные алкалоиды. *Химическая энциклопедия*. Москва: Советская энциклопедия; 1988. 623 с.
55. Dewick PM. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Second Edition.- New Jersey: Wiley; 2002. 356 p.
56. Белоусова ЛС, Денисова ЛВ. *Редкие растения мира*. Москва: Лесная промышленность; 1983. 344 с.
57. Кунах В А. *Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого–біохімічні основи*. Київ: Логос; 2005. 730 с.
58. Panwar GS, Guru SK. Alkaloid profiling and estimation of reserpine in *Rauwolfia serpentina* plant by TLC, HP-TLC and HPL. *Asian Journal of Plant Science*. 2011;10(8):393–400.

РОЗДІЛ 5

ЗАСТОСУВАННЯ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ХОЛІНЕСТЕРАЗ ДЛЯ АНАЛІЗУ РЕАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

5.1 Вступ

Після розробці біосенсорів на основі холінестераз та створення відповідних лабораторних прототипів, виникає питання аналітичного застосування останніх для роботи з реальними зразками. Більшість дослідників досить часто показують лише принципову можливість створення відповідного біосенсора без його застосування для аналізу реальних біологічних зразків. Це, перш за все, пов'язано з тим, що останній етап розробки, який присвячено саме апробації біосенсорів, є дуже громіздким. Тому в подальшому, при спробі виробництва та налагодження промислових зразків аналізаторів, виникають проблеми, пов'язані з їхнім застосуванням в реальних умовах. Вирішення цих проблем може призвести до суттєвих змін конструкції біосенсора, додаткових фінансових затрат, збільшення часу впровадження, а іноді ці проблеми взагалі унеможливають виробництво комерційного продукту. Таким чином, ключовим етапом розробки приладів є успішна апробація запропонованого лабораторного прототипу біосенсора для роботи з реальними зразками, які містять необхідну цільову речовину.

Тому обов'язковим та дуже важливим етапом роботи була демонстрація можливості аналізу реальних зразків з використанням розроблених електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз та валідація отриманих результатів з даними традиційних методів визначення.

5.2 Застосування біосенсора на основі бутирилхолінестерази для визначення глікоалкалоїдів в зразках картоплі та томатів

5.2.1 Вступ

Вперше глікоалкалоїди були ідентифіковані в картоплі ще в XIX столітті Баупом [1], а інформація про їх властивості з точки зору фізіології, біохімії, хімії, токсикології і розподілу стала відомою дещо пізніше [2, 3]. Початковий рівень

загального вмісту глікоалкалоїдів в картоплі є генетично обумовленим і суттєво відрізняється залежно від сортів картоплі та місцевості вирощування. Є всі підстави вважати, що алкалоїди причетні до ряду механізмів опору картоплі до хвороб та дії комах. Комерційні сорти картоплі, які споживаються в Європі і США, містять близько 20 – 250 мг глікоалкалоїдів на 1 кг неочищених клубнів. Різноманітні фактори – такі як річні й регіональні варіації температури, механічні пошкодження під час збирання і зберігання картоплі, вплив світла (позеленіння картоплі) – можуть призводити до суттєвого підвищення первинної концентрації глікоалкалоїдів, наприклад в зеленій чи інфікованій картоплі рівень глікоалкалоїдів може зростати до 5000 мг на 1 кг неочищених клубнів [2, 4].

Глікоалкалоїд, відомий як томатин, вперше був ізольований Фонтеном та ін. [5]. Він є менш токсичним у порівнянні соланіном та чаконіном. В молодих зелених томатах його вміст підчас сягає до 500 мг на 1 кг свіжої ваги. При визріванні рівень томатину зменшується і для зрілих червоних томатів може бути близько 5 мг на 1 кг свіжої ваги. Тому споживання зелених томатів, червоних томатів з високим вмістом томатину та продуктів, виготовлених з зелених томатів, може призвести до отримання організмом високої кількості томатину [6-8].

Процедура аналізу глікоалкалоїдів є досить непростим завданням. Вона складається з трьох складних етапів: (1) екстракція всіх цікавих компонентів; (2) вилучення в разі необхідності речовин, що можуть заважати проведенню аналізу; (3) безпосереднє визначення концентрації глікоалкалоїдів [2, 9]. Екстракційні розчинники можуть бути неводними, кислими або комбінованими.

Сучасні методи визначення в картоплі та томатах глікоалкалоїдів і пов'язаних з ними компонентів включають: (1) колориметрію [10], (2) тонкошарову хроматографію [11], (3) газову хроматографію [12], (4) високоефективну рідинну хроматографію (HPLC) [13-15], (5) імунотести (ELISA) [16]. Всі ці методи є складними, потребують дорогого і громіздкого обладнання, є енергомісткими і потребують висококваліфікованих операторів.

Часом оптимізація аналітичного процесу може спричиняти неочікувані труднощі. Так, ефективніший екстракційний розчинник для глікоалкалоїдів може

привнести з собою нові сполуки, що спотворюють результати, а отже – вимагають додаткових очисних заходів. З іншого боку, більш селективні розчинники можуть бути не досить ефективними в екстракції глікоалкалоїдів. На сьогодні не існує “ідеального” методу визначення глікоалкалоїдів, придатного для всіх типів зразків, і аналітики кожен раз повинні пристосовуватись до специфічних обмежень у кожному конкретному випадку.

Тому в даному підрозділі викладено результати вивчення можливості використання розроблених біосенсорів для аналізу реальних зразків картоплі та томатів без їхньої попередньої обробки.

5.2.2 Розробка вимірювальних протоколів аналізу глікоалкалоїдів у зразках різних сільськогосподарських культур

Для проведення аналізу складу глікоалкалоїдів в картоплі було запропоновано два протоколи проведення вимірювань (рис. 5.1).

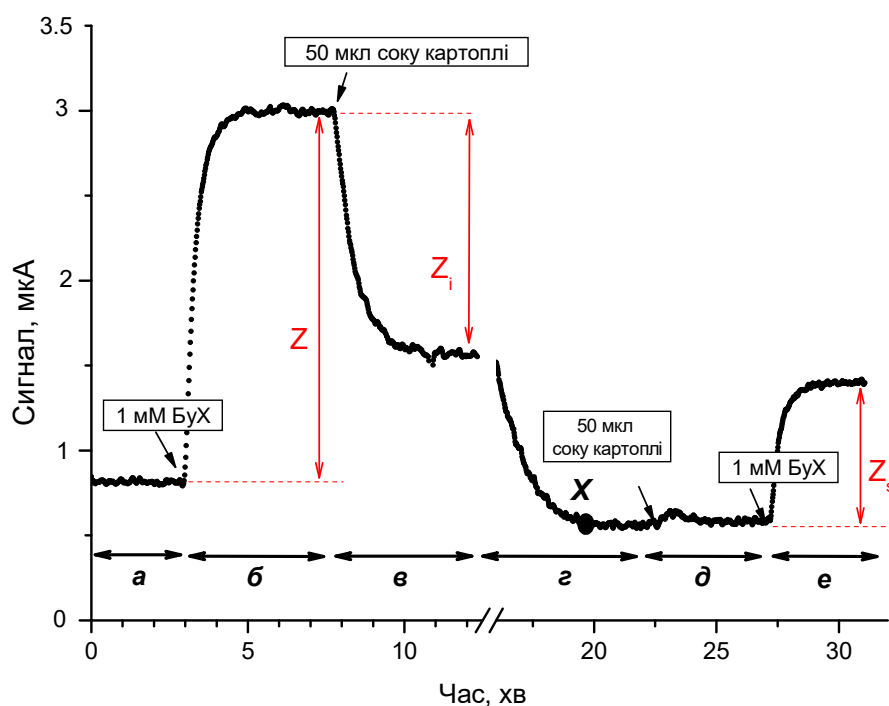


Рисунок 5.1 – Сигнал біосенсора та його відповідь на внесення 1 мМ БуХ та зразку соку картоплі в експериментальну комірку. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5

В першому варіанті ступінь інактивації ензиму (а, відповідно, концентрації глікоалкалоїдів в пробі) визначали наступним чином.

1. Сенсор занурювали в 5 мМ калій-фосфатний буферний розчин, рН 7,5, та реєстрували базовий сигнал (ділянка *a*).
2. Отримували відгук на додавання 1 мМ бутирилхолінхлориду (ділянка *б*). Це відгук умовно позначений рівнем Z .
3. Після стабілізації відгуку на додавання субстрату (вихід сигналу на плато), додавали 50 мкл соку картоплі та отримували зменшення сигналу сенсора (ділянка *в*). Цей відгук умовно позначений рівнем Z_i та відповідає складу глікоалкалоїдів в зразку.
4. Співвідношення величини відгуку на додавання проби соку картоплі та відгуку на додавання субстрату – Z_i/Z – відповідає рівню інгібування іммобілізованого ферменту глікоалкалоїдами, що є в картопляному соці.
5. Сенсор відмивали від залишків субстрата та інгібітора у буферному розчині до рівня базової лінії (ділянка *г*).
6. Наступні вимірювання проводили, починаючи з п.2, міняючи об'єм досліджуваного зразка чи зразок.

В другому варіанті визначення глікоалкалоїдів порядок вимірювань був дещо іншим.

1. Сенсор занурювали в 5 мМ калій-фосфатний буферний розчин, рН 7,5, та реєстрували базовий сигнал (ділянка *a*).
2. Отримували відгук на додавання 1 мМ бутирилхолінхлориду (ділянка *б*). Це відгук умовно позначений рівнем Z .
3. Сенсор відмивали від залишків субстрату у буферному розчині до рівня базової лінії (ділянка *г*).
4. В комірку додавали 50 мкл соку картоплі та датчик витримували 1-2 хв. (ділянка *д*).

5. Після стабілізації сигналу додавали 1 мМ бутирилхолінхлориду і отримували відгук (ділянка *e*). Цей відгук умовно позначений рівнем Z_s та відповідає залишковій активності іммобілізованого фермента.
6. Рівень інгібування визначали по співвідношенню відгуків на субстрат в присутності зразка соку картоплі і без нього $(Z-Z_s)/Z$.
7. Сенсор відмивали від залишків субстрата та інгібітора у буферному розчині до рівня базової лінії.
8. Наступні вимірювання проводили, починаючи з п.4, міняючи об'єм досліджуваного зразка чи зразок.

Добре видно, що кінцевий результат інгібування співпадає для обох випадків, але при використанні другого метода час аналізу зменшується практично вдвічі, тому що було показано раніше, що інактивація бутирилхолінестерази глікоалкалоїдами не залежить від часу інгібування [17].

Перша процедура припускає більш довгий, але більш ретельний аналіз, так як кожен раз при отриманні відгуку на субстрат відбувається контроль функціонування біосенсора, а також постійне його підкалібрування. Друга процедура дозволяє провести моніторинг цілого ряду зразків підряд, періодично виконуючи контрольні вимірювання відгуку на додавання субстрата, що значно прискорює аналіз при необхідності масового скринінгу. Для лабораторних цілей краще використовувати перший протокол вимірювань, тому що при цьому ми отримуємо точний результат за рахунок постійного підкалібрування датчика.

В літературі наведено понад 20 різних розчинників, що використовуються для екстракції глікоалкалоїдів, наприклад, етанол [18], 5 % оцтова кислота [19], суміш метанолу з водою та оцтовою кислотою (94:6:1) [13], суміш метанолу з хлороформом (2:1) [20], інші. Зразок з глікоалкалоїдами часто очищують осадженням з використанням гідроксиду амонію [21], екстракцією за допомогою водних розчинів Na_2SO_4 [20] або водонасиченого бутанолу [14] чи з використанням хроматографічного C_{18} іон-обмінного картриджу [15]. Можливе також комбінування всіх цих методів. Після застосування такої складної препідготовки зразків, що займає близько доби, пробу можна аналізувати за допомогою

стандартних методів, а саме тонкошаровою хроматографією чи високоефективною рідинною хроматографією.

Було проведено серію експериментів, застосовуючи різні варіанти попередньої препідготовки зразків картоплі для наступного її аналізу, використовуючи біосенсор. Досліджували інгібування іммобілізованої БуХЕ соком картоплі сорту «Промінь» при додаванні його в вимірювальну комірку без додаткових маніпуляцій та при центрифугуванні зразка на різних швидкостях протягом різного часу. Також досліджувався вплив оцтової кислоти на величину відгуку біосенсора, тому що вона часто застосовується як розчинник для глікоалкалоїдів, та використовується у великих кількостях для їх екстракції із клубнів картоплі при процедурі препідготовки проб для аналізу традиційними методами. Під час досліджень було підібрано таку концентрацію оцтової кислоти, що не впливає на відгук сенсора, але сприяє кращій екстракції глікоалкалоїдів. Як видно з рис. 5.2, центрифугування дещо зменшує інгібіторний ефект соку картоплі, тому що частина неконтрольованої кількості глікоалкалоїдів залишається в осаді. Додавання оцтової кислоти стабілізує відгуки біосенсора на додавання проб соку картоплі за рахунок кращої екстракції глікоалкалоїдів, а центрифугування при цьому дозволяє уникнути можливого впливу на мембрану крупних механічних часток картоплі, крохмалю, тощо. У подальших вимірюваннях при підготовці зразків соку до аналізу ми використовували додавання в пробу оцтової кислоти до кінцевої концентрації в комірці 5 мМ та центрифугували зразок на протязі 10 хвилин при 10 000 об/хв (на діаграмі відповідає стовпчику 2Б). Однак в разі запровадження біосенсорів для масового скринінгу глікоалкалоїдів в картоплі немає жодної потреби у попередній обробці зразків.

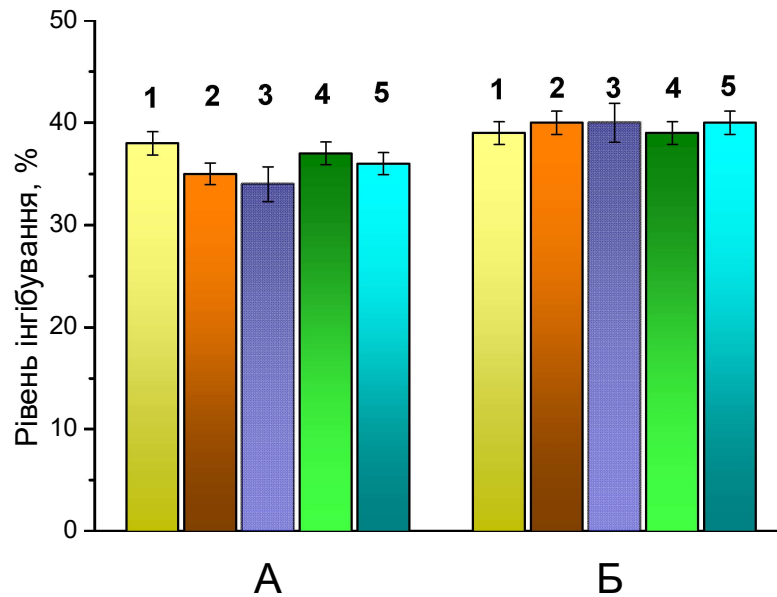


Рисунок 5.2 – Інгібування іммобілізованої БуХЕ зразками соку картоплі без (А) та з додаванням 5 мМ оцтової кислоти (Б). Свіжий сік (1), сік після центрифугування: 10 хв при 10 000 об/хв (2), 20 хв при 10 000 об/хв (3), 10 хв при 5 000 об/хв (4), 10 хв при 2 000 об/хв (5). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері з рН 7,5, концентрація субстрату - 1 мМ

Із літературних джерел відомо, що генетично зумовлений склад глікоалкалоїдів може збільшуватись при зберіганні, транспортуванні та механічних пошкодженнях зібраного врожаю. Тому при відпрацюванні процедури аналізу було важливо дослідити, чи впливають ці фактори на весь врожай в цілому, чи по різному на окремі клубні. Тому досліджували рівень інгібування іммобілізованої БуХЕ в складі сенсора соком, отриманим з різних клубнів одного сорту картоплі. На рис. 5.3 представлено результати, що демонструють, що в середньому вміст глікоалкалоїдів в клубнях одного сорту співпадає, але інколи мають місце випадіння. Інколи концентрація алкалоїдів в одних і тих же сортах збільшується в 1,5-2 рази, що зумовлено, скоріш за все, зовнішніми факторами. Тому для мінімізації експериментального розкиду відгуків, викликаного вказаними вище зовнішніми факторами, у подальшому при отриманні соку для аналізу для гомогенізації використовували мінімум 5 різних клубнів картоплі одного сорту.

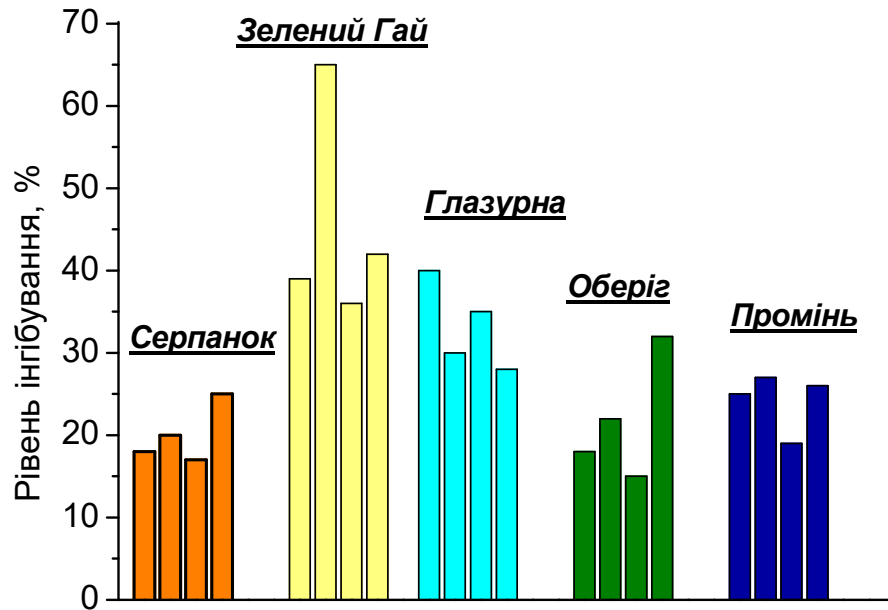


Рисунок 5.3 – Рівень інгібування іммобілізованої БуХЕ соком, що отриманий з окремих клубнів різних сортів картоплі.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері з рН 7,5, концентрація субстрату - 1 мМ

Наступним досліджували вплив на величину відгуку процедури очищення клубнів картоплі від шкірки при підготовці її до аналізу. На рис. 5.4 добре видно, що очищення картоплі від шкірки призводить до практично двократного зменшення рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ в склвді сенсора, що співпадає з літературними даними [3] та свідчить про те, що при вживанні картоплі у їжу необхідно добре очищати її від шкірки. Крім того, було також показано різницю впливу чищення клубнів на величину інгібування для різних сортів картоплі. В сортах картоплі з високою кількістю глікоалкалоїдів вплив очищення клубнів був дещо меншим ніж в сортах з малим вмістом глікоалкалоїдів. Однак для масового скринінгу алкалоїдів в карьоплі краще проводити аналіз без додаткової процедури очищення клубнів, але при цьому необхідно враховувати, що результат буде завищено приблизно вдвічі.

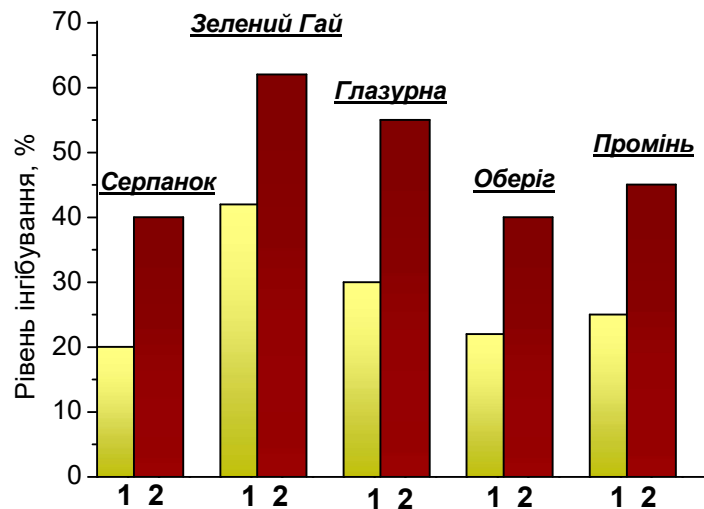


Рисунок 5.4 – Рівень інгібування БуХЕ соком картоплі різних сортів при використанні клубнів після очищення (1) та зі шкіркою (2).

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері з рН 7,5, концентрація субстрату - 1 мМ

Наступним досліджували зміни відгуку біосенсора на додавання соку при зберіганні підготовлених для аналізу зразків. Порівнювали ступінь інгібування іммобілізованої БуХЕ в складі сенсора за різних умов зберігання соків для трьох сортів картоплі. Підготовлені для аналізу проби зберігали щільно закритими за кімнатної температури, в холодильнику при температурі +4°C та при заморожуванні проби до -18°C.

Із приведених на рис. 5.5 кривих добре видно, що на 2-3 день зберігання проби за кімнатної температури спостерігається суттєве збільшення ступеня інгібування БуХЕ. При зберіганні в холодильнику та при заморожуванні соків такого підсилення токсичного ефекту не відбувається. Це дозволяє зробити висновок, що можливе підсилення інгібування ферменту відбувається за рахунок появи в зразках соків додаткових токсичних речовин, що утворюються в процесі бродіння та гноїння, які відбуваються за кімнатної температури. При зберіганні проб за температури + 4°C деяке збільшення ступеня інгібування БуХЕ відбувається через 5-7 днів зберігання. При заморожуванні соків можливо їх довготривале зберігання без суттєвих змін токсичності зразків. В той же час, при

проведенні аналізу протягом доби суттєвих змін в токсичності соків картоплі не спостерігалось незалежно як від умов їхнього зберігання, так і сорту картоплі (рис. 5.6).

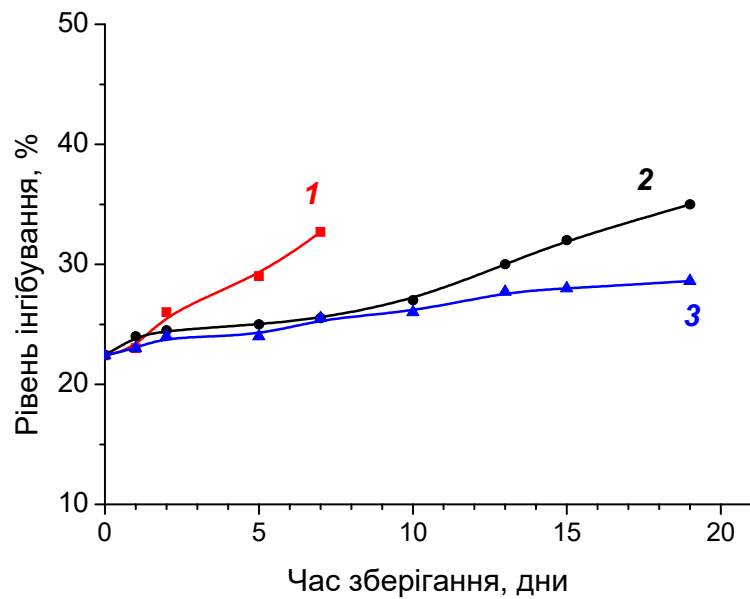


Рисунок 5.5 – Залежність рівня інгібування БУХЕ соком картоплі при зберіганні його при кімнатній температурі (1), температурі +4°C (2) та -18°C (3)

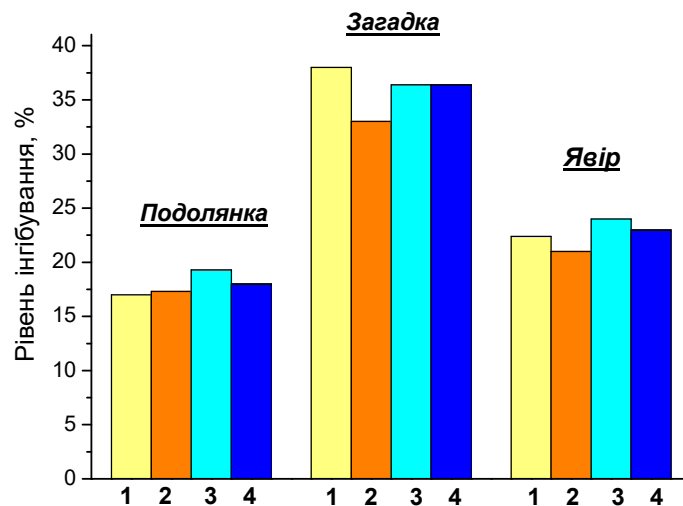


Рисунок 5.6 – Рівень інгібування БУХЕ соком картоплі при зберіганні його в різних умовах протягом доби. 1 – свіжий сік, 2- зберігання при кімнатній температурі, 3- зберігання при t=+4°C, 4- зберігання при t=-18°C

Також було показано, що можливе довготривале зберігання готових для аналізу проб соку картоплі. Експеримент проводили протягом двох років (рис.5.7). В цілому спостерігалась достатньо висока кореляція результатів вимірювань.

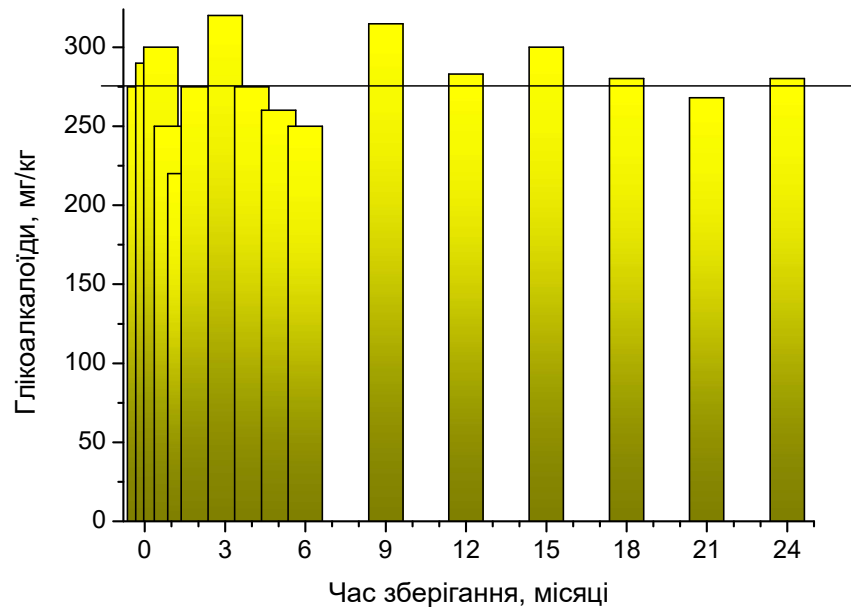


Рисунок 5.7 – Результати визначення концентрації глікоалкалоїдів в замороженому соці картоплі сорту «Серпанок». Виміри проводилися протягом 2 років

На рис. 5.8 представлено калібрувальні криві для визначення глікоалкалоїдів при різних співвідношеннях α -соланіну та α -чаконіну. Як відомо, α -соланін і α -чаконін складають 95 % загального вмісту глікоалкалоїдів в картоплі, інші види глікоалкалоїдів наявні лише в слідових кількостях. З іншого боку, немає великого сенсу розглядати токсичність окремих глікоалкалоїдів, оскільки в реальних клубнях картоплі глікоалкалоїди існують завжди в комбінації. Організм людини при цьому піддається спільній дії всіх глікоалкалоїдів, тому необхідно оцінювати загальну кількість глікоалкалоїдів в зразках картоплі. Найбільш часто зустрічається співвідношення між α -соланіном та α -чаконіном в картоплі 6:4, хоча можливі також інші варіанти (5:5 та 7:3).

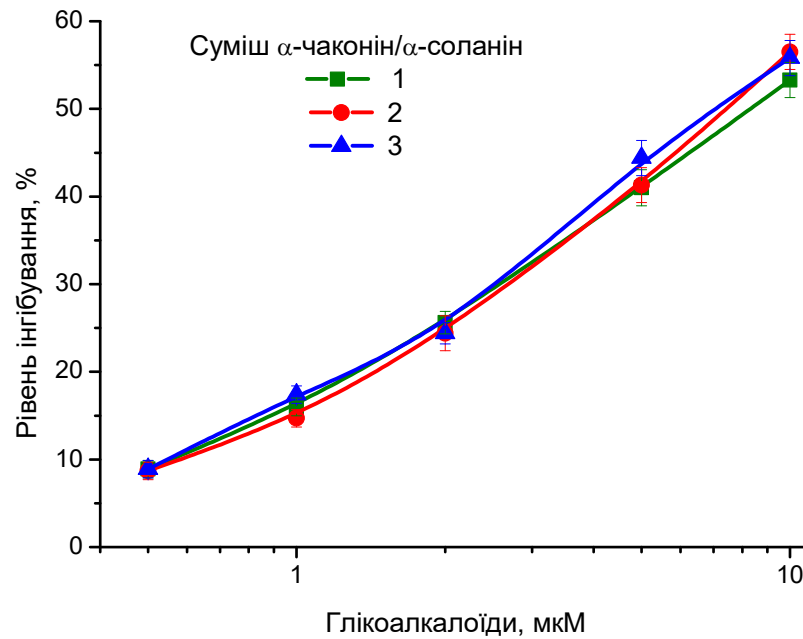


Рисунок 5.8 – Калібрувальні криві для визначення глікоалкалоїдів при різних співвідношеннях α -чаконіну та α -соланіну: 4:6 (1), 5:5 (2), 3:7 (3).

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері з рН 7,5,
концентрація субстрату - 1 мМ

Оскільки наведені на рис. 5.8 криві відрізняються незначним чином, співвідношення α -чаконіну до α -соланіну як 4:6, що найбільш часто зустрічається в природі, використовувалось у наступних дослідженнях для калібрування сенсора та подальшого визначення загальної концентрації глікоалкалоїдів в картопляному соці.

5.2.3 Вимірювання глікоалкалоїдів в різних сортах картоплі

Картоплю різних сортів вирощували на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Boigneville, Франція). Ці експериментальні сорти (*Elkana*, *Monalisa*, *Pompadour*, *Starter*, *Pollux*, *Roseval*, *Phoebus*, *Venus*, *Charlotte*, *Redlaure*, *Voyager*, *Daifla*, *Albane*, *Lucie*, *Epona*, *Virginia*, *Hinga*, *Kaptah V*, *91 F220 9*, *209*, *309*, *204*, *310*, *303*, *207*, *201*, *308*, *306*, *302*) і два комерційні сорти (*Caesar* and *Agata*), в яких основну частину глікоалкалоїдів складають α -соланін і α -чаконін, використовували для проведення аналізів.

Контрольні вимірювання вмісту глікоалкалоїдів картоплі проводили за методом HPLC [22, 23]. Клубні картоплі мили, сушили, гомогенізували, потім глікоалкалоїди екстрагували за допомогою оцтової кислоти. Екстракти концентрували і очищали за допомогою Sep-Pack® Plus C₁₈ картриджу. Сепарацію і кількісне визначення α -чаконіну і α -соланіну виконували на Zorbax Extend C₁₈ колонці (3,5мкм, 150×4,6 мм) при довжині хвилі 202 нм.

Отримані за допомогою біосенсора результати із загального вмісту глікоалкалоїдів в зразках картоплі з 31 різних експериментальних сортів у порівнянні з аналогічними даними аналізу за HPLC методом з попередньою складною обробкою зразків наведені на рис. 5.9.

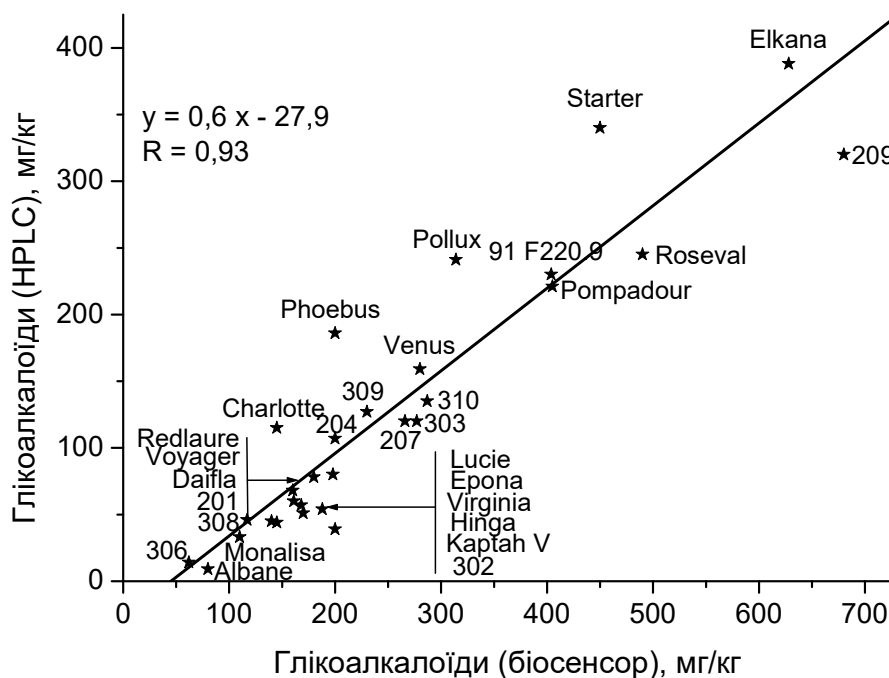


Рисунок 5.9 – Результати порівняльного аналізу вмісту глікоалкалоїдів в різних сортах картоплі, вирощеної на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Boigneville, Франція), отримані за допомогою розробленого біосенсора та HPLC

З рисунку видно добру кореляцію результатів. Деяка різниця в даних може бути пояснена, по-перше, різницею в процедурі підготовки зразків для різних

методик аналізу, що може внести систематичну похибку в один чи інший метод, а, по-друге, тим, що аналізи проводились в різних місцях та у різний час, що також може призвести до систематичних похибок.

Крім того, досліджували картоплю, виведену методом традиційної селекції співробітниками Інституту картоплярства УААН, з яких були ранні: (*Повінь, Серпанок, Дніпрянка, Загадка, Подолянка, Скарбниця, Глазурна, Святкова*), середньоранні (*Левада, Світанок кийвський, Зелений Гай, Оберіг, Забава*), середньостиглі (*Довіра, Билина, Слов'янка, Явір, Мандрівниця, Вернісаж*) та середньопізні (*Промінь, Червона Рута, Поліське джерело*) врожаю 2007 та 2008 років.

Результати біосенсорного визначення концентрації глікоалкалоїдів у вказаних зразках представлено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1 – Врожайність, крохмальність, час визрівання та загальна концентрація глікоалкалоїдів, отримана за допомогою біосенсора, для різних сортів картоплі

	Сорт	Концентрація глікоалкалоїдів, мг/кг картоплі		Визрівання	Крохмальність, %	Врожайність, ц/га
		Врожай 2007 р	Врожай 2008 р			
	1	2	3	4	5	6
1	<i>Завія</i>	-	120	II	-	-
2	<i>Тирас</i>	-	126	I	-	-
3	<i>Забава</i>	230	150	II	15	430
4	<i>Звіздаль</i>	-	150	III	-	-
5	<i>Подолянка</i>	220	160	I	14,5	430
6	<i>Водограй</i>	-	175	II	-	-
7	<i>Оберіг</i>	230	180	II	14	480
8	<i>Калинівська</i>	-	180	III	-	-

	1	2	3	4	5	6
9	<i>Дорогінь</i>	-	200	IV	-	-
10	<i>Поліська Ювілейна</i>	-	206	IV	-	-
11	<i>Дніпрянка</i>	200	215	I	14,5	430
12	<i>Левада</i>	280	230	II	17,5	440
13	<i>Луговська</i>	-	230	III	-	-
14	<i>Явір</i>	180	238	III	17,5	475
15	<i>Загадка</i>	315	270	I	13,5	410
16	<i>Серпанок</i>	275	290	I	13,5	460
17	<i>Слов'янка</i>	265	300	III	13,5	500
18	<i>Поліське джерело</i>	350	300	IV	16,5	450
19	<i>Червона Рута</i>	370	330	IV	19,5	455
20	<i>Промінь</i>	280	335	IV	15,5	465
21	<i>Скарбниця</i>	440	400	I	14	455
22	<i>Глазурная</i>	465	430	I	14,5	465
23	<i>Довіра</i>	370	450	III	17	440
24	<i>Повінь</i>	410	450	I	15,5	455
25	<i>Щедрик</i>	-	450	I	-	-
26	<i>Ракурс</i>	-	480	IV	-	-
27	<i>Зелений гай</i>	530	500	II	14	460
28	<i>Світанок київський</i>	510	650	II	19	420
29	<i>Мандрівниця</i>	715	670	III	17	440
30	<i>Билина</i>	1400	1000	III	15,5	445
31	<i>Святкова</i>	270	-	I	14,5	465
32	<i>Вернисаж</i>	225	-	III	15	450

I – Ранній II – Середньоранній III – Середньо-зрілий IV – Середньопізній

Також аналізували інші властивості картоплі, а саме: врожайність, крохмальність, час визрівання. З даних таблиці слідує, що не дивлячись на всі зовнішні та внутрішні фактори, основним фактором є генетично визначена кількість глікоалкалоїдів в кожному сорті.

З даних таблиці слідує, що не дивлячись на всі зовнішні та внутрішні фактори, основним фактором є генетично визначена кількість глікоалкалоїдів в кожному сорті.

5.2.4 Застосування біосенсорів для дослідження картоплі

Глікоалкалоїди було знайдено майже в усіх частинах картоплі. Було показано різницю між рівнем глікоалкалоїдів в різних частинах клубнів. Наприклад, загальний вміст глікоалкалоїдів в картоплі зі шкуркою сорту *Забавка* складав до 224 мг/кг свіжої ваги, а в тілі самих клубнів без шкіри він становив 126 мг/кг. Рис. 5.10 демонструє розподіл загального складу глікоалкалоїдів в різних частинах картоплі сорту *Producent Rubempré*, вирощеної на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Франція) та отриманий за допомогою біосенсора. Такий аналіз вмісту глікоалкалоїдів в різних частинах клубнів картоплі був можливий лише за допомогою біосенсора, оскільки лише 10 мкл соку картоплі було достатньо для одного аналізу.

З рисунку видно, що глікоалкалоїди в картоплі концентруються в тонкому шарі прямо під шкіркою. Також було показано, що концентрація глікоалкалоїдів в області біля очок приблизно в 2-3 рази більша за таку ж в області клубня поза очками. Ці результати добре співвідносяться з даними, отриманими іншими авторами [4]. При звичайній стандартній формі клубнів картоплі процедура її очищення призводить до зниження вмісту глікоалкалоїдів на 60 – 96 % від їх загального змісту разом зі шкіркою.

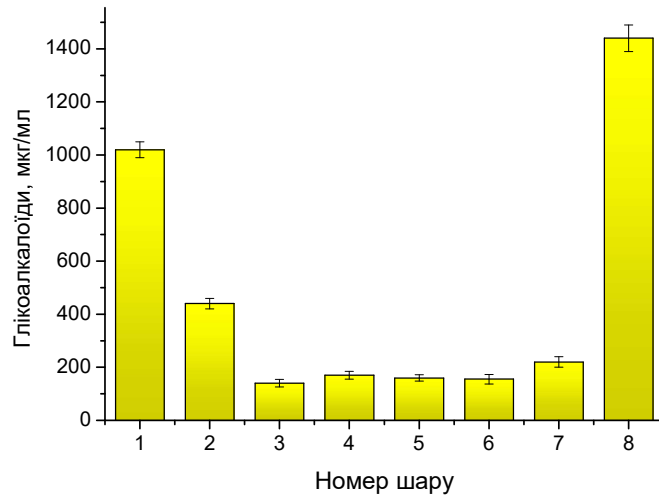


Рисунок 5.10 – Градієнт загального вмісту глікоалкалоїдів в картоплі сорту *Producent Rubempré*, отриманий за допомогою біосенсора. Шари товщиною 3 мм були підготовлені нарізкою у напрямку від шкірки до шкірки (зразки з 1 по 8)

Вищі концентрації глікоалкалоїдів в шкірці, можливо, є відповідальними за те, що картоплини меншого розміру і раннього досягання є багатшими на глікоалкалоїди, ніж великі клубні [24, 25]. Рис. 5.11 демонструє результати аналізу вмісту глікоалкалоїдів в картоплі різного розміру.

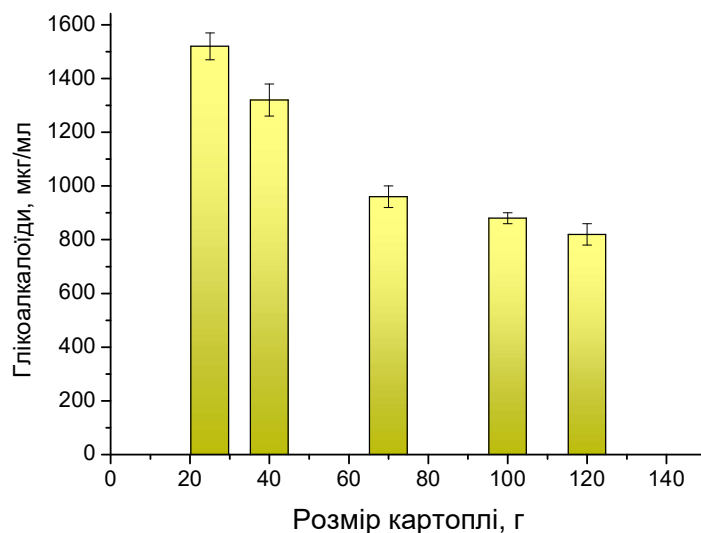


Рисунок 5.11 – Залежність загального вмісту глікоалкалоїдів в клубнях картоплі сорту *Producent Rubempré* від її розміру, отримана за допомогою біосенсора

Як можна бачити з рисунку, мала молода картопля має високу концентрацію глікоалкалоїдів у порівнянні з великою. Це може бути зв'язано з тим, що молода картопля продовжує рости і є метаболічно активною. Можливо, що продукування глікоалкалоїдів уповільнюється в міру збільшення бульб, як це трапляється в листі. Це питання є все ще відкритим, оскільки є багато інших факторів, що впливають на продукування глікоалкалоїдів.

5.2.5 Застосування біосенсорів для дослідження томатів

Для аналізів томатину використовували різні комерційні сорти томатів. Зразки мили вручну в проточній воді і протирали крізь сито для отримання соку. Ці зразки соку аналізували за допомогою біосенсора. Використовували два методи аналізу.

За першим методом (стандартних додавань) процедура була такою: глікоалкалоїди певної стандартної концентрації додавали до зразку соку томатів, визначали інгібування БУХЕ, отримані дані представляли графічно. Екстраполяція кривої на вісь x давала точне значення загального вмісту томатину у тестованій пробі (тобто в пробі без стандартних додавань глікоалкалоїдів) (рис. 5.12). Після розрахунку концентрації томатину, в зразку №7 отримано вміст томатину 73 мкМ.

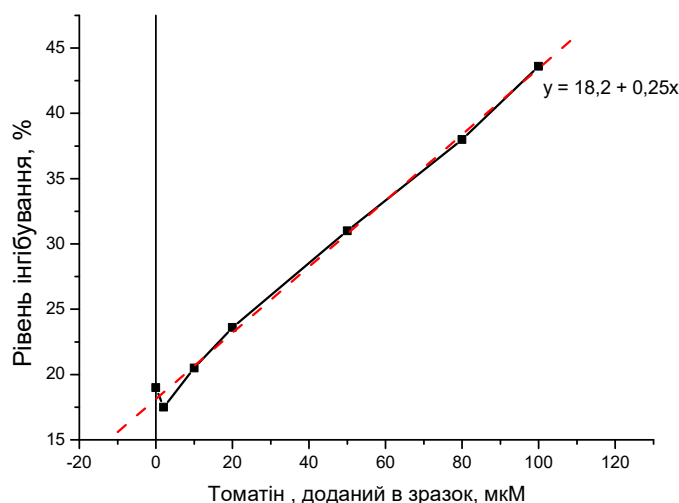


Рисунок 5.12 – Визначення вмісту глікоалкалоїдів в томатах за допомогою методу стандартних додавань. Вимірювання проводились з 1 мМ БУХХ в 5 мМ

фосфатному буфері, рН 7,5, додавали 30 мкл соку томатів,
розведення - 50 разів

За другим методом для визначення томатину в соці використовували лінійну частину калібрувальної кривої, отриманої заздалегідь. В цьому випадку величина інгібування БуХЕ при додаванні зразку соку будувалась на осі У, і вираховувалось відповідне значення концентрацій глікоалкалоїдів на осі Х (рис.5.13).

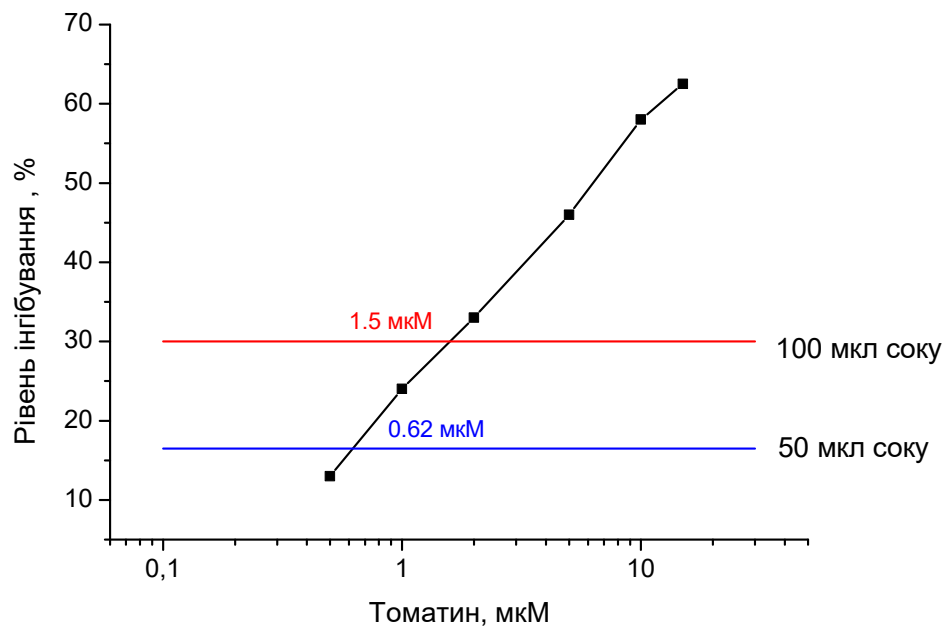


Рисунок 5.13 – Калібрувальна крива для аналізу томатину та його визначення в соці томатів. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ

Результати визначення концентрацій глікоалкалоїдів у різних комерційних сортах томатів, отримані за допомогою біосенсора, представлено на рис. 5.14. Загальна кількість глікоалкалоїдів у томатах була в межах 30 – 70 мг/кг свіжої ваги, що відповідає значенням, які характерні для томатів.

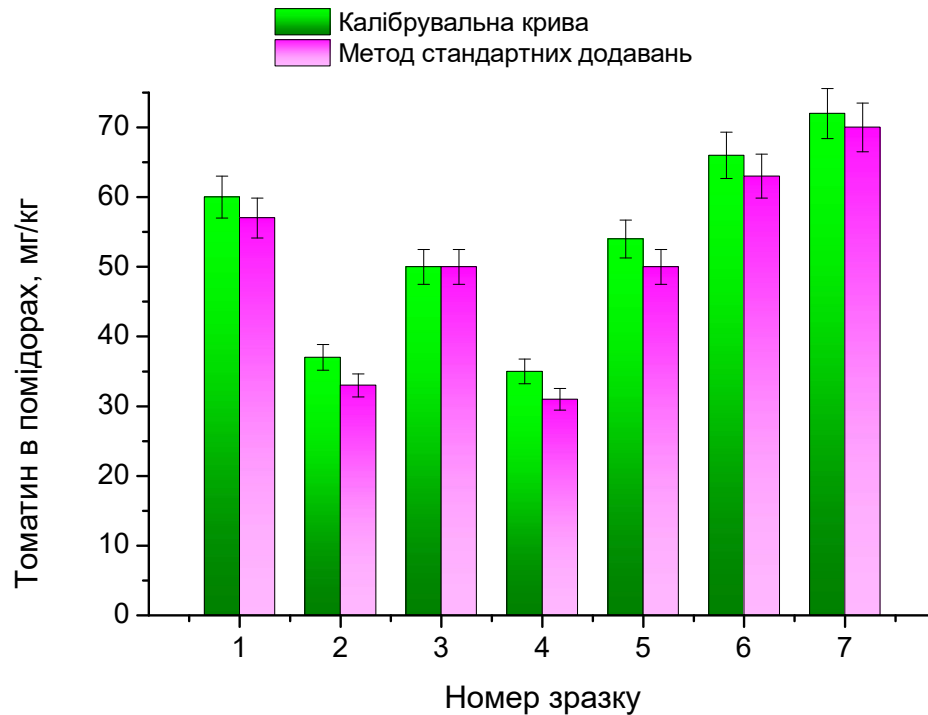


Рисунок 5.14 – Результати аналізу вмісту глікоалкалоїдів в різних сортах томатів, отримані двома різними методами. Вимірювання проводились з 1 мМ БуХ в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2

Біосенсори демонстрували хорошу операційну стабільність протягом 20 днів роботи.

5.2.6 Застосування біосенсорів для дослідження глікоалкалоїдів в різних овочах та фруктах

На рис. 5.15 приведено дані по селективності нашого біосенсора при аналізі різних овочей та фруктів.

З рисунку добре видно, що ступінь інгібування іммобілізованої БуХЕ в складі біосенсора дуже відрізняється для зразків соків з різних овочей та фруктів. У випадку картоплі, баклажанів та томатів він значно більший за інші овочі. Це зрозуміло, тому що вони відносяться до одного класу пасльонових культур, які можуть містити глікоалкалоїди, на відміну від інших. Аналіз простий, швидкий та не потребує значного часу на його проведення.

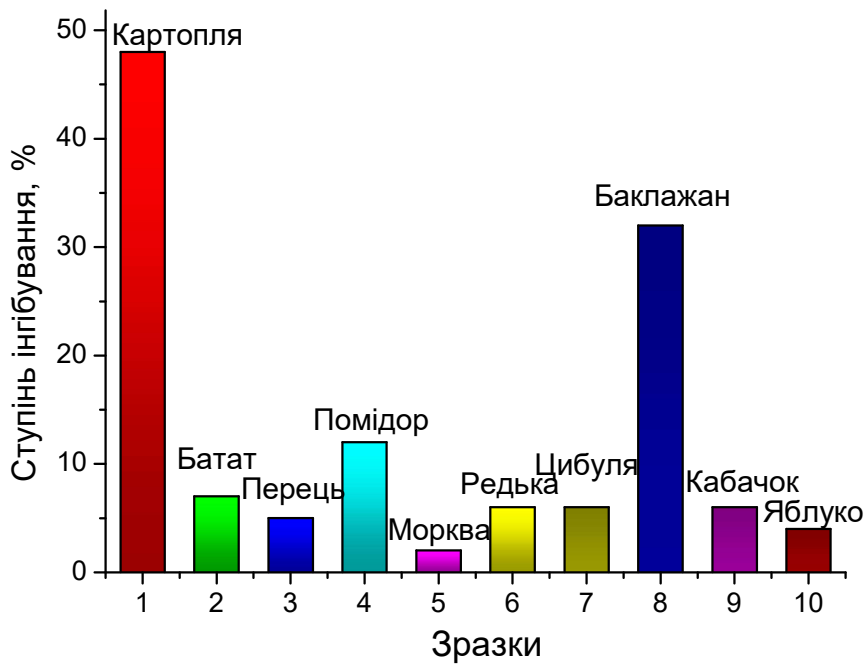


Рисунок 5.15 – Результати аналізу на вміст глікоалкалоїдів в різних овочах та фруктах

5.2.7 Висновки

Таким чином, в результаті виконання роботи за допомогою біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів і фермента бутирилхолінестерази проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі, вирощених на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Boigneville, Франція) та виведених методом традиційної селекції співробітниками Інституту картоплярства УААН, а також в комерційних сортах томатів. Підібрано оптимальну процедуру підготовки проб картоплі та томатів, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту глікоалкалоїдів. Аналіз простий, швидкий та не потребує значного часу на його проведення.

Досліджено вплив умов зберігання досліджуваних проб. Показано, що незважаючи на всі зовнішні та внутрішні фактори впливу, головним фактором щодо вмісту глікоалкалоїдів в картоплі є генетично визначена їхня кількість в кожному сорті.

5.3 Застосування біосенсора на основі ацетилхолінестерази для визначення афлатоксинів в зразках зернових

5.3.1 Вступ

Аналіз мікотоксинів є доволі складним завданням, тому що вони присутні у складних сумішах за низьких концентрацій, вони можуть виникати в різних комбінаціях та продукуватись при цьому одним чи декількома видами грибів.

Для контролю рівня афлатоксинів в багатьох країнах впроваджені правила, що регулюють їхній вміст. Допустимі межі афлатоксинів залежать від виду сільськогосподарської продукції. В ЄС максимально допустимі концентрації є $8,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для AFB1 та $15,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для загального вмісту всіх афлатоксинів в олійних культурах та арахісі, що піддаються сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням людьми або використовуються як інгредієнти в харчових продуктах. Ці значення є значно нижчими ($2,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для AFB1 та $4,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для загального вмісту афлатоксинів) для олійних культур, арахісу та продуктів їх переробки, що призначені для безпосереднього вживання людьми. Такі ж значення наведено для всіх зернових та продуктів їх переробки, в той час як максимальні значення для кукурудзи та рису, що будуть піддаватися сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням чи використанням їх як складових харчових продуктів, складають $5,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для AFB1 та $10,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$ для загальної кількості афлатоксинів [26].

На сьогоднішній день більшість аналізів мікотоксинів виконуються висококваліфікованим персоналом в акредитованих лабораторіях з використанням імуноферментного аналізу (ІФА), радіоімуноаналізу (RIA) або складніших та дорожчих методів, а саме детектування за допомогою мас-спектрометрії або флуоресцентної спектроскопії, визначення на основі розділення токсинів за допомогою газової хроматографії (ГХ) або вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), тощо. Перед стадією розділення завжди необхідна стадія екстракції афлатоксинів з подальшою очисткою для усунення або зменшення небажаних компонентів суміші, та, можливо, концентрування зразків.

У ряді досліджень авторами розглянуто аналітичні методи для аналізу мікотоксинів [27-36], деякі з них виконувались з акцентом на конкретні харчові продукти [30] та групи мікотоксинів, такі як тріхотецени [31] або афлатоксини [32, 33]. Також розглянуто нові тенденції в області хроматографічного/мас-спектрометричного методів та їх поєднання при визначення різних забруднюючих речовин, в тому числі мікотоксинів [34-36].

Як потужний інструмент скринінгу на наявність афлатоксинів та надійний метод кількісної оцінки використовується метод традиційної тонкошарової хроматографії (ТШХ) в поєднанні з денситометрією. Проте, не дивлячись на нові досягнення в розробці та застосуванні цих методів (а саме двовимірна ТШХ, високопродуктивна ТШХ, високоефективна ТШХ під тиском), тонкошарову хроматографію для кількісного аналізу афлатоксинів замінила високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) [32]. Наприклад, для визначення афлатоксинів в кормах та продуктах харчування все частіше використовується високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) [37], microHPLC [38], ультра-високоефективна рідинна хроматографія (UHPLC) [39-41] або 2D-рідинна хроматографія [42]. Ці методи завдяки високій розподільній здатності дають можливість одночасного розділення не тільки різних афлатоксинів, але також і інших мікотоксинів, таких як Т-2, НТ-2, зераленон, охратоксин А, або інших класів токсинів (наприклад пестицидів). Новим тенденціям в UHPLC-MS [43] та HUPLC-MS / MS [44] для різних класів забруднюючих токсичних речовин в їжі присвячено цілі огляди.

Крім того, в останні роки збільшилась увага до простіших у застосуванні високочутливих імуноферментних методів аналізу (ELISA). Є повідомлення про використання ELISA для аналізу зераленону та охратоксину [46], дезоксиніваленолу [45, 46], афлатоксину В1 [46, 47], одночасного визначення афлатоксину М1 та афлатоксину В1 [48].

Аналіз реальних зразків зернових є дуже нетривіальною задачею. Найбільш важливими питаннями при розробці процедури аналізу є пробопідготовка зразків та оцінка матричного ефекту на результат. Тому необхідно було провести оптимізацію параметрів біосенсора для визначення афлатоксинів в реальних

зразках, що є невід'ємною складовою розробок біосенсорів для моніторингу сільськогосподарської продукції.

5.3.2 Вибір розчинника для екстракції АФВ1

Процедура пробопідготовки для визначення афлатоксинів більш складна, тому що її треба було узгодити з традиційними мікробіологічними методами екстракції АФВ1. Для початку необхідно було вибрати оптимальний розчинник для екстракції АФВ1 із заражених зразків з урахуванням його мінімального впливу на роботу біосенсора.

При попередніх експериментах пробопідготовки використовували ацетонітрил, який був обраний для наших експериментів як органічний розчинник АФВ1, тому що його досить часто використовують для екстракції АФВ1 із забруднених ним зразків [49-51]. Але в ході дослідження було отримано, що при додаванні його в робочу комірку відбувається інгібування АцХЕ, а залишкова активність розробленого біосенсора залежить від концентрації цього розчинника.

На рис. 5.16 представлено криву залежності рівня інгібування біоселективного елементу на основі 1% АцХЕ від об'єму внесеного ацетонітрилу.

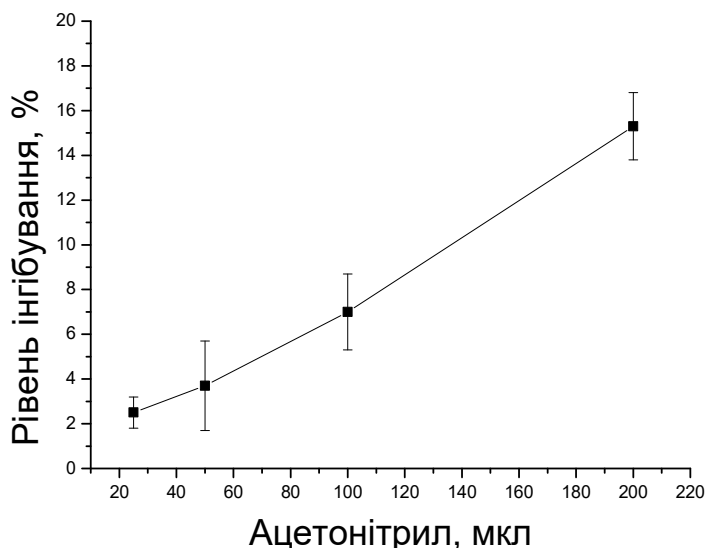


Рисунок 5.16 – Залежність рівня інгібування біосенсора від концентрації ацетонітрилу. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7.0, при кімнатній температурі, концентрація АцХХ – 4 мМ

Добре видно, що збільшення об'єму ацетонітрилу призводить до збільшення рівня інгібування. Однак при роботі з реальними зразками в робочу комірку потрапляє ацетонітрил в значно менших концентраціях ніж використовувались в контрольному експерименті. При великих концентраціях АФВ1 ($> 2 \text{ мкг/мл}$) вплив розчинника не заважає детектуванню токсиканта, але при менших концентраціях, детектування афлатоксину унеможлиблюється за рахунок впливу ацетонітрилу на роботу біосенсору. Таким чином постало питання підбору оптимального розчинника, тобто такого розчинника який не буде впливати на роботу ензиму в біоселективній мембрані або вплив його буде незначним. В ході експерименту були виготовлені біосенсиори на основі 1% АцХЕ. Був перевірений вплив різних розчинників (ацетонітрил, метанол, етанол, бутанол, ксилол, ізопропанол, ізоаміловий спирт, диметилсульфоксид) на роботу 1% АцХЕ-біосенсорів. В подальших експериментах (з реальними зразками або модельними розчинами АФВ1) найчастіше до вимірювальної комірки додавалися 50 мкл, 100 мкл або 200 мкл розчинника. Тому вплив саме цих об'ємів розчинника необхідно було перевірити.

Бутанол ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$) – безбарвна рідина з характерним запахом. В основному використовується як розчинник, в якості проміжного продукту в хімічному синтезі, і в якості палива. На рис. 5.17 представлені реальні відгуки на субстрат і на додавання бутанолу.

При додаванні 50 мкл бутанолу у вимірювальну комірку відгук на субстрат зменшився на 2%, при додаванні ще 50 мкл – зменшення на 5%, при додаванні ще 100 мкл – зменшення відгуку на 24%. Таким чином можна бачити, що бутанол помітно впливає на роботу біосенсора на основі АцХЕ.

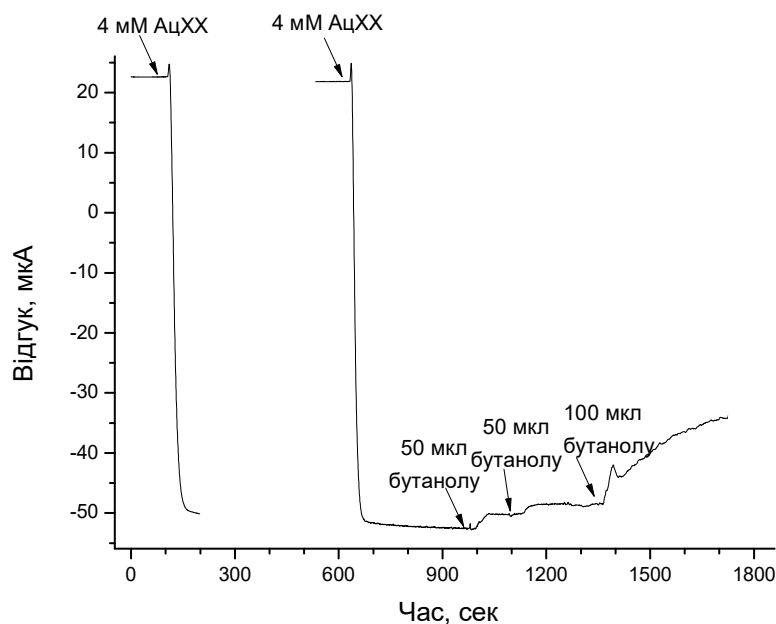


Рисунок 5.17 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мм АцХХ) і вплив на нього бутанола

Етанол (C_2H_5OH) - летюча, легкозаймиста, безбарвна рідина з сильним хімічним запахом. Етанол використовують як розчинник, антисептик, паливо та в якості активної рідини в сучасній термометрах (так як він має низьку точку замерзання).

При додаванні 50 мкл етанолу у вимірювальну комірку відгук на АцХХ збільшився на 1%, при додаванні ще 50 мкл етанолу величина відгуку не змінилась, а при додаванні ще 100 мкл – відгук збільшився на 2% відносно початкового відгуку на субстрат. Хоча етанол не сильно впливає на величину відгуку, але при його додаванні до вимірювальної комірки спостерігалась помітна реакція на внесення та шум відгуку. Рис. 5.18 демонструє реальні відгуки на субстрат і на додавання етанолу.

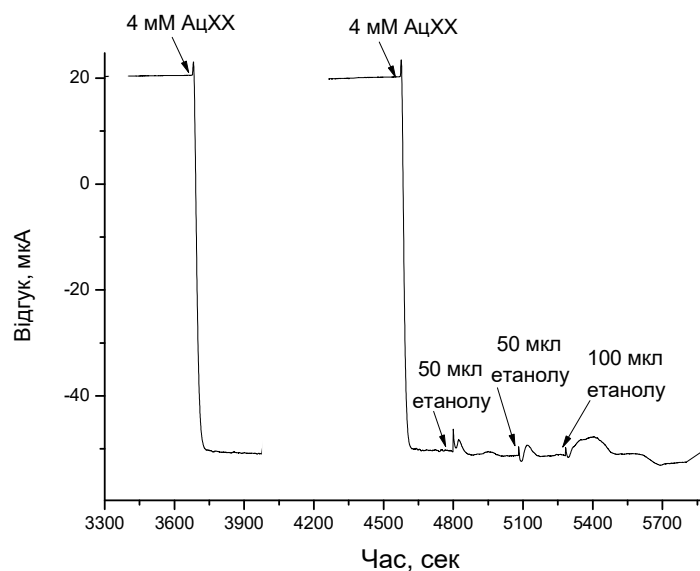


Рисунок 5.18 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мм АцХХ) і вплив на нього етанолу

Ксилол ($C_6H_4(CH_3)_2$) – вуглеводень ароматичного ряду, безбарвна рідина з характерним запахом, яка малорозчинна у воді та добре розчиняється в органічних розчинниках. Ксилол використовують в якості розчинника лаків, красок, мастик та іншого. Також використовують у синтезі барвників.

На рис. 5.19 представлені реальні відгуки на субстрат і на додавання ксилолу.

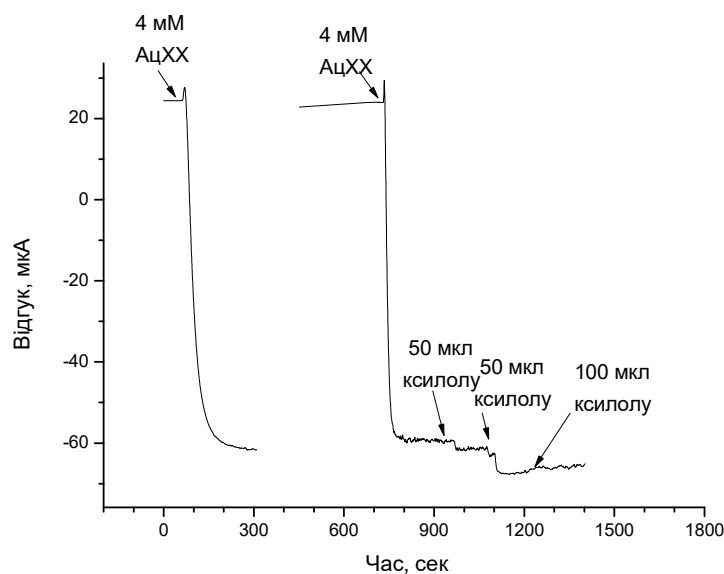


Рисунок 5.19 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мм АцХХ) і вплив на нього ксилолу

При додаванні 50 мкл ксилолу у вимірювальну комірку відгук на субстрат збільшився на 1%. При додаванні ще 50 мкл – відгук збільшився на 9%, а при додаванні ще 100 мкл – відгук трохи зменшився відповідно попереднього, але відносно відгуку на субстрат – збільшився на 6%. Ймовірно це спостерігалось із-за поганої розчинності ксилола у воді. Коли до вимірювальної комірки додали останню аліквоту ксилолу (200 мкл ксилолу у комірці), стали візуально помітні маслянисті кульки. Так як ксилол погано розчиняється у воді та реакція з ксилолом є мало з'ясованою, цей розчинник не підходить для подальших експериментів.

Ізоаміловий спирт ($((\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH})$) – одноатомний спирт, в'язка прозора рідина з різким неприємним запахом. Ізоаміловий спирт застосовують для виготовлення есенцій в парфумерії, тому що він має приємний фруктовий аромат. Його застосовують в промисловості як розчинник, а також для отримання ізоамілацетату, що використовується при виробництві амільнітриту в медичній галузі та нітроцелюлозних лаків. Токсичність ізоамілового спирту в десятки разів перевищує токсичність етилового.

Рис. 5.20 демонструє реальні відгуки на субстрат і на додавання ізоамілового спирту. При додаванні 50 мкл ізоамілового спирту в комірку відгук на АцХХ зменшився на 11%, а при додаванні ще 50 мкл – зменшився до 34%. Таким чином ізоаміловий спирт в якості розчинника не слід застосовувати при роботі з АцХЕ-біосенсором, тому що навіть при малих концентраціях (4%) він досить сильно впливає на роботу такого біосенсора.

Ізопропіловий спирт або ізопропанол ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) — найпростіший одноатомний вторинний спирт аліфатичного ряду. Це безбарвна, легкозаймиста хімічна сполука з сильним запахом. Ізопропіловий спирт розчинний у воді, етанолі і хлороформі, широко використовується у промисловості як розчинник. Він поширений як розчинник для натуральних і синтетичних смол, жирів, протеїнів, алкалоїдів, нітролаків (у поєднанні з іншими розчинниками), хлорофілу та інших речовин. Також його використовують як технічний спирт у засобах для чищення оргтехніки, склаб інше та як складова частина детергентів (рідкі мила).

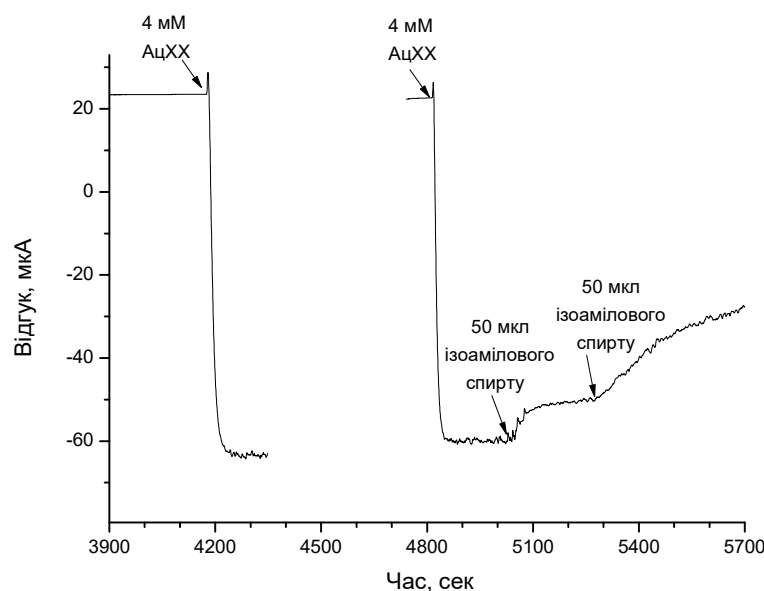


Рисунок 5.20 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мм АцХХ) і вплив на нього ізоамілового спирту

На рис. 5.21 представлені реальні відгуки на субстрат і на додавання ізопропілового спирту. При додаванні 50 мкл ізопропанолу в комірку відгук на субстрат збільшився на 0,2 мкА, що складає менше 1%, при додаванні в комірку ще 50 мкл ізопропанолу відгук збільшився на 0,8 мкА, що не перевищувало 1%. При додаванні в комірку ще 100 мкл ізопропанолу збільшення відгуку було 1%. При кожному додаванні ізопропанолу спостерігалась помітна реакція на внесення, яка компенсувалась за рахунок використання диференційного режиму вимірювання. Таким чином ізопропанол можливо використовувати в якості розчинника при роботі з біосенсором на основі АцХЕ.

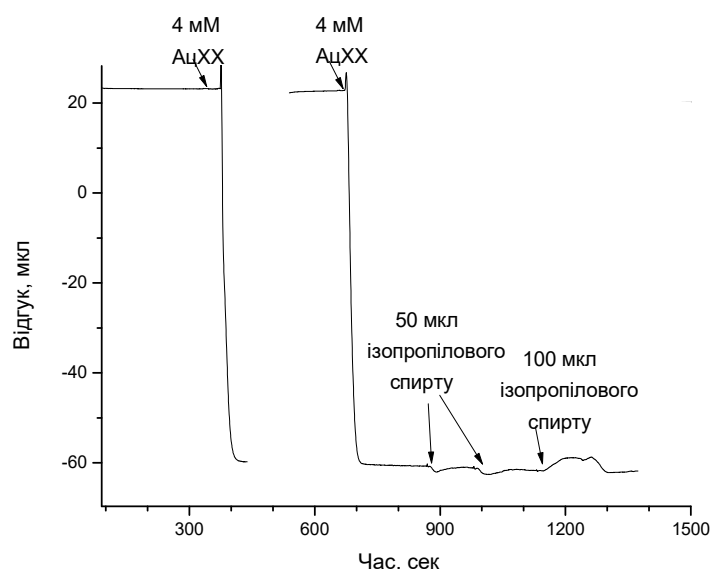


Рисунок 5.21 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мМ АцХХ) і вплив на нього ізопропілового спирту

Диметилсульфоксид ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) – безбарвна висококипляча рідина, яка при змішуванні з водою сильно нагрівається. Диметилсульфоксид (ДМСО) є важливим полярним апротонним розчинником, який розчиняє як полярні, так і неполярні сполуки. Використовується в якості розчинника, як кріопротектор (для запобігання пошкодження клітин при їх заморожуванні), як лікарський засіб (в медицині) та інше.

Рис. 5.22 демонструє реальні відгуки на субстрат і на додавання ДМСО.

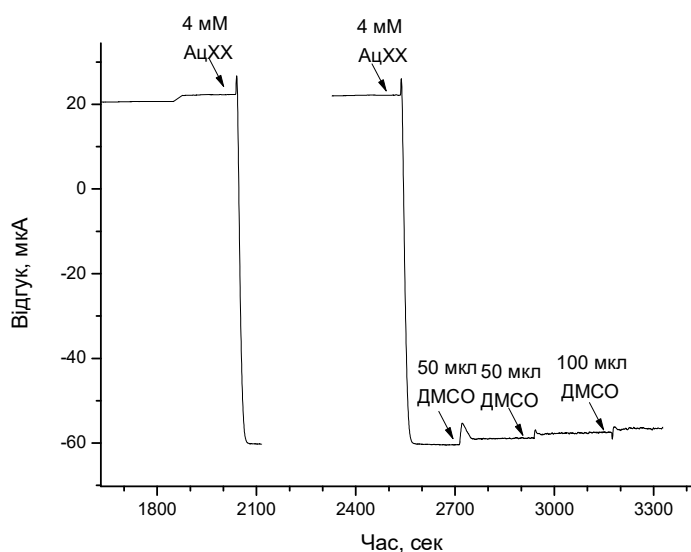
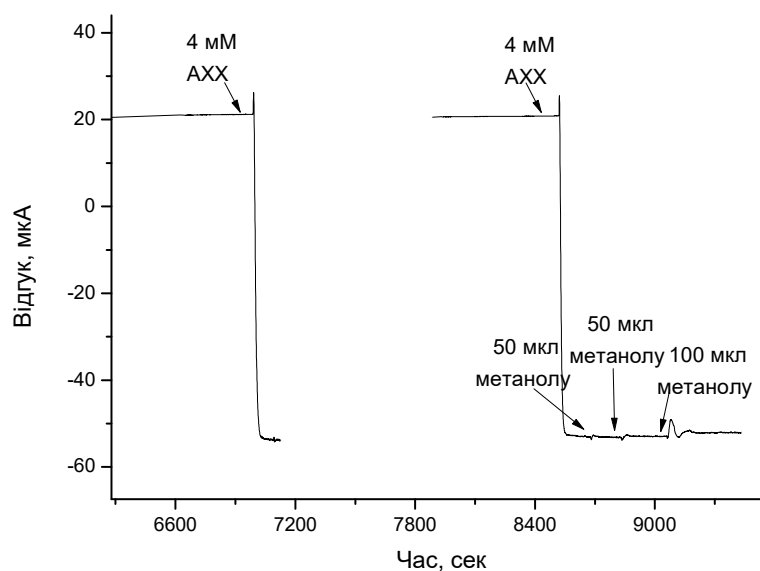


Рисунок 5.22 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мМ АцХХ) і вплив на нього ДМСО

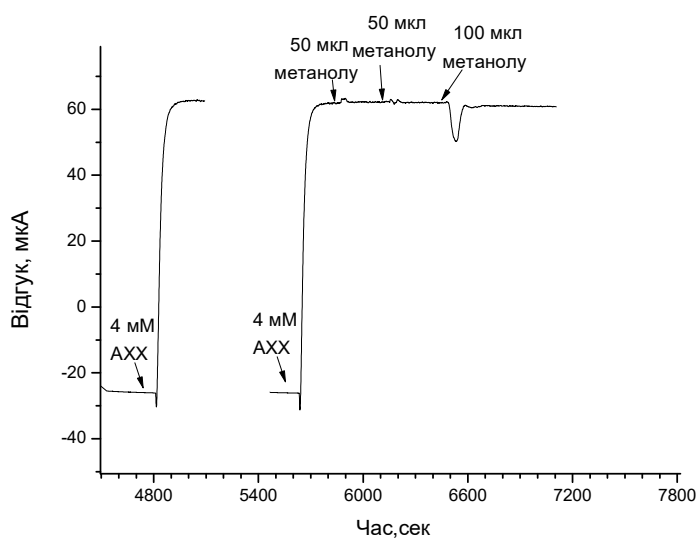
При додаванні 50 мкл ДМСО в комірку відгук на АцХХ зменшився на 1%, при додаванні ще 50 мкл ДМСО відгук зменшився на 3%, а при додаванні ще 100 мкл ДМСО відгук зменшився на 4%. При цьому кінетика зменшення відгуків при додаванні ДМСО відрізнялась від інших розчинників: не спостерігалось різкого зменшення відгуку з подальшим виходом на плато, спостерігалась зміна кута відгуку. Але так чи інакше, після інгібування ДМСО і після відмивки робочої мембрани, відгуки біосенсора показували ті ж величини що і до інгібування. Таким чином ДМСО інгібує АцХЕ оборотно. Питання про використання ДМСО в якості розчинника при роботі з біомембраною залишається відкритим.

Метанол (CH_3OH) – найпростіший одноатомний спирт. Це безбарвна рідина зі слабким спиртовим запахом, що змішується з водою в будь-яких співвідношеннях. Він є добрим розчинником для багатьох органічних речовин. Метиловий спирт застосовується дуже широко. У органічній хімії метанол використовується як розчинник. Через низьку температуру замерзання та добру розчинність він використовується в газовій промисловості для боротьби з утворенням гідратів. В органічному синтезі застосовується для отримання формальдегіду, формаліну, оцтової кислоти і ряду ефірів, ізопрену та ін. В лакофарбовій промисловості його використовують для виготовлення розчинників при виробництві лаків. Крім того, він застосовується як добавка до рідкого палива в двигунах внутрішнього згорання.

На рис. 5.23 представлені реальні відгуки на субстрат і на додавання метанолу.



(A)



(Б)

Рисунок 5.23 – Відгук АцХЕ біосенсора на додавання субстрату (4мм АцХХ) і вплив на нього метанолу

При додаванні 50 мкл метанолу у вимірювальну комірку після відгуку на субстрат спостерігалась лише реакція на внесення, яка компенсувалась за рахунок використання диференційного режиму вимірювання. Подальшої зміни величини відгуку не спостерігалось. При додаванні ще 50 мкл метанолу знов спостерігалась лише реакція на внесення розчинника без зміни величини відгуку. А при внесенні

ще 100 мкл метанолу – відгук зменшувався лише на 1%. Цей експеримент було відтворено на двох різних вимірювальних установках з двома різними біосенсорами (рис а) та б)). Результати експериментів співпали. Таким чином, метанол можна використовувати в якості розчинника, так як його вплив на роботу ферментативної мембрани біосенсора досить незначний.

На рис. 5.24 представлено результати перевірки впливу різних розчинників афлатоксинів (етанол, диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонітрил та метанол, які найчастіше використовують) на роботу біосенсора на основі АцХЕ при додаванні різних об'ємів до вимірювальної комірки.

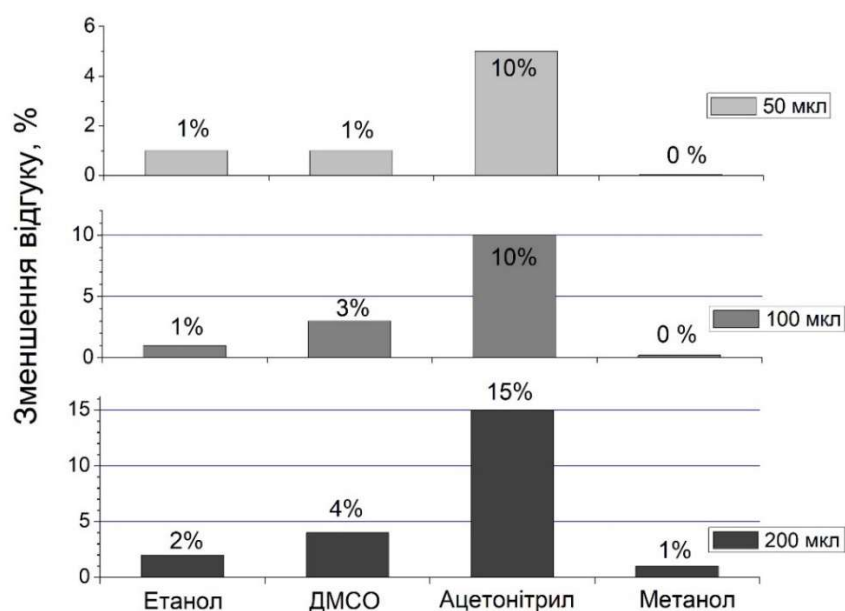


Рисунок 5.24 – Вплив різних об'ємів (50 мкл, 100 мкл і 200 мкл) розчинників афлатоксинів (етанол, ДМСО, ацетонітрил і метанол) у вимірювальній комірці на відгук біосенсора на основі АцХЕ

Підсумовуючи результати експериментів можна зробити висновок, що найкраще для роботи з АцХЕ-біосенсором в якості розчинника підходить метанол, тому що він майже не впливає на роботу ферментативної мембрани біосенсора. До того ж згідно літературних даних він так само як і ацетонітрил достатньо часто використовується для розчинення АФВ1 та його екстракції з реальних зразків.

5.3.3 Вирощування продуценту АФВ1 на зразках зернових та процедура його екстракції

Як реальні зразки для тестування розробленого біосенсора були використані пшениця, овес, кукурудза та арахіс, спеціально заражені мікроскопічним грибом *Aspergillus*. Зразки були спеціально підготовлені в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Продуцент афлатоксину В1 вирощували на субстратах (пшениця, овес, кукурудза та арахіс) протягом 21 доби. На рис. 5.25 представлені фотографії, які демонструють процес зростання мікроміцетів *Aspergillus* на 15 добу.

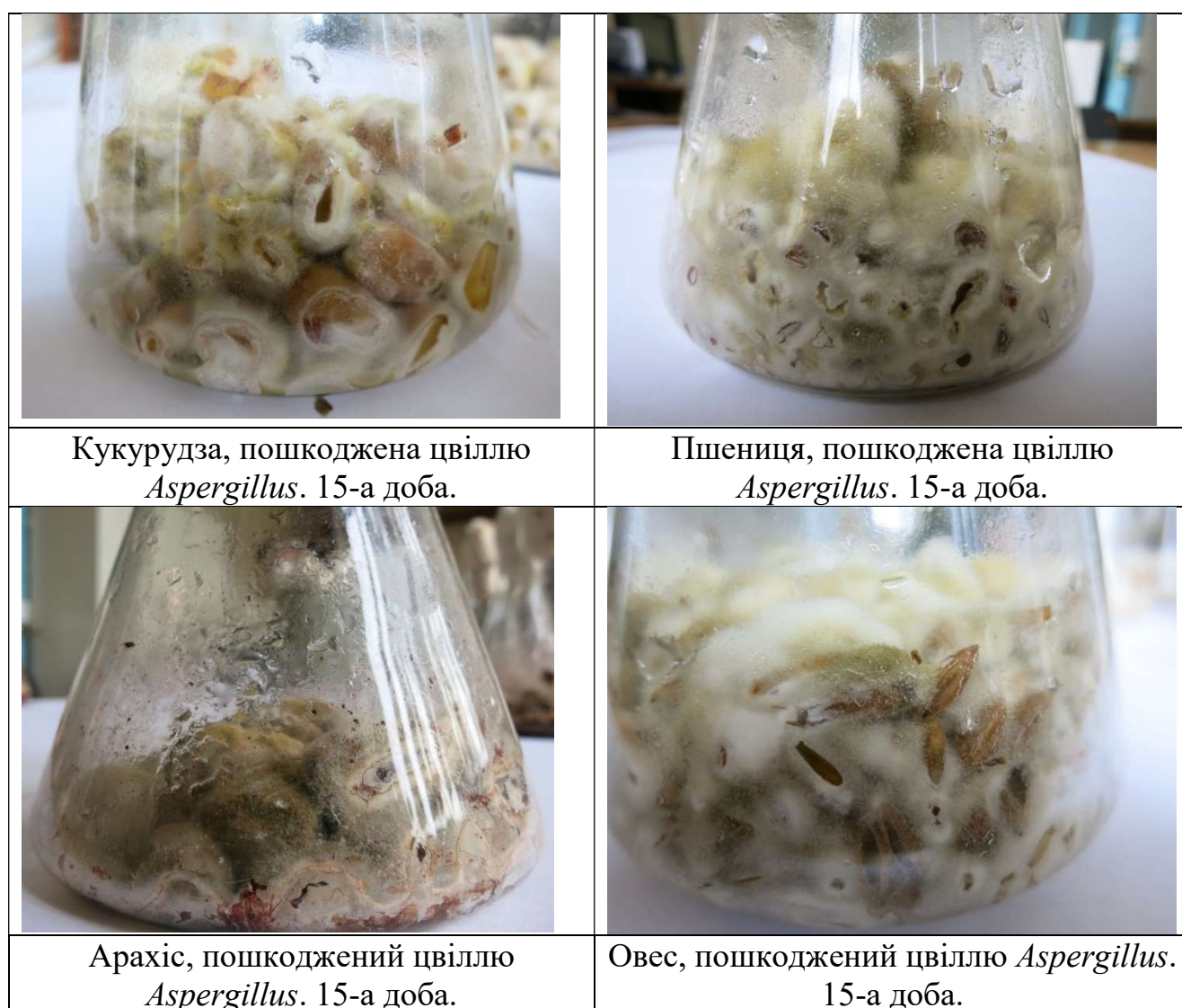


Рисунок 5.25 – Фото сільськогосподарських культур, інфікованих грибом *Aspergillus flavus* на 15 добу культивування

Наступний рисунок (рис. 5.26) демонструє заражені зразки на 21 добу, після повного «дозрівання» мікроскопічного гриба *Aspergillus*.

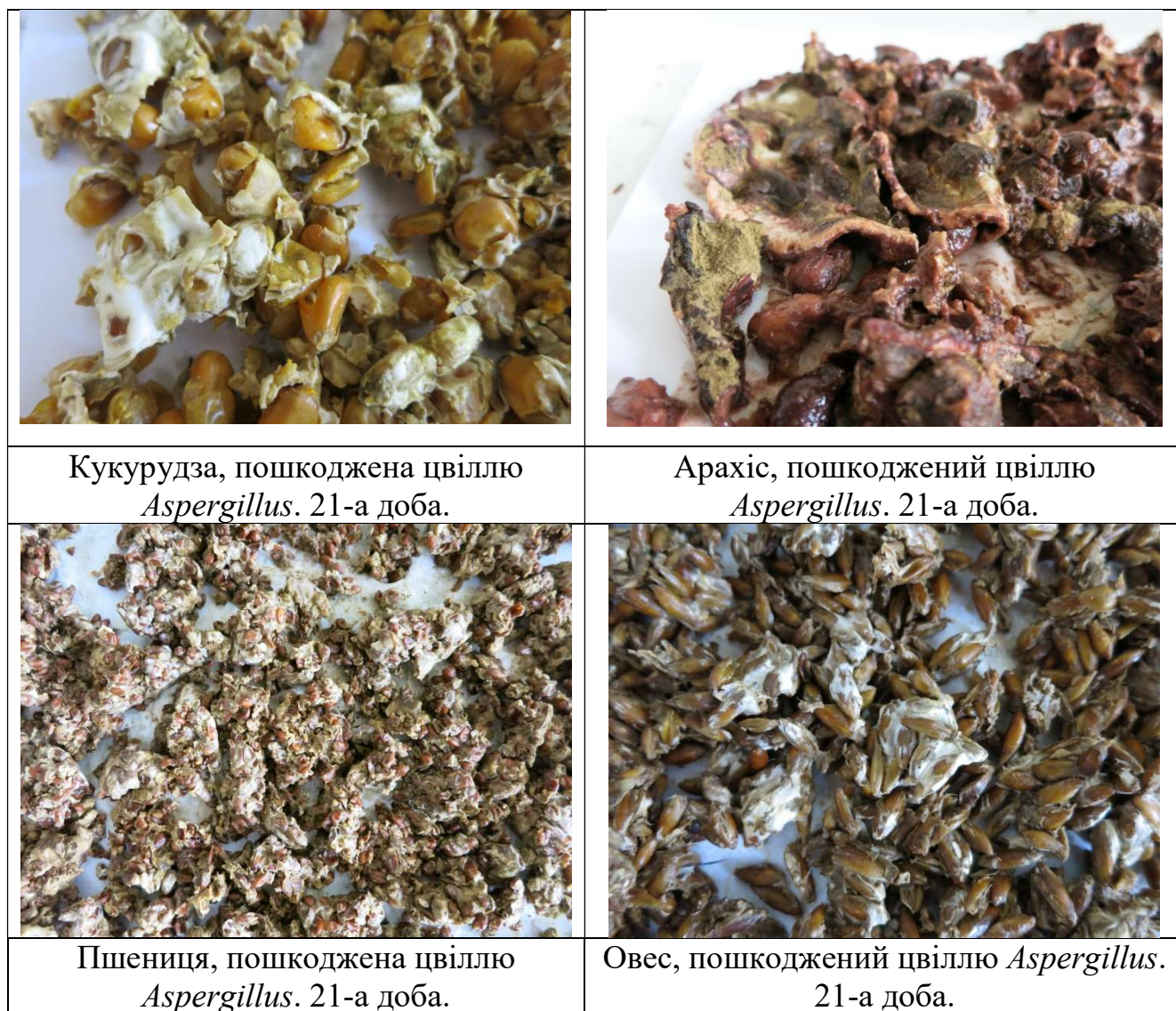


Рисунок 5.26 – Фото сільськогосподарських культур, інфікованих мікроскопічним грибом *Aspergillus flavus* на 21 добу культивування

Афлатоксин В1 було екстраговано із зразків згідно наступного протоколу екстракції. Заражене насіння висушували при температурі до 60°C, подрібнювали до стану муки та додавали невелику кількість 4 % KCl, після чого екстрагували протягом 30 хв за інтенсивного струшування. Екстракцію із пшениці та вівса проводили застосовуючи ацетонітрил, а для арахісу та кукурудзи – ацетон. Отримані екстракти упарювали за нормальних умов в темряві до повного випаровування розчинника (екстрагента). За даними попереднього експерименту

найкращим розчинником афлатоксину В1 для роботи з ацетилхолінестеразним біосенсором є метанол, тому що він не впливає або майже не впливає (в залежності від об'єму) на роботу біосенсора. Саме тому отримані зразки були розчинені в 10 мл чистого метанолу та потім відфільтровані від великих частинок, що можуть механічно пошкодити робочу мембрану біосенсора. Подальша робота проводилась із підготовленими таким чином екстрактами.

5.3.4 Відпрацювання протоколу вимірювання АФВ1 в реальних зразках

Для проведення аналізу складу афлатоксинів в забруднених зразках зернових культур спочатку були відпрацьовані протоколи проведення вимірювань, що відповідали протоколам вимірювань в модельних зразках (розділ 4) та враховували особливості роботи з запропонованим розчинником та екстрактами із реальних зразків. В якості контролю використовували екстракти, отримані з тих же субстратів за тією ж методикою, але попередньо не інфіковані грибом *Aspergillus*.

Вимірювання проводили таким чином: спочатку отримували декілька тестових відгуків на 4 мМ субстрат. Потім проводили калібрування по об'єму контрольного зразка. Далі біосенсор ретельно відмивали в робочому буфері до відновлення відгуку і проводили калібрування за об'ємом для інфікованого зразка. На рис. 5.27 представлено результати цього експерименту для контрольного зразку та екстракту, отриманого із інфікованої пшениці.

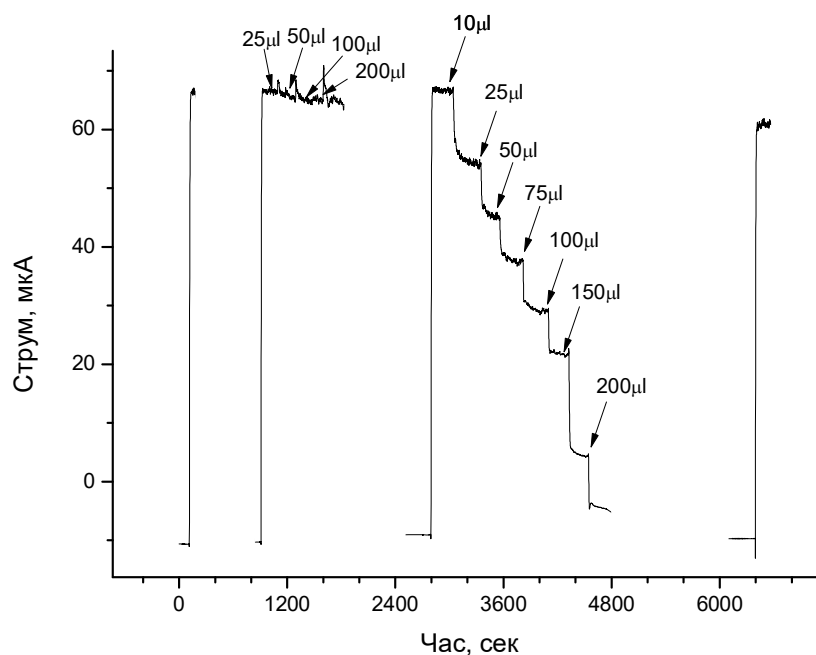


Рисунок 5.27 – Відгук біосенсора на додавання контрольного зразка та екстракту, отриманого із інфікованої пшениці

З рисунку добре видно, що інгібування іммобілізованої АцХЕ контрольним зразком практично не відбувається, при цьому інфікований екстракт суттєво інгібує АцХЕ в складі біосенсора.

За таким же алгоритмом були проведені вимірювання для зразків інфікованих грибом *Aspergillus* вівса і його контрольного зразку.

На рис. 5.28 представлено результати додавання контрольного зразка екстракту вівса та послідовне інгібування іммобілізованого фермента екстрактом із інфікованого зразка.

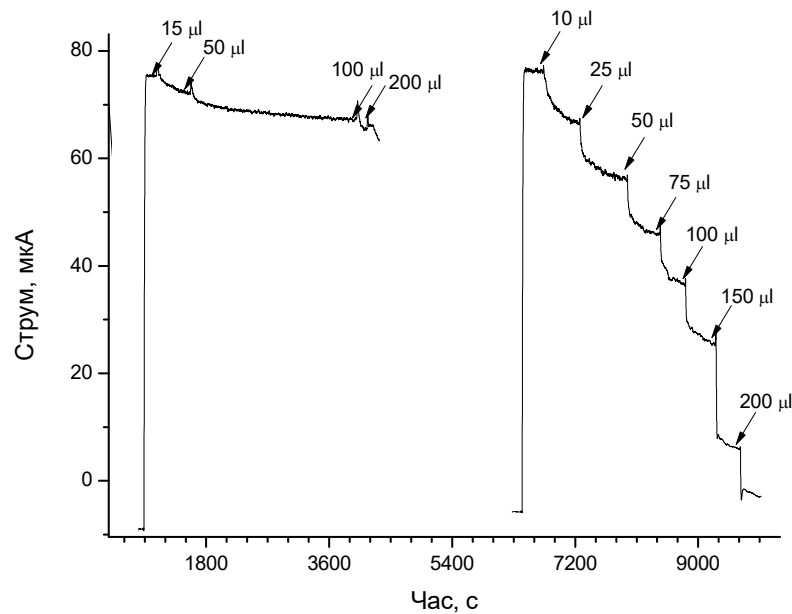


Рисунок 5.28 – Відгуки біосенсора на додавання екстракту із контрольного зразка та інфікованого вівса

Спостерігається невеликий вплив екстракту контрольного зразка на біоселективний елемент, який можна пов'язати з «матричним» ефектом. Для досліджуваного ж зразка спостерігається значно більше інгібування іммобілізованого фермента. Таким чином, можна зробити висновок про досить гарну чутливість розробленого біосенсора до АФВ1 в реальних зразках.

Наступна серія експериментів була проведена зі зразками, отриманими з кукурудзи. Вимірювання проводили як для контрольного зразку, так і інфікованого. Крім того, як один із видів контролю було отримано серію відгуків на додавання тотожних об'ємів чистого метанолу для впевненості, що зменшення сигналу відбувається не за рахунок впливу на сигнал розчинника (рис. 5.29).

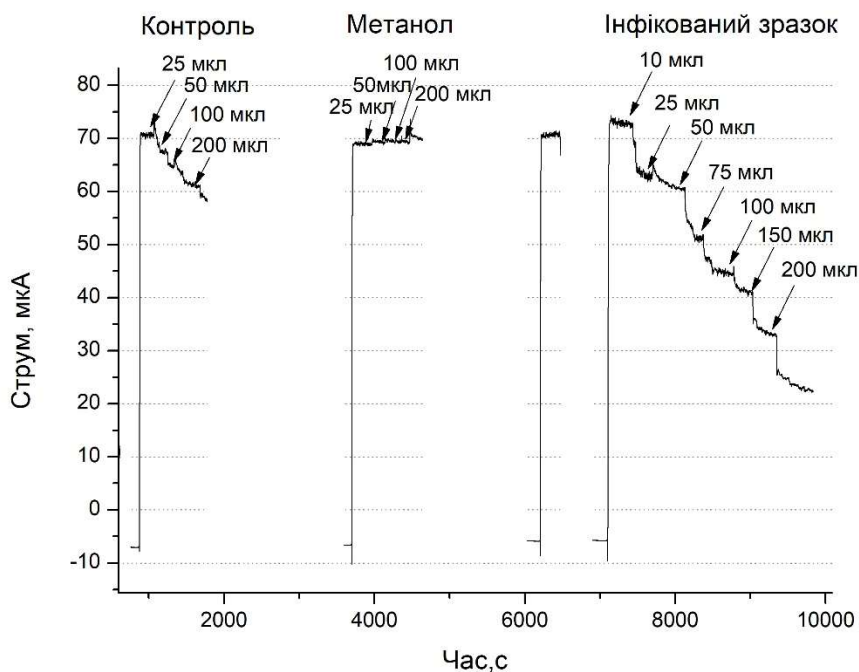


Рисунок 5.29 – Відгуки біосенсора на додавання різних об’ємів екстракту контрольного зразка, відповідного об’єму розчинника метанолу та екстракту інфікованої кукурудзи

Отримані результати підтвердили, що метанол в концентраціях, що використовуються в експерименті, не впливає на роботу біосенсора, присутній лише невеликий «матричний ефект» та досить сильний вплив на відгук екстракту інфікованого зразка.

Проведення вимірювань із зразками, отриманими із інфікованих горіхів та контрольної партії виявилось практично неможливим завдяки присутності в екстрактах горіхів дуже високого вмісту жирів. Екстракти виявились дуже маслянистими. Це призводило до утворення плівок як на поверхні селективного елемента, так і на поверхні вимірювальної комірки. При цьому доступність субстратів всередину мембрани різко обмежувалась, і ми не отримували навіть відтворюваних відгуків на додавання в комірку АцХХ. Тому вимірювання афлатоксинів в горіхах за допомогою біосенсорів поки що є неможливим.

Також було показано, що при розведенні зразків менше ніж 100 разів спостерігається значне інгібування біосенсору (до 100%). Лінійний діапазон

біосенсору для визначення АФВ1 знаходиться в межах 0,2 - 2 мкг/мл, що відповідає рівню інгібування від 5% до 30%. При розведенні зразку від 250 до 100 разів рівень інгібування АцХЕ в мембрані біосенсора знаходиться в робочому діапазоні роботи біосенсора. Рівень розведення впливає на наявний матричний ефект: чим більше розведення тим матричний ефект менший. Таким чином, АцХЕ-біосенсор можна використовувати для аналізу АФВ1 при умові розведення реальних зразків не менше ніж в 100 разів та не більше ніж в 250 разів.

5.3.5 Аналіз АФВ1 в реальних зразках

Як реальні зразки для аналізу були використані пшениця, соя, кукурудза, просо, спеціально інфіковані мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus*. Зразки були підготовлені в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України із залученням музею культур грибів-продуцентів мікотоксинів. Зокрема, як продуценти комплексу афлатоксинів (В1, G1, В2, G2) були відібрані 8 штамів *Aspergillus flavus*, виділених з різних екологічних ніш. Зараження суспензіями конідій грибів-продуцентів проводили на наступних субстратах: *A. flavus* – на пшениці та сої; *A. ochraceus* – на кукурудзі та просі.

Отримані методом твердофазної ферментації заражені зразки подрібнювали до порошкового стану та піддавали екстракції. На основі попередніх досліджень із сумісності органічних розчинників різного ступеня полярності з біоселективними елементами біосенсорів, а також за літературними даними, як екстрагент було використано метанол. Вихідна маса кожного зразка становила 50 г. Екстракцію мікотоксинів із заражених субстратів проводили у співвідношенні зразок : екстрагент = 1 : 5 однократно впродовж 30 хв за кімнатної температури без світла. Отримані екстракти випаровували до мінімального об'єму в сушильній шафі за кімнатної температури впродовж 24 годин без світла. Концентровані спиртові екстракти без додаткової очистки зберігали у пробірках Епендорф до подальших вимірювань. Як контрольні використовували екстракти, отримані за тією ж методикою з тих же зразків, але не заражених мікотоксинами.

У таблиці 5.2 наведений опис препаратів реальних зразків.

Таблиця 5.2 – Перелік зразків насіння, заражених суспензіями конідій грибів-продуцентів, підготовлених для біосенсорного визначення вмісту мікотоксинів

№ зразка	Штам	Субстрат
<i>Aspergillus flavus</i>		
1	801	Соя
2		Пшениця
3	973	Соя
4		Пшениця
5	NN	Соя
6		Пшениця
7	2979	Соя
8		Пшениця
9	Г30	Соя
10		Пшениця
11	М	Соя
12		Пшениця
13	2980	Соя
14		Пшениця
15	1859	Соя
16		Пшениця
<i>Aspergillus ochraceus</i>		
17	3045	Кукурудза
18		Просо
19	3015	Кукурудза
20		Просо
21	1059	Кукурудза
22		Просо
23	3048	Кукурудза
24		Просо
КОНТРОЛЬ		
25		Пшениця
26		Просо
27		Соя
28		Кукурудза

Для роботи використовували відібрані сенсори зі схожими робочими характеристиками (прямий відгук на субстрат, рівень інгібування для певних концентрацій АФВ1). На їхню поверхню іммобілізували біоселективні елементи на основі 2% АцХЕ. При проведенні цієї серії експериментів з реальними зразками був використаний наступний протокол вимірювань, згідно з яким були перевірені всі проби.

1. Для попередньої оцінки проводилось калібрування біосенсора «драбинкою» з використанням модельного розчину АФВ1 по двох чи трьох точках.
2. Наступним кроком оцінювали вплив екстрактів на роботу біосенсора при додаванні «драбинкою» певного об'єму зразка.
3. Далі сенсор ретельно відмивали, отримували наступний відгук на субстрат та оцінювали вплив «матриці» шляхом додавання відповідних об'ємів контрольних зразків.
4. Для контролю знову отримували відгуки на субстрат АцХХ і в разі потреби проводили додаткове підкалібрування, контроль і корекцію роботи сенсора.

На рис. 5.30 представлено приклад проведення вимірювань за таким алгоритмом для зразка №5 (соя, інфікована *Aspergillus flavus*, штам NN). Контрольний зразок - №32, екстракт неінфікованої сої.

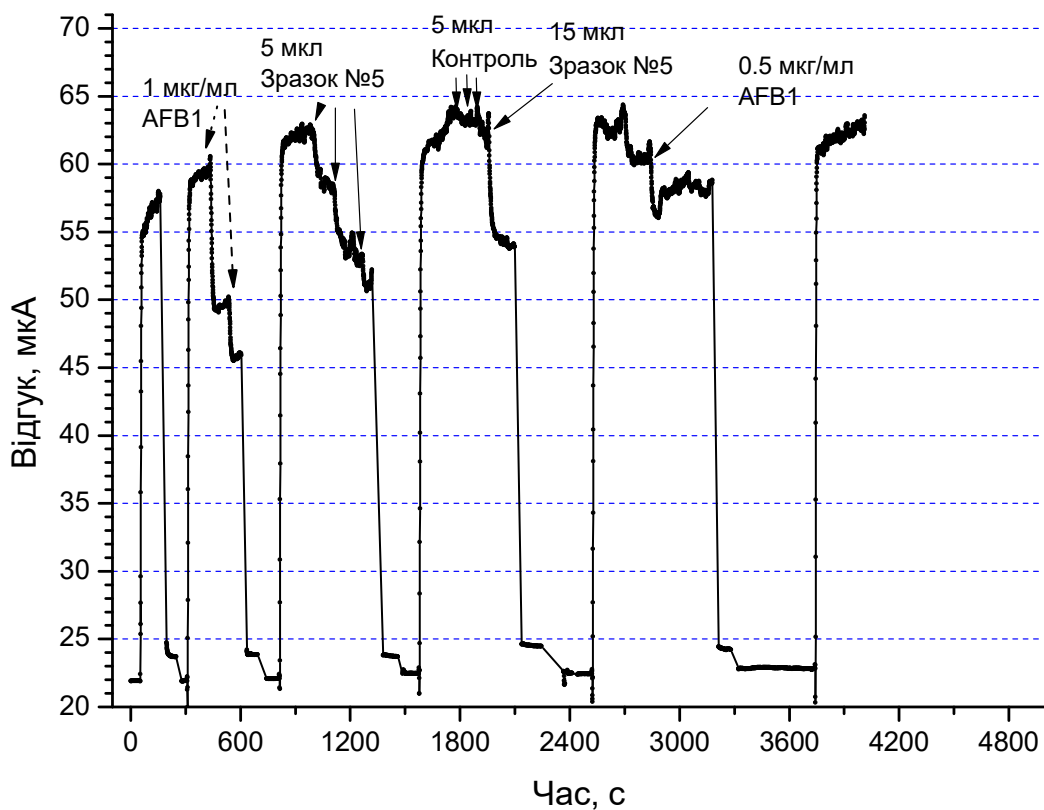


Рисунок 5.30 – Сенсограма біосенсора на основі 2% АцХЕ мембрани.

Зразки № 5. Контроль – зразок № 32

Отримані результати дозволяють визначити вміст афлатоксину в представлений пробі. Добре видно, що попри роботу з реальним препаратом, біосенсор як такий демонструє цілком прийнятну відтворюваність як прямих відгуків на субстрат, так і інгібіторних відгуків на модельні і реальні зразки токсикантів. Одним із найбільш важливих результатів цього експерименту є успішне проведення контрольного вимірювання. При роботі зі зразками, приготовленими без зараження мікотоксинами, практично не спостерігалось впливу жодного з усіх чотирьох зразків-матриць на активність біоселективної мембрани сенсора. Оцінюючи вміст мікотоксинів у даному зразку, ми отримали величину близько 200 мкг/мл АFB1.

На рис. 5.31 представлений ще один приклад проведення вимірювань біосенсором для зразків №9, 11 і 12 (соя, інфікована *Aspergillus flavus*, штам Г30, і пшениця, інфікована *Aspergillus flavus*, штам М). Зразки №30 і №32 - контрольні, які пройшли повністю процедуру попередньої підготовки, але не були інфіковані мікроміцетами.

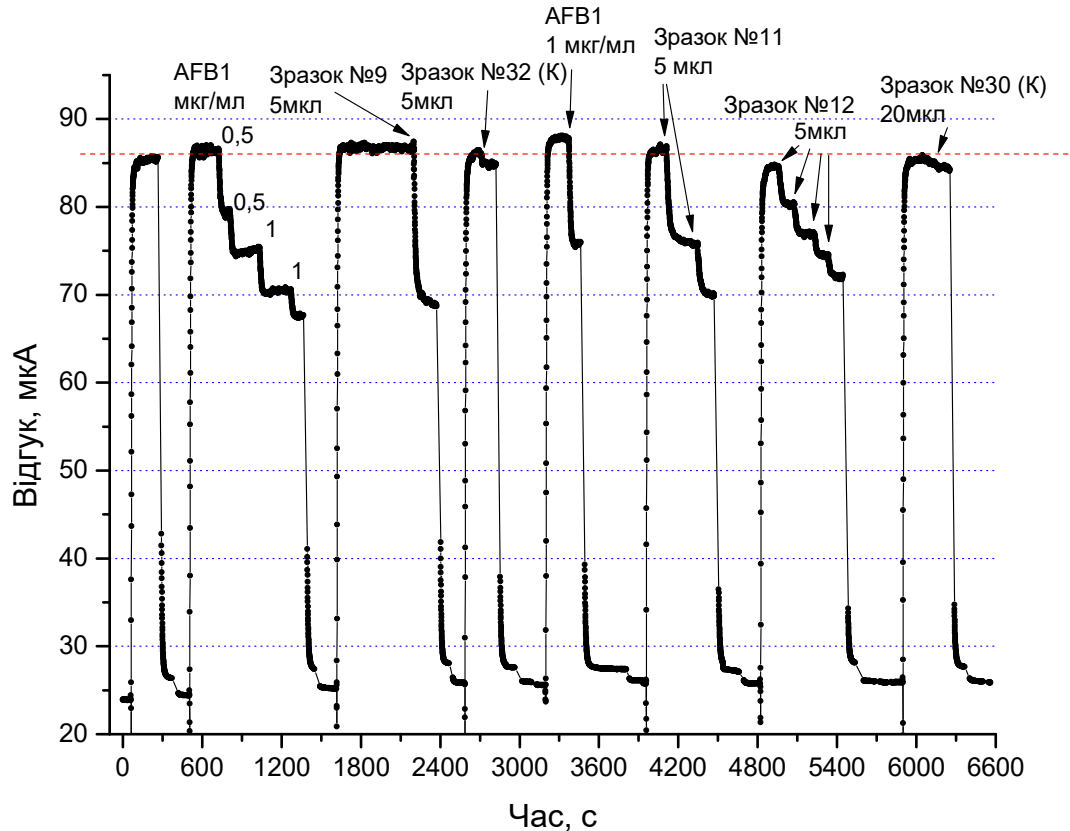


Рисунок 5.31 – Сенсограма біосенсора на основі 2% АцХЕ, іммобілізованої в біоселективну мембрану. Зразки №9, 11, 12. Контроль – зразки № 30 та 32

У цьому випадку видно, що біосенсор добре працює не тільки в одному циклі аналізу для одного токсичного зразка, але й дозволяє цілком успішно, без втрати чутливості і стабільності аналізувати кілька проб одночасно. Також спостерігається стабільність роботи і відповідність проміжних підкалібровок і контрольних вимірів. При оцінці вмісту афлатоксинів у даних зразках отримано такі результати: зразок №9 (соя, інфікована *Aspergillus flavus*, штам Г30) - 1300 мкг/мл екстракту; зразок №11 (соя, інфікована *Aspergillus flavus*, штам М) - близько 480 мкг/мл

екстракту; зразок №12 (пшениця, інфікована *Aspergillus flavus*, штам М) - близько 150 мкг/мл екстракту.

За таким алгоритмом було проведено експерименти для всіх наданих нам зразків. Якісну і напівкількісну оцінку вмісту мікотоксинів вдалося успішно виконати для субстратів, заражених грибами *Aspergillus flavus* і *Aspergillus ochraceus*.

На рис. 5.32 представлено сенсограму визначення охратоксину в зразках №19 і № 20 - кукурудза і просо, інфіковані *Aspergillus ochraceus*, штам 3015, а також вплив (точніше, його відсутність) контрольного зразку № 26 - просо, не інфіковане мікотоксинами.

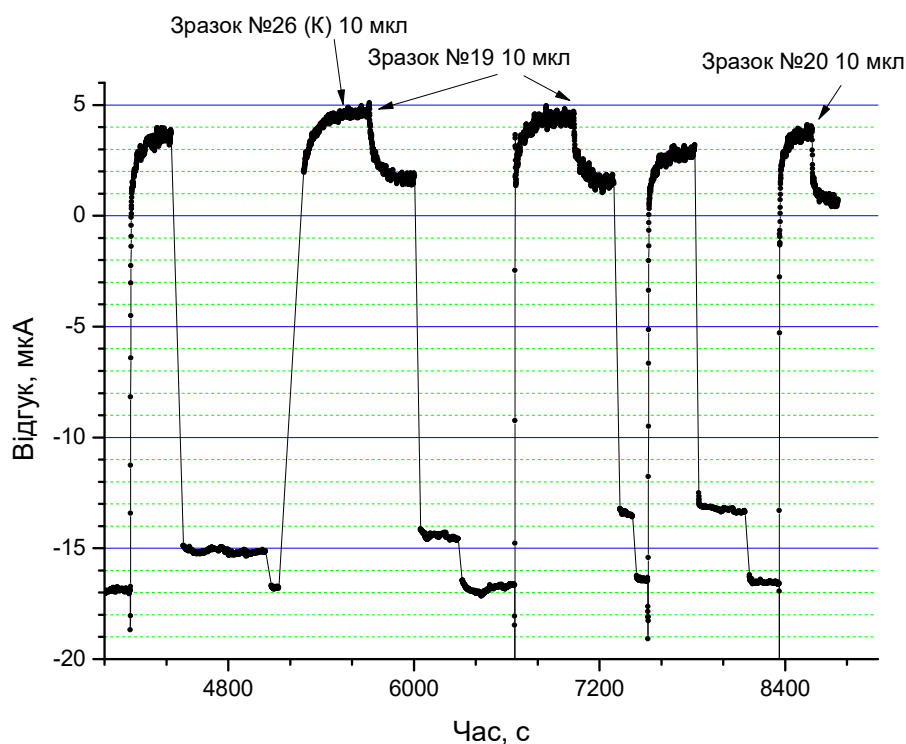


Рисунок 5.32 – Сенсограма біосенсора на основі АцХЕ, іммобілізованої в біоселективну мембрану. Зразки № 19, 20. Контроль – зразок № 26

За таким самим алгоритмом було проведено вимірювання для всіх наданих Інститутом мікробіології зразків. Якісну, напівкількісну і кількісну оцінку вмісту мікотоксинів вдалося успішно виконати для зразків насіння, заражених як грибами *Aspergillus flavus* так і *Aspergillus ochraceus*. В табл. 5.3 представлено результати вимірювань і розрахунку вмісту мікотоксинів у підготовлених зразках (соя,

пшениця, кукурудза, просо) за допомогою різних продуцентів афлатоксинів. В таблиці представлені зведені дані цих вимірів.

Таблиця 5.3 – Зведені дані вмісту мікотоксинів

№ зразка	Штам	Субстрат	Мікотоксини, мкг/мл
<i>Aspergillus flavus</i>			
1	801	Соя	582,5
2		Пшениця	193,2
3	973	Соя	479
4		Пшениця	128,5
5	NN	Соя	575
6		Пшениця	330
7	2979	Соя	225
8		Пшениця	246,7
9	Г30	Соя	1300
10		Пшениця	154
11	М	Соя	476
12		Пшениця	147
13	2980	Соя	330
14		Пшениця	420
15	1859	Соя	378
16		Пшениця	136
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
17	3045	Кукурудза	292,5
18		Просо	291,5
19	3015	Кукурудза	202,5
20		Просо	217,5
КОНТРОЛЬ			
25		Пшениця	-
26		Просо	-
27		Соя	-
28		Кукурудза	-

5.3.6 Висновки

Таким чином, в результаті виконання роботи за допомогою біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів і фермента ацетилхолінестерази проведено кількісний аналіз афлатоксинів в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса, спеціально інфікованих мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus* в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України із залученням музею культур грибів-продуцентів мікотоксинів. Підібрано оптимальну процедуру підготовки проб, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту афлатоксинів. Аналіз простий, швидкий та не потребує значного часу на його проведення.

5.4 Процедура роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів

5.4.1 Вступ

Разом із мікотоксинами (забруднювачами природного походження), харчові продукти можуть бути забруднені пестицидами (штучними токсинами неприродного походження). Як сільськогосподарські інсектициди найчастіше використовуються фосфороорганічні пестициди. Їм притаманний дуже високий рівень токсичності, тому раніше вони використовувались як потенційні агенти хімічної зброї [52].

На сьогодні розроблено цілу низку різних електрохімічних біосенсорів для детектування токсичних речовин: амперометричні [53], потенціометричні [54, 55], колориметричні [56], кондуктометричні [57]. Але зовсім невелика кількість розроблених біосенсорів адаптовано для роботи в реальних умовах з токсичними зразками. Крім того, всі вони не є повністю селективними до окремих токсинів. Нами був використаний потенціометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази. Його традиційним недоліком є чутливість до великого класу токсинів різної природи. Селективне визначення окремих класів токсичних речовин за допомогою такого біосенсора є нетривіальною задачею. Тому метою цієї частини роботи була розробка та оптимізація процедури селективного аналізу

мультикомпонентних зразків, в складі яких є як пестициди, так і афлатоксини, за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази.

5.4.2 Відпрацювання оптимальної процедури інгібування трихлорфоном

Серед токсинів, що інгібують АцХЕ є як необоротні (важкі метали, фосфорорганічні пестициди, тощо), так і оборотні інгібітори (глікоалкалоїди, мікотоксини та інші) [58]. Наприклад, афлатоксин В1 інгібуює АцХЕ необоротно, а в свою чергу пестицид трихлорфон є необоротним інгібітором. Механізм дії цих інгібіторів відрізняється, тому перш за все необхідно було підібрати оптимальну процедуру біосенсорного вимірювання для кожного з них.

Перш за все було визначено, що при 8 мМ АцХХ спостерігається найбільший рівень інгібування АцХЕ в складі мембрани біосенсора, тому в наступних експериментах саме 8 мМ АцХХ було обрано як робочу концентрацію субстрату.

Зазвичай у випадку оборотних інгібіторів відсутня залежність від часу інгібування ензиму після внесення токсинів в електрохімічну комірку та послідовності внесення субстрату та токсину в комірку [20]. Тому нашим першим завданням було підібрати оптимальну процедуру інгібування ензиму пестицидом трихлорфон. Було досліджено три різні методики інгібування АцХЕ трихлорфоном (рис. 5.33), а саме:

- 1) Після отримання відгуку біосенсора на додавання субстрату АцХХ, в комірку вносили пестицид трихлорфон до кінцевої концентрації 250 мкМ, після чого чекали 20 хв за інтенсивного перемішування. Процедура не дала очікуваних результатів, інгібіторного ефекту, вираженого в зменшенні сигналу, виявлено не було. Після відмивки біосенсора буферним розчином, додавали знову АцХХ, величина відгуку біосенсора була такою ж, як і до внесення токичної речовини.
- 2) В буферний розчин з біосенсором додавали пестицид трихлорфон, чекали 20 хв за інтенсивного перемішування, після чого отримували відгук на додавання в комірку АцХХ. Експеримент знову не дав очікуваного результату, оскільки зменшення відгуку біосенсора на внесення АцХХ було в межах похибок.

3) Після отримання відгуку біосенсора на внесення в комірку субстрату, біосенсор на основі АцХЕ, розчин пестициду трихлорфон концентрацією 250 мкМ додавали безпосередньо на сам датчик та інкубували його протягом 20 хв. Далі біосенсор відмивали від інгібітора буферним розчином та знову одержували відгук на ту ж саму концентрацію АцХХ. Було отримано зменшення сигналу на 70%.

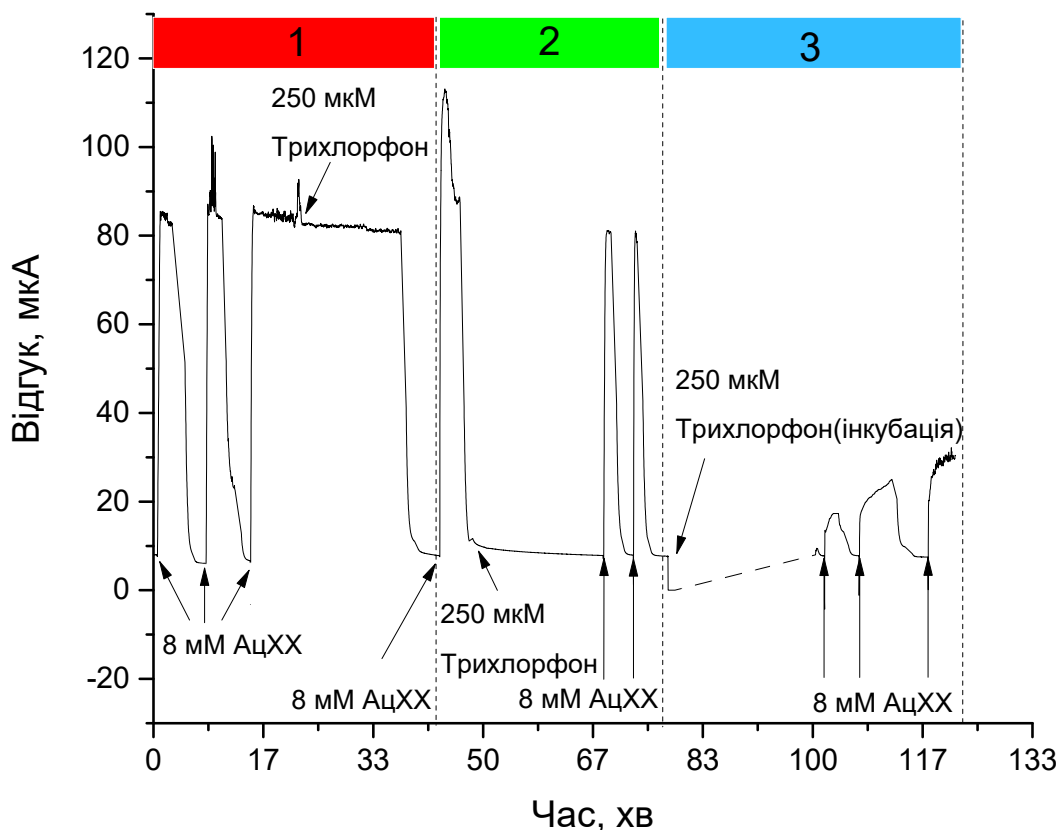


Рисунок 5.33 – Типові сигнали біосенсора за різних процедур інгібування АцХЕ пестицидом трихлорфон (1-додавання трихлорфону в комірку з субстратом; 2 - додавання трихлорфону в комірку без субстрата; 3 – інкубація біосенсора в краплі розчину трихлорфону)

З рисунка видно, що ефект інгібування було отримано лише при інкубації біосенсора в розчині трихлорфону, але така процедура не є варіантом для роздільного визначення пестицидів та афлатоксинів в мультикомпонентних зразках. Було проведено ще один експеримент, в якому пестицид трихлорфон додавали у

комірку з інтенсивним перемішуванням до кінцевої концентрації 250 мкМ, через 3 хвилини перемішування вимикали та чекали ще 30 хвилин, після чого знову отримували відгуки на АцХХ (рис. 5.34).

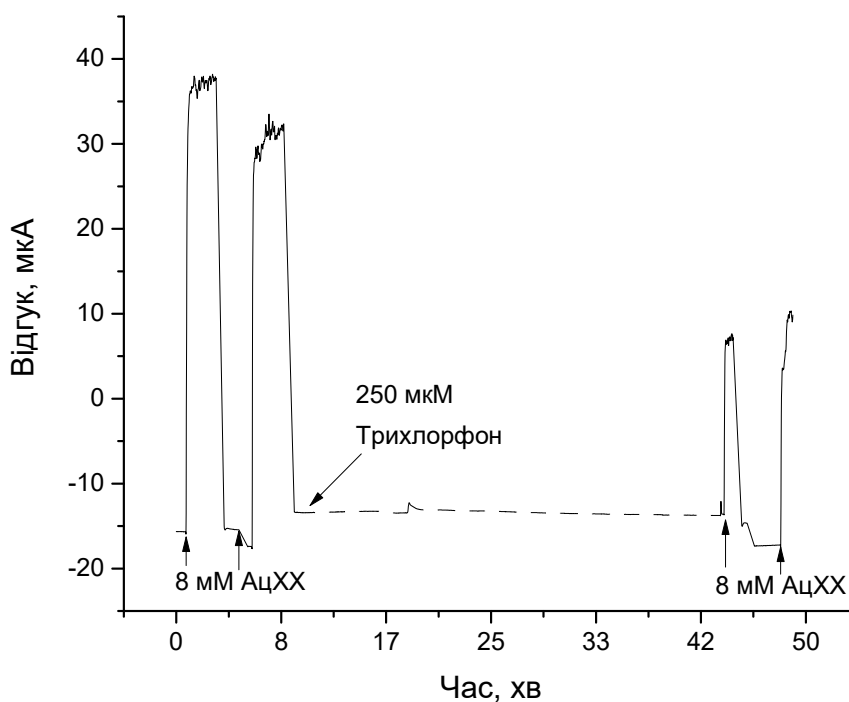


Рисунок 5.34 – Процес інгібування АцХЕ в мембрані біосенсора трихлорфоном з вимкненим перемішуванням

В результаті досліджень було отримано рівень інгібування АцХЕ – 51,8 %. Саме таку процедуру інгібіторного визначення трихлорфону з вимкненим перемішуванням було обрано для проведення наступних експериментів.

Подальшим етапом роботи був підбір робочої концентрації ацетилхолінхлориду (АцХХ) як субстрату фермента АцХЕ, для інгібіторного аналізу. При проведенні цих досліджень було отримано відгуки на різні концентрації АцХХ. Концентрації субстрату в комірці об'ємом 2,5 мл задавали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованого 500 мМ розчину АцХХ.

У випадку інгібування ферменту афлатоксином АФВ1 додавали невеликі аліквоти концентрованого розчину токсину в робочу комірку з субстратом

концентрації 6,4 мкМ, після цього вимірювали зменшення сигналу біосенсора. У випадку інгібування ферменту 75 мкМ трихлорфоном, додавання інгібітора і процедура визначення відбувалися за попередньо вибраною методикою (рис. 5.34). Після кожного етапу біоселективний елемент промивали на протязі 5 хв робочим буферним розчином для видалення надлишків продуктів реакції, інгібітору та субстрату.

Наступним завданням був підбір оптимального часу інгібування АцХЕ пестицидом трихлорфон з концентрацією 75 мкМ. Додавання трихлорфону відбувалося згідно з попередньо підібраною процедурою у комірку з буферним розчином без перемішування. Діаграма залежності рівня інгібування біосенсора пестицидом трихлорфон від часу інгібування наведено на рис. 5.35.

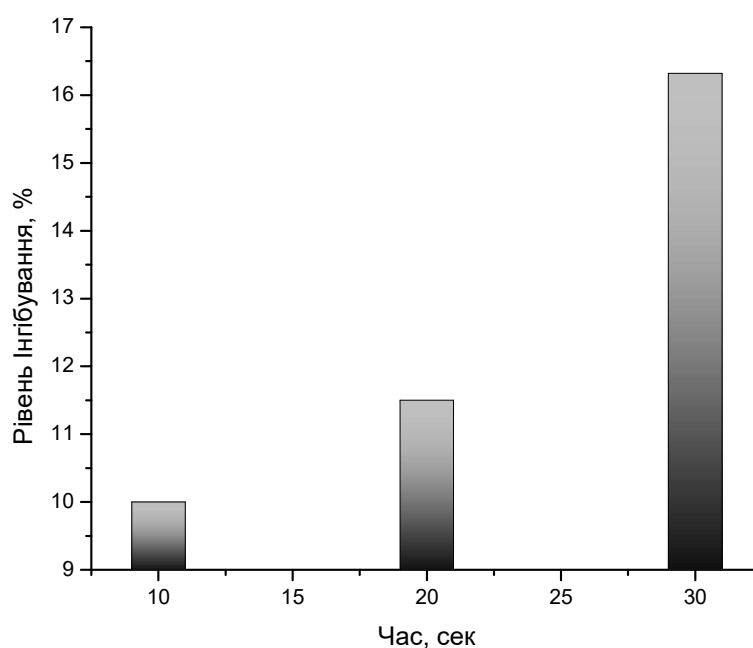


Рисунок 5.35 – Залежність рівня інгібування АцХЕ в мембрані біосенсора трихлорфоном від часу інкубації в розчині пестицида. Концентрація АцХХ – 8 мМ, концентрація трихлорфону – 75 мкМ

Згідно отриманих результатів 30 хв було обрано як оптимальний час інгібування при проведенні наступних експериментів.

5.4.3 Відпрацювання процедури реактивації ферменту після інгібування

Наступним кроком роботи було визначення оптимальної концентрації реактиватора ПАМ-2 та часу реактивації ферменту АцХЕ в мембрані після його інгібування трихлорфоном.

Для проведення оптимізації такої процедури реактивації було виконано чотири серії експериментів з використанням різних концентрацій реактиватора ПАМ-2. В кожній серії експериментів використовували інгібування біоселективного елементу біосенсора трихлорфоном на протязі 30 хвилин. Підбирали такі концентрації трихлорфону, щоб рівень інгібування АцХЕ знаходився в межах від 0 до 100%. В результаті досліджень було отримано, що концентрація 0,01 мМ ПАМ-2 є недостатньою для відновлення активності фермента навіть тоді, коли рівень інгібування трихлорфоном був достатньо низьким (рис. 5.36). Використовуючи концентрацію 0,1 мМ ПАМ-2 реактивація АцХЕ відбувалась тільки у випадку, коли інгібування ферменту трихлорфоном було не більше 50%. Концентрація 10 мМ ПАМ-2 виявилась достатньою, щоб відновити активність фермента навіть після інгібування приблизно на 85%, коли використовуються інгібітори з високою концентрацією. Тому в подальших експериментах для реактивації ацетилхолінестерази була обрана 10 мМ концентрація ПАМ-2.

Наступним завданням роботи було дослідження рівня реактивації активності іммобілізованої АцХЕ в залежності від часу інкубації біосенсора в 10 мМ розчині ПАМ-2. Після інгібування фермента 75 мкМ трихлорфоном на рівень 85%, датчик відмивали в буферному розчині та додавали реактиватор ПАМ-2 безпосередньо у комірку, після чого чекали деякий час та отримували новий відгук на додавання тієї ж самої концентрацію АцХХ.

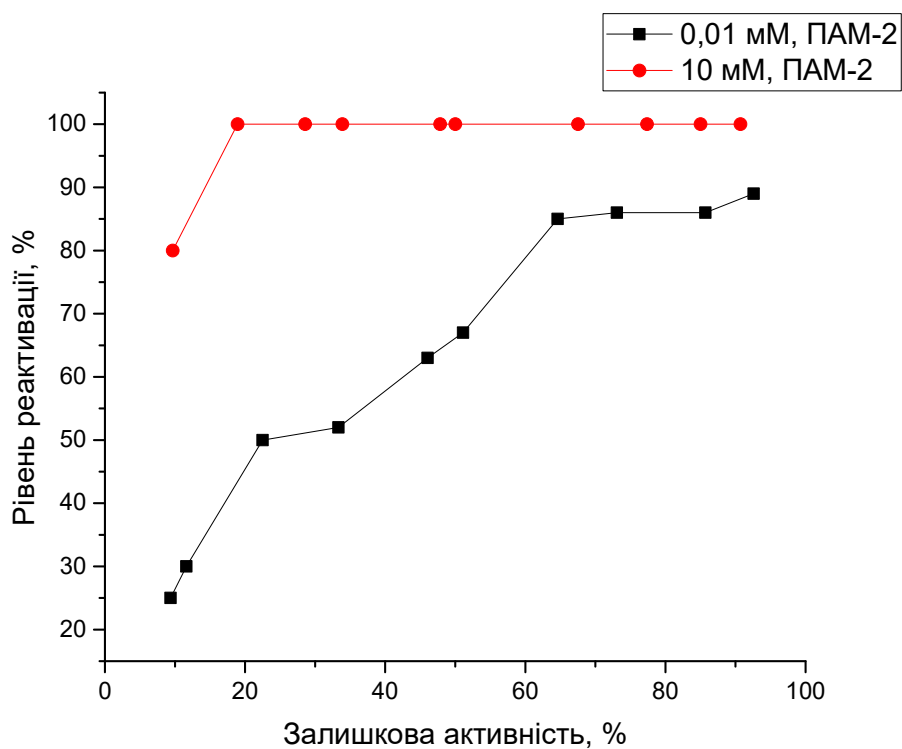


Рисунок 5.36 – Залежність рівня реактивації ацетилхолінестерази в складі біосенсора від її залишкової активності. Попереднє інгібування трихлорфоном, концентрації ПАМ-2 - 10 мМ та 0,01 мМ

Діаграма залежності залишкової активності іммобілізованої АцХЕ від часу реактивації датчика в розчині ПАМ-2 наведено на рис. 5.37.

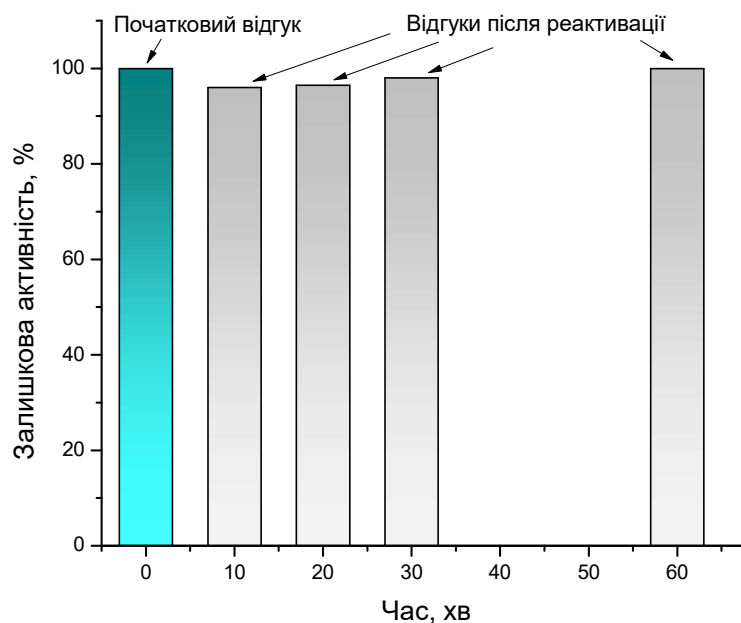


Рисунок 5.37 – Залежність залишкової активності АцХЕ від часу реактивації в розчині ПАМ-2 концентрацією 10 мМ. Концентрація АцХХ – 8 мМ, концентрація трихлорфону – 75 мкМ

З рисунку видно, що оптимальним часом реактивації АцХЕ в розчині ПАМ-2 є 30 хв, оскільки різниця між відгуками на субстрат до інгібування та після реактивації становить приблизно 2%, що відповідає майже повній реактивації фермента. При цьому, така процедура не потребує так багато часу, як при реактивації в розчині ПАМ-2 протягом 60 хв.

5.4.4 Відпрацювання оптимальної процедури інгібування афлатоксином В1

Наступним завданням роботи був підбір процедури інгібування іммобілізованої АцХЕ в складі біосенсора афлатоксином В1. Досліджували дві процедури інгібування (рис. 5.38):

- 1) Після отримання відгуку на субстрат АцХХ з кінцевою концентрацією 8 мМ, відразу в комірку з біосенсором додавали АФВ1 в до кінцевої концентрації 12,8 мкМ, після чого чекали 30 хвилин та оцінювали рівень інгібування.

2) В комірку з біосенсором, заповнену буфером без субстрату, додавали афлатоксин, інтенсивно перемішували протягом 3 хв., вимикали і чекали ще 30 хвю. Потім в комірку додавали 8 мМ АцХХ і отримували відгук біосенсора.

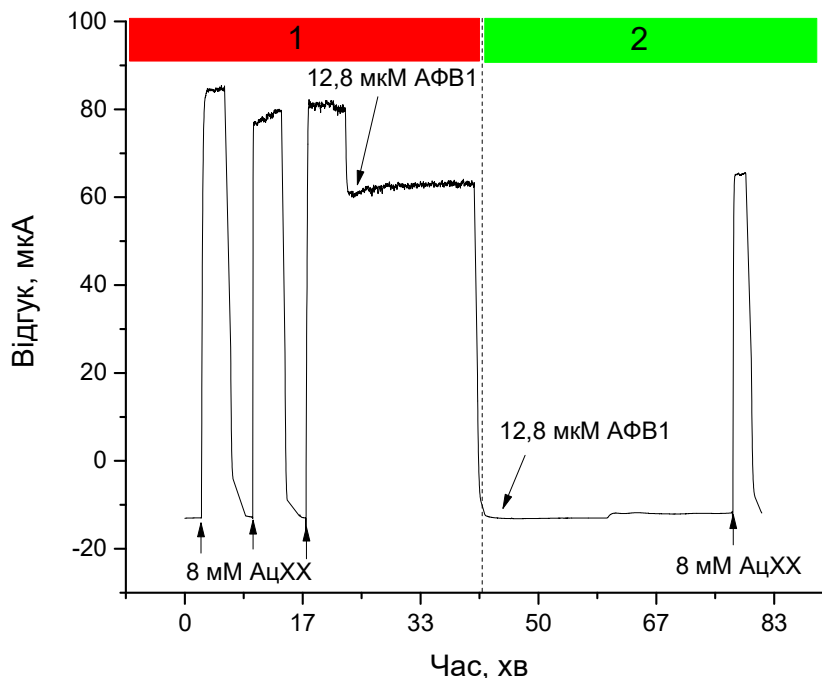


Рисунок 5.38 – Типові сигнали біосенсора за різних процедур інгібування АцХЕ афлатоксином В1

З рисунку видно, що обидві процедури інгібування призводять до одного і того ж рівня інгібування ферменту (18,4%), тому саме друга процедура була обрана для подальшої роботи, тому що вона є оптимальною для інгібування як афлатоксином, так і трихлорфоном.

5.4.5 Дослідження синергізму дії трихлорофону та афлатоксину В1 при інгібуванні іммобілізованої ацетилхолінестерази

Наступним завданням роботи було дослідження синергізму дії афлатоксину В1 та трихлорофону при спільному інгібуванні ними ацетилхолінестерази, іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів. Для оцінки синергізму між ціми двома речовинами та інтерпретації отриманих результатів використовували метод ізоболограм [59]. На такому графіку токсичний вплив двох речовин відкладаються на осях x та y , а ізоболі представляють собою лінії, що зв'язують рівноефективні інгібуючі впливи цих речовин разом та поодиночі.

При побудові такої діаграми вплив кожної речовини перераховується в комплексні одиниці токсичності, що відкладаються на осях x та y . Точки, що знаходяться значно нижче кривої концентраційного додавання, визначають ефект синергізму, який виражається в багатократному збільшенні комбінованого ефекту впливу суміші речовин у порівнянні із впливом цих компонент окремо. Точки, що знаходяться над кривою концентраційного додавання, відповідають за ефект додавання. В цьому випадку комбінований ефект інгібіторного впливу суміші дорівнює сумарному ефекту інгібіторних впливів цих окремих компонент. Точки, які лежать за межами границі незалежності однієї компоненти від іншої, відповідають за ефект антагонізму, коли відбувається зменшення комбінованого ефекту впливу суміші речовин у порівнянні із впливом окремих компонентів. Одиниця токсичності для кожної суміші компонентів визначається як відношення ефекту інгібування фермента кожною компонентою поодиночі до ефекту інгібування фермента їхньою сумішшю [59]. Ізобольні діаграми для різних співвідношень афлатоксину АФВ1 та трихлорфону наведено на рис. 5.39.

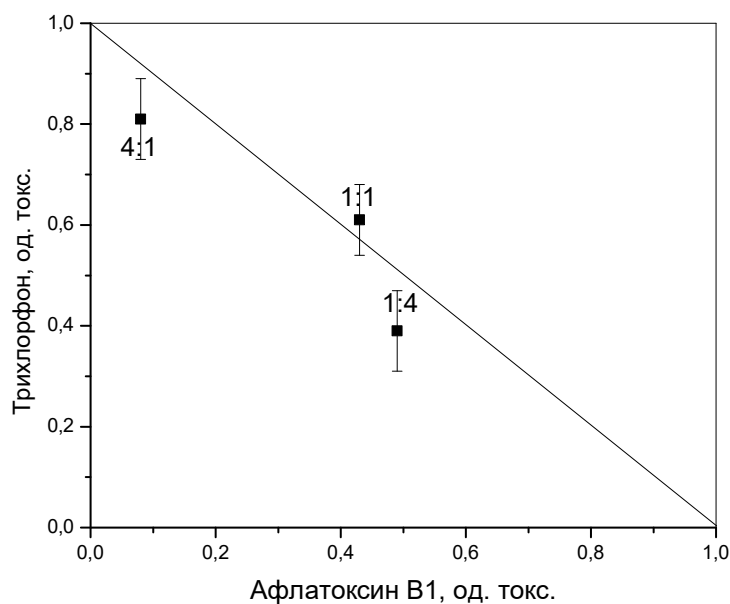


Рисунок 5.39 – Ізобольна діаграма інгібування АцХЕ для різних співвідношень сумішей афлатоксину АФВ1 та пестициду трихлорфону

Показано, що у випадку інгібування іммобілізованої АцХЕ різними сумішами пестициду трихлорфону та афлатоксину АФВ1 ми отримуємо точки, що знаходяться в межах кривої концентраційного додавання, що відповідає ефекту додавання.

5.4.6 Аналіз трихлорофону та афлатоксину В1 в суміші

Останнім завданням дослідження було визначення афлатоксину В1 та трихлорофону в суміші (рис.5.40). Для цього спочатку отримували відгук біосенсора на додавання 8 мМ АцХХ. Після відмивки датчика буферним розчином, додавали суміш токсинів безпосередньо у комірку з буферним розчином та чекали 3 хв. за інтенсивного перемішування. Потім перемішування вимикали і чекали ще 30 хвилин. Після цього знову додавали 8 мМ АцХХ і отримували відгук біосенсора. Рівень сумарного інгібування АцХЕ АФВ1 та трихлорфоном складав $I_{\text{Трих}} + I_{\text{АФВ1}} = 37,2\%$.

Біосенсор знову відмивали буферним розчином та отримували ще один відгук на внесення субстрату, який виявився більшим ніж попередній. Це можна пояснити тим, що афлатоксин В1 на відміну від трихлорфону інгібує ацетилхолінестеразу

оборотньо. Рівень інгібування вже складав 16,8%, що відповідало тільки необоротньому інгібуванню фермента трихлорфоном. Таким чином можна просто вирахувати інгібування кожною компонентою окремо. Для трихлорфону рівень інгібування складає $I_{\text{Трих}} = 16,8\%$, а для афлатоксину В1 рівень інгібування складає $I_{\text{АФВ1}} = 37,2 - 16,8 = 20,4\%$.

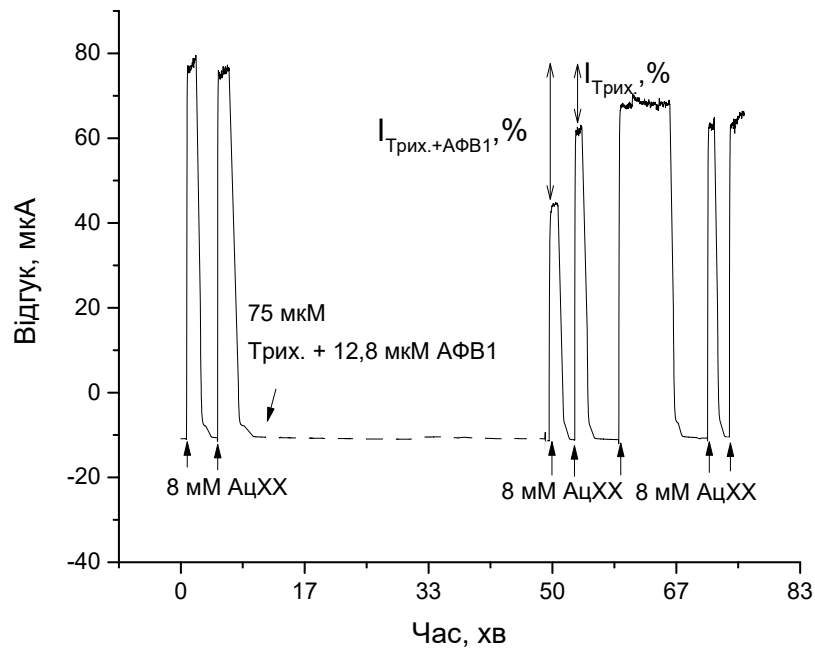


Рисунок 5.40 – Типові сигнали біосенсора при одночасному визначенні афлатоксину В1 та трихлорфону в суміші

Реактивація датчика в 10 мМ розчині ПАМ-2 призводила до повного відновлення активності іммобілізованої АцХЕ, і біосенсор знову був готовий для використання.

5.4.7 Висновки

Таким чином було розроблено та оптимізовано процедуру селективного аналізу мультикомпонентного зразку, в складі якого є як пестициди так і афлатоксини, використовуючи потенціометричний біосенсор на основі фермента ацетилхолінестерази.

5.5 Можливість визначення токсичних сполук різної природи

На наступному етапі роботи ми досліджували вплив токсичних речовин різних класів, тобто афлатоксинів, органофосфатних пестицидів, іонів важких металів та глікоалкалоїдов - на рівень інгібування АцХЕ, іммобілізованої на поверхні кондуктометричних перетворювачів. Було обрано по одному із представників кожного класу токсинів: АФВ1, трихлорфон, нітрит міді та α -соланін відповідно. На рис. 5.41 представлено вплив різних концентрацій обраних інгібіторів на рівень інгібування біоселективного елементу. Кожна точка являє собою середнє значення повторних вимірів.

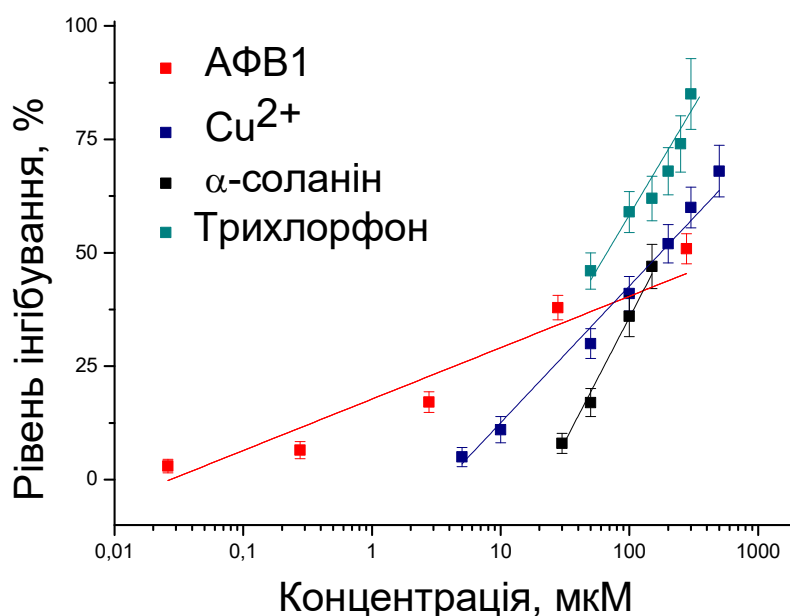


Рисунок 5.41 – Залежність рівня інгібування біоселективного елементу на основі АцХЕ від концентрації трихлорфону, іонів Cu^{2+} , афлатоксину В1 та альфа-соланіну. Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5, при кімнатній температурі

Як показано на рис. 5.41, чутливість та лінійний діапазон біосенсора сильно залежить від класу токсичної речовини. Ми можемо бачити, що чутливість біосенсора зменшується в наступному порядку: α -соланін > трихлорфон > Cu^{2+} > АФВ 1. Найширший лінійний діапазон був отриманий для АФВ 1 (0,28-280 мкМ, що відповідає 0,09-90 мкг/мл). Лінійний діапазон для визначення Cu^{2+} складає

10 - 500 мкМ, в той час як інші ензимні системи, такі як уреаза [60] або триферментна система (глюкозооксидаза / мутаротаза / інвертаза) [61], є більш чутливі до іонів важких металів. За допомогою пропонованого біосенсора на основі АцХЕ можна визначити глікоалколоїд α -соланін тільки при концентраціях понад 30 мкМ, в той час як концентрації 1-2 мкМ, більш ймовірно будуть знайдені в реальних зразках. Біосенсор на основі бутирилхолінестерази (БуХЕ), як повідомляється, є більш адекватним для визначення глікоалкалоїдів [62].

Таким чином, аналізуючи результати, можна зробити висновок, що розроблений біосенсор на основі АцХЕ є ефективним інструментом для кількісного аналізу афлатоксинів або для визначення загальної токсичності зразка.

Було також виявлено, що відгуки біосенсора після інгібіторного аналізу відновлюються по-різному в залежності від класу токсичних речовин, що досліджується (таблиця 5.4).

Таблиця 5.4 – Деякі параметри інгібування та реактивації АцХЕ різними токсичними речовинами

Токсична речовина	Тип інгібування	Лінійний діапазон, мкМ	Реактиватор	Час реактивації, хв
Афлатоксини	Оборотне	0,02-170	Фосфатний буфер	3-5
Фосфорорганічні пестициди	Необоротне	25-300	ПАМ-2	30
Іони важких металів	Необоротне	5-1200	ЕДТА	30
Глікоалкалоїди	Оборотне	20-140	Фосфатний буфер	3-5

Для відновлення відгуку біосенсора після аналізу оборотних інгібіторів, таких як афлатоксини або глікоалкалоїди, достатньо звичайної відмивки мембрани робочим буфером протягом декількох хвилин. Як вже згадувалось, відновлення біоселективної мембрани після впливу необоротних інгібіторів, таких як фосфорорганічні пестициди та важкі метали, потребують використання спеціальних

реактиваторів. Для повторного використання біосенсорного елементу на основі АцХЕ використовували пралідоксим (ПАМ-2), в той час, коли для відновлення ензиматичної активності після аналізу важких металів є доцільним використання етилендіамінтетраацетату (ЕДТА).

Подібні результати було отримано для біосенсора на основі БуХЕ (таблиця 5.5).

Таблиця 5.5 – Деякі параметри інгібування та реактивації БуХЕ різними токсичними речовинами

Токсична речовина	Тип інгібування	Лінійний діапазон, мкМ	Реактиватор	Час реактивації, хв
Афлатоксини	Оборотне	5-300	Фосфатний буфер	5-10
Фосфорорганічні пестициди	Необоротне	10-900	ПАМ-2	30
Поверхнево активні речовини	Оборотне	20-1000	Фосфатний буфер	30-40
Іони важких металів	Необоротне	1-1000	ЕДТА	30
Глікоалкалоїди	Оборотне	0,2-80	Фосфатний буфер	5-10

Ці результати дозволяють запропонувати метод селективного визначення токсичних речовин різної природи за допомогою біосенсорів на основі холінестераз.

5.6 Висновки

В результаті проведених досліджень продемонстровано можливість аналізу реальних зразків з використанням розроблених електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз.

Проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі, вирощених на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Voigneville, Франція) та виведених методом традиційної селекції співробітниками Інституту картоплярства УААН, а також в комерційних сортах томатів, підібрано оптимальну процедуру підготовки проб картоплі та томатів, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту глікоалкалоїдів. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора, з даними, які отримані за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (коефіцієнт кореляції $R = 0,93$).

Вперше проведено кількісний аналіз афлатоксинів в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса, спеціально інфіковані мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus* в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України із залученням музею культур грибів-продуцентів мікотоксинів, підібрано оптимальну процедуру підготовки проб, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту афлатоксинів. Аналіз є простим, швидким та не потребує значного часу на його проведення. Результати аналізу підтверджено методом високоефективної рідинної хроматографії.

Розроблено та оптимізовано процедуру селективного аналізу мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди за допомогою потенціометричного біосенсора на основі ацетилхолін естерази. Для уточнення класу необоротних інгібіторів можна застосовувати процес селективної реактивації, що дає змогу розділити між собою пестициди та іони важких металів.

5.7. Література

1. FAO Production Yearbook. Vol. 46. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy; 1992.
2. Baup M. Extrait d'une lettre sur plusieurs nouvelles substances. *Ann Chim Phys.* 1826;31:108–109.
3. Jadhav JS, Sharma RD, Salunkhe DK. Naturally occurring toxic alkaloids in food. *Crit Rev Toxicol.* 1981;9:21–104.
4. Friedman M, McDonald G. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit Rev Plant Sci.* 1997;16:55–132.
5. Johnson H, Hellenas K-E. Glycoalkaloids in Swedish potatoes. *Vår Föda.* 1983;12:299–314.
6. Clement E, Verbist J F. Determination of solanine in L. tubers: comparative study of 9 colorimetric methods. *Lebensm-Wissen U Technol.* 1980;13(6):202–206.
7. Jonker HH, Koops AJ, HoogenDoorn JC. A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC. *Amer J Potato Res.* 1992;35(6):451–455.
8. Crabbe PG, Fryer C. Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and solasodin by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1980;187(2):87–100.
9. Houben RJ, Brunt K. Determination of glycoalkaloids in potato tubes by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1994;66(1):169–174.
10. Ferreira F, Moyna P, Soule S, Vazquez A. Rapid determination of Solanum alkaloids by thin-layer chromatographic scanning. *J Chromatogr.* 1993;653(6):380–384.
11. Chen S, Derrick PJ, Mellon FA, Price KR. Analysis of glycoalkaloids from potato shoots and tomatoes by four-sector tandem mass spectrometry with scanning-array detection: comparison of positive ion and negative ion methods. *Anal Biochem.* 1994;218(1):157–169.
12. Evans S, Buchanan R, Hoffman A, Mellon FA, Price KR, Hall S, Walls FC, Burlingame AL, Chen S, Derrick PJ. Structural characterization of a glycoalkaloid

- at the femtomole level by means of four-sector tandem mass spectrometry and scanning-array detection. *Org Mass Spectr.* 1993;28(1):289–290.
13. Osman SF, Johns TA, Price KR. Sisunine, a glycoalkaloid found in hybrids between *Solanum acaule* and *Solanum ajanhuiri*. *Phytochemistry.* 1986;25(1):967–968.
 14. Harvey MH, Morris BA, McMillan M, Marks V. Measurement of potato steroidal alkaloids in human serum and saliva by radioimmunoassay. *Human Toxicology.* 1985;4:503–512.
 15. Hunter IR, Walden MK, Wagner JR, Heftmann E. High-pressure liquid chromatography of steroidal alkaloids. *J Agr and Food Chem.* 1976;19(2):223–226.
 16. Bushway RJ, Barden ES, Bushway AW, Bushway AA. High-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids. *J Chromatogr.* 1979;178(5):533–541.
 17. Morris SC, Lee TH. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*). *Food Technol Aust.* 1984;36(2):118–124.
 18. Pihak L, Sporns P. Enzyme Immunoassay for Potato Glycoalkaloids. *J Agr and Food Chem.* 1992;40(2):2533–2540.
 19. Friedman M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J. Chromatogr A.* 2004;1054(1–2):143–155.
 20. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosens Bioelectron.* 2003;18:1047–1053.
 21. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. *Sensors Actuators B.* 2004;103:416–422.

22. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. *Anal Letters*. 2004;37(8):1–14.
23. Hellenäs K-E, Branzell C. Liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in potato tubers, NMKL Interlaboratory study. *J AOAC Int*. 1997;80:549–554.
24. Sindén SL, Webb RE. Effect of variety and location on the glycoalkaloids content of potatoes. *Am Potato J*. 1972;49:334–338.
25. Verbist JF, Monnet R. The solanine content of small new tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res*. 1979;22:239–244.
26. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Amended values. European Commission. 2014.
Доступно на: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20140701&from=FR>
27. Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;37:120–126.
28. Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Anal Chim Acta*. 2015;901:12–33.
29. Selvaraj JN, Zhou L, Wang Y, Zhao Y-j, Xing F-g, Dai X-f, Liu Y. Mycotoxin detection- Recent trends at global level. *J Integr Agr*. 2015;14:2265–2281.
30. Pereira VL, Fernandes JO, Cunha SC. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Tr Food Sci Technol*. 2014;36:96–136.
31. Meneely JP, Ricci F, Van Egmond HP, Elliott CT. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends Anal Chem*. 2011;30:192–203.
32. Yao H, Hruska Z, Diana Di Mavungu J. Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin J*. 2015;8:181–191.

33. Shephard GS. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395:1215–1224.
34. Li P, Zhang Z, Hu X, Zhang Q. Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects. *Mass Spectrom Rev.* 2013;32:420–452.
35. Garrido Frenich A, Romero-Gonzalez R, Aguilera-Luiz MM. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *Trends Anal Chem.* 2014;63:158–169.
36. O'Mahonya J, Clarke L, Whelan M, O'Kennedy R, Lehotay SJ, Danaher M. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food – Challenges and applications. *J Chrom A.* 2013; 292:83–95.
37. Solfrizzo M, De Girolamo A, Lattanzio VMT, Visconti A, Stroka J, Alldrick A, Van Egmond HP. Results of a proficiency test for multi-mycotoxin determination in maize by using methods based on LC-MS/(MS). *Qual Assur Saf Crop Foods.* 2013;5(1):15–48.
38. Hickert S, Gerding J, Ncube E, Hübner F, Flett B, Cramer B, Humpf H-U. A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples. *Mycotoxin Res.* 2015;31:109–115.
39. Martínez-Domínguez G, Romero-González R, Garrido Frenich A. Multi-class methodology to determine pesticides and mycotoxins in green tea and royal jelly supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Chem.* 2016;197:907–915.
40. Liao C-D, Wong JW, Zhang K, Yang P, Wittenberg JB, Trucksess MW, Hayward DG, Lee NS, Chang JS. Multi-mycotoxin Analysis of Finished Grain and Nut Products Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Positive Electrospray Ionization–Quadrupole Orbital Ion Trap High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2015;63:8314–8332.

41. McElhinney C, O’Kiely P, Elliott C, Danaher M. Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for the determination of mycotoxins in grass silages. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2015;32:2101–2112.
42. Breidbach A, Ulberth F. Two-dimensional heart-cut LC-LC improves accuracy of exact-matching double isotope dilution mass spectrometry measurements of aflatoxin B1 in cereal-based baby food, maize, and maize-based feed. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407:3159–3167.
43. Garrido Frenich A, Romero-Gonzalez R, Aguilera-Luiz MM. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *Trends Anal Chem*. 2014;63:158–169.
44. O’Mahonya J, Clarke L, Whelan M, O’Kennedy R, Lehotay SJ, Danaher M. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food – Challenges and applications. *J Chrom A*. 2013;1292:83– 95.
45. Dzuman Z, Vaclavikova M, Polisenska I, Veprikova Z, Fenclova M, Zachariasova M, Hajslova J. Enzyme-linked immunosorbent assay in analysis of deoxynivalenol: investigation of the impact of sample matrix on results accuracy. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(2):505–514.
46. Du H, Liu J, Xun Y, Liang J, Li S, Chen G. Determination of Deoxynivalenol, Zearalenone, Aflatoxin B1, and Ochratoxin by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Anal Lett*. 2014;47(11):1912–1920.
47. Liu BH, Hsu YT, Lu CC, Yu FY. Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*. 2013;30(1):184–189.
48. Jiang W, Wang Z, Nölke G, Zhang J, Niu L, Shen J. Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Food Anal Methods*. 2013;6(3):767–774.
49. Steiner WE, Brunschweiler K, Leimbacher E, Schneider R. Aflatoxins and Fluorescence in Brazil Nuts and Pistachio Nuts. *Agrlc Food Chem*. 1992;40:2453–2457.

50. Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*. 2001;93:153–157.
51. Bradburn N, Coker R D. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B1. *Food Chemiwy*. 1995;52:179–185.
52. Kazemi M, Tahmasbi AM, Valizadeh R, Naserian AA, Soni A. Organophosphate pesticides: A general review. *Agric Sci Res J*. 2012;2(9):512–522.
53. Li SC, Chen JH, Cao H, Yao DS, Liu DL. Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. *Food Control*. 2011;22:43–49.
54. Piermarini S, Micheli L, Ammida NHS, Palleschi G, Moscone D. Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B-1 detection. *Biosens. Bioelectr*. 2007;6:1434–1440.
55. Ammida HS, Micheli L, Piermarini S, Moscone D, Palleschi G. Detection of aflatoxin B-1 in barley: Comparative study of immunosensor and HPLC. *Anal Lett*. 2006;39:1559–1572.
56. Arduini F, Errico I, Amine A, Micheli L, Palleschi G, Moscone D. Enzymatic Spectrophotometric Method for Aflatoxin B Detection Based on Acetylcholinesterase Inhibition. *Anal Chem*. 2007;79:3409–3415.
57. Soldatkin OO, Burdak OS, Sergeyeva TA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. *Sensors Actuators B*. 2013;188:999–1003.
58. Stepurska KV, Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. *Anal Chim Acta*. 2015;854:161–168.
59. Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin OP. Investigation of main potato glycoalkaloids interaction in inhibition of immobilized butyryl cholinesterase by them. *Ukr. biokhim. Zhurnal*. 2006;78(5):155–161.

60. Zhylyak GA, Dzyadevich SV, Korpan YI, Soldatkin AP, El'skaya AV. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination. *Sensors Actuators B*. 1995;24(1–3):145–148.
61. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Pyeshkova VM, Kukla AL, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions. *Bioelectrochemistry*. 2012;83(1):25–30.
62. Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'Skaya AV, Gravouelle JM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*. 2005;66(1):28–33.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1 Можливості аналітичного застосування холінестераз для створення біосенсорів

Як вже було сказано раніше, біосенсиори на основі холінестераз знайшли своє широке застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук, які є інгібіторами холінестераз. Але їх також можна використовувати в прямому ензиматичному аналізі для визначення концентрації ацетилхоліну та бутирилхоліну. Крім того, інгібіторний ензиматичний аналіз в біосенсорах також застосовується в різних варіаціях. Можливості аналітичного застосування холінестераз в біосенсориці просумовано на рис. 6.1.

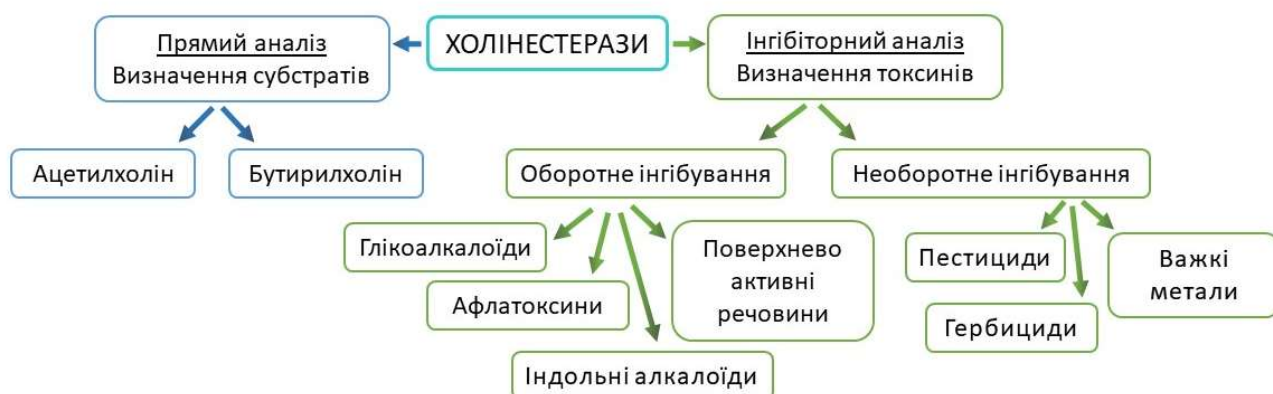


Рисунок 6.1 – Варіанти аналітичного застосування холінестераз при розробці біосенсорів

Було розроблено дизайн та оптимізовані електрохімічні перетворювачі на основі рН-чутливих польових транзисторів та кондуктометричних металевих гребінчастих електродів, що враховували особливості роботи при електрохімічних вимірюваннях. Технології виготовлення датчиків декілька разів модифікувались і, відповідно, змінювались їхні характеристики. Для кожної серії перетворювачів проводили комплекс досліджень основних параметрів датчиків та вносились зміни в технологічний цикл їхнього виробництва. В результаті було отримано

перетворювачі з характеристиками, що дозволили їх використання для створення біосенсорів на основі холінестераз.

Для роботи з такими перетворювачами розроблено та виготовлено експериментальні вимірювальні системи (в тому числі портативні) різної конфігурації, вимірювальні кювети та комірки різних модифікацій, що враховували подальше використання холінестераз як селективних елементів біосенсорів.

Наступним етапом роботи була розробка, дослідження та оптимізація методів іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів.

Порівняння різних методів іммобілізації ферментів показало, що для холінестераз оптимальним є такий метод іммобілізації як ковалентне зшивання ферменту в насичених парах глутарового альдегіду. Однак залишалось питання недостатньої відтворюваності самого процесу іммобілізації. Тому було введено процедуру додаткової хімічної очистки датчиків після їхнього монтажу. Це дозволило дещо стабілізувати адгезію іммобілізованих мембран. Було детально досліджено вплив модифікацій поверхні та вплив додаткових зовнішніх факторів на характеристики як самих перетворювачів, так і біосенсорів в цілому. Запропоновано декілька варіантів такої модифікації для покращення процедури іммобілізації, в тому числі з використанням наночастинок.

Було проведено детальне дослідження біохімічних параметрів іммобілізованих холінестераз, а саме констант Міхаеліса-Ментена та констант інгібування. Отримані нами величини певною мірою свідчать про відсутність значних конформаційних змін у холінестераз після процедури їхньої іммобілізації. Суттєва різниця в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсинами дозволяє адаптувати характеристики сенсорів під конкретні прикладні потреби.

Розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну. Ця модель описує біохімічні реакції, що проходять в ензимній мембрані біосенсора під час вимірювання α -чаконіну. Отримані результати чисельного моделювання є особливо важливими при роботі із токсичними речовинами та при створенні нових біосенсорів.

Відповідно, якщо усі питання, описані вище, з'ясовані та враховані, можна переходити до наступного кроку, а саме - розробки біосенсорів на основі холінестераз.

6.2 Процедура створення біосенсорів на основі холінестераз

В ході виконання даної дисертаційної роботи було створено цілу низку лабораторних прототипів електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз. Спираючись на досвід та враховуючи труднощі, що виникали в процесі цих розробок, було запропоновано покрокову процедуру створення електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз. Схему цієї процедури наведено на рис. 6.2.



Рисунок 6.2 – Схематичне представлення процедури створення електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз

Перш за все необхідно визначитись з методом аналізу і відповідно типом перетворювачів. Кондуктометрія – дуже чутливий метод, що є його великою перевагою, але, іноді, і недоліком, тому що метод вимірювань дуже залежить від складу середовища і чутливий до змін в середовищі. Потенціометричний метод є менш чутливим, він базується тільки на зміні рН, і не реагує на зміни в середовищі, що не призводять до змін рН. Але технологія виготовлення кондуктометричних датчиків значно простіша за виготовлення рН-чутливих польових транзисторів. Показано, що у випадку біосенсорів для визначення пестицидів, гербіцидів та важких металів краще підходить кондуктометричний метод вимірювань завдяки тому, що процеси інгібування токсинами та вимірювання можна розділити. У випадку ж визначення алкалоїдів та афлатоксинів краще використовувати біосенсиори на основі рН-чутливих польових транзисторів.

Наступним етапом роботи зі створення електрохімічних біосенсорів є підготовка перетворювачів. Спочатку очищені перетворювачі тестувались на придатність до використання у розробці біосенсорів. За результатами тестування, при необхідності, поверхню перетворювачів модифікували з метою покращення їхніх робочих параметрів. Далі досліджувались аналітичні характеристики перетворювачів. За результатами перевірки обирались найкращі перетворювачі зі схожими характеристиками.

Визначившись з методом вимірювань та необхідними перетворювачами, необхідно вибрати відповідні вимірювальні установки, схеми чи портативні прилади для роботи з біосенсорами.

Далі переходять до процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів. Метод іммобілізації підбирають за такими параметрами як чутливість біосенсора до субстрату та інгібітору, межа вимірювання, лінійний діапазон, шум та дрейф базової лінії, стабільність роботи протягом робочого дня. Також підбирають оптимальний склад біоселективних мембрани на основі холінестераз: співвідношення ензиму та БСА, концентрацію зшиваючого агенту та інших компонентів біоселективного елементу, та визначають оптимальні умови проведення цієї іммобілізації.

Отримані біосенсиори тестують за різних умов функціонування (рН, іонна сила та буферна ємність розчину) з метою вибору оптимального складу робочого буферного розчину. Перевіряють стабільність біосенсорів, а саме відтворюваність відгуків біосенсорів при безперервній роботі протягом дня, операційну стабільність протягом декількох тижнів та стабільність при довготривалому зберіганні. Також досліджують мінімальну межу визначення та отримують калібрувальну криву, за якою визначається лінійний діапазон та чутливість.

Останнім етапом розробки є апробація отриманих біосенсорів при роботі в реальних умовах для підтвердження працездатності біосенсорів та можливості їх практичного використання. Отримані результати обов'язково порівнюють з даними традиційних методів аналізу. За умови високої кореляції результатів, розробку біосенсора можна вважати завершеною. В результаті отримуємо діючий лабораторний прототип електрохімічного біосенсора на основі холінестераз, що може бути основою для створення промислового зразку відповідного біосенсора.

6.3 Методика селективного аналізу токсичних речовин різної природи за допомогою біосенсора на основі холінестераз

Аналіз отриманих даних дозволяє запропонувати метод селективного визначення токсичних речовин різної природи за допомогою біосенсора на основі холінестераз. Суть цього методу представлена у вигляді блок-схеми (рис. 6.3), що демонструє алгоритм аналізу.

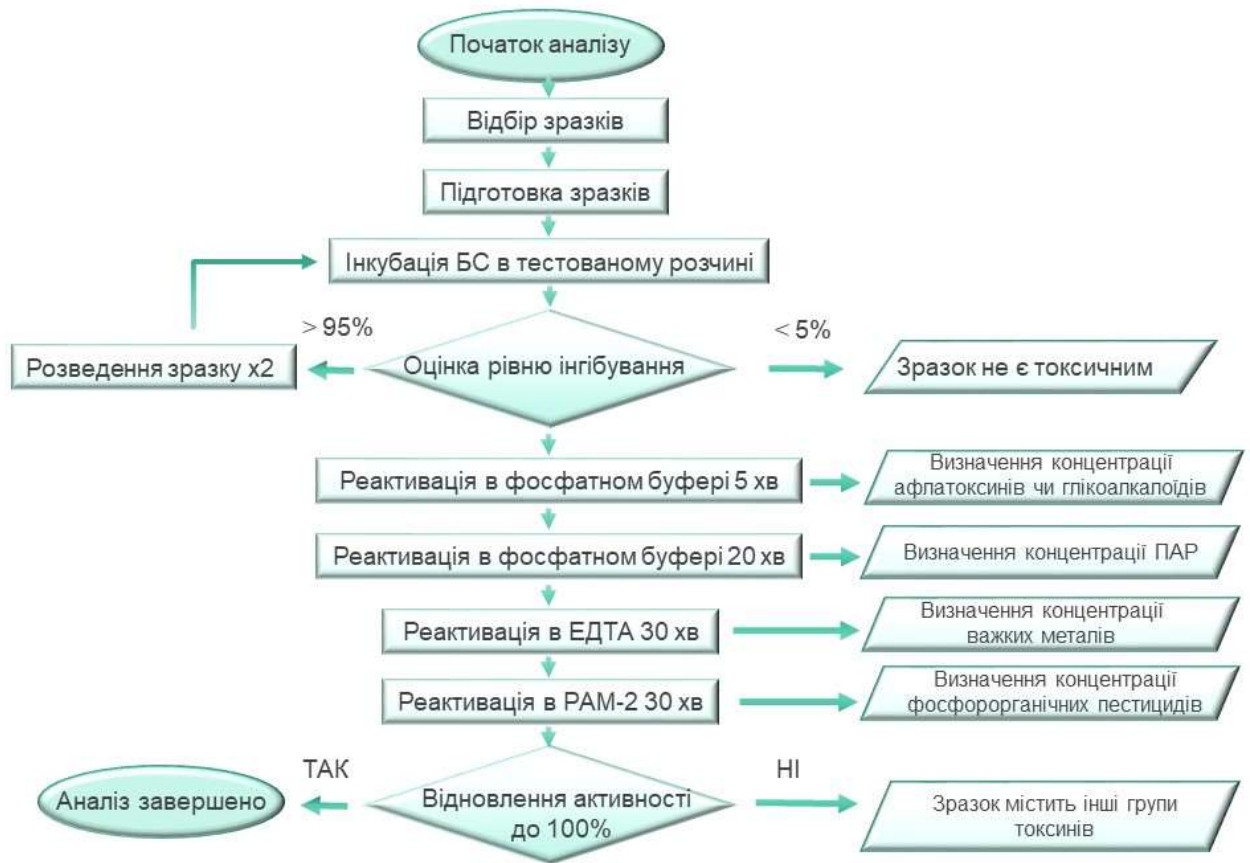


Рисунок 6.3 – Блок-схема інгібіторного аналізу за допомогою біосенсора на основі холінестераз з використанням етапу селективної реактивації біомембрани

На початку аналізу визначають робочу активність біомембрани, яка відповідає 100%. Далі біосенсор інкубують в аналізуємому розчині і визначають рівень інгібування ензиматичної біоселективної мембрани біосенсора: якщо вона менша за 5 %, то можна робити висновок, що концентрація токсичних речовин в зразку надто мала, щоб зареєструвати її біосенсором; якщо рівень інгібування більше за 95%, то зразок розводять до досягнення цієї величини в діапазоні від 5 до 95%. Далі, для того, щоб зробити висновок про токсичний склад зразку, на першому етапі біосенсор відмивають робочим буфером. Якщо спостерігається повне відновлення робочої активності ензиматичної мембрани протягом 5-10 хвилин, то можна робити висновок про наявність в зразку таких оборотних інгібіторів, як глікоалкалоїди, поверхнево активні речовини або афлатоксини, в залежності від походження зразку.

Для уточнення класу необоротних інгібіторів далі застосовується селективна реактивація. Спочатку біосенсор реактивують за допомогою ЕДТА, звільняючи ензиматичну мембрану від впливу іонів важких металів. Якщо після цього етапу спостерігається відновлення активності біомембрани, то можна робити висновок про наявність іонів важких металів. Якщо ж активність досі не відновлена до 100 %, то біосенсор реактивують за допомогою ПАМ-2 для виявлення фосфорорганічних пестицидів.

Таким чином, якщо після завершення аналізу та всіх етапів реактивації активність біоселективного елементу сенсора повністю відновлюється, то можна робити висновок про токсичний склад зразку, аналізуючи активність мембрани на кожному з етапів реактивації. Якщо ж активність, не відновила повністю, то скоріш за все зразок містить токсичні речовини, які не належать до жодного з перерахованих класів токсичних речовин. Але ми все ж таки можемо зробити висновок про загальну токсичність зразку, і, при необхідності, відправити зразок на додаткові аналізи.

6.4 Метрологічні дослідження

Для метрологічного забезпечення розроблених ензимних біосенсорів необхідно виконати комплекс заходів, які умовно можна розділити на чотири етапи, які відповідають структурним елементам вимірювальних систем. Це розробка метрологічного забезпечення для первинного вимірювального перетворювача, вторинного вимірювального перетворювача, вимірювача фізичної величини (провідність, струм, рН, тощо) та безпосередньо біосенсорної системи. Результати цих досліджень повинні бути виражені в узаконених одиницях фізичних величин і представлені в стандартній формі.

Перш за все необхідно мати еталони фізичних величин відповідного рівня. Взаємодія між ними регламентується перевіреними схемами, що наведені у відповідних державних стандартах. Враховуючи специфіку біосенсорних вимірювань, в якості цих еталонів можуть виступати або стандартні зразки (розчини) або взірцеві (еталонні) прилади. Першим кроком метрологічного

забезпечення сенсорних систем є вивчення стану еталонної бази, наявність існуючих та необхідність створення нових еталонів і перевірних схем для кожної із вхідних фізичних величин, що підлягають вимірюванню. Необхідно провести основні типи робіт: розробити документацію, провести експертизу та затвердити її в органах Держстандарту, придбати відповідне обладнання, розробити, виготовити та дослідити допоміжні засоби для проведення досліджень, провести самі метрологічні дослідження. Якщо допоміжними засобами для проведення досліджень є стандартні зразки, перелік робіт додатково включає: пошук та вивчення найкращого арбітражного методу вимірювання концентрації, визначення діапазону варіації та кількості точок для контролю метрологічних характеристик, дослідження зразків (відповідний ензимний біосенсор) у часі (відповідний ензимний біосенсор), встановлення інтервалу збереження цих зразків, встановлення умов експлуатації та збереження зразків.

6.4.1 Відпрацювання методик приготування калібрувальних розчинів аналітів, концентрація яких визначається біосенсорами на основі холінестераз

В роботі відпрацьовано та стандартизовано низку процедур приготування калібрувальних розчинів субстратів та інгібіторів, що будуть визначатись біосенсорами на основі холінестераз, враховуючи вимоги техніки безпеки та вимоги до кваліфікації операторів, охарактеризовано засоби вимірювальної техніки, допоміжні пристрої, реактиви і матеріали, які мають бути для цього використані, та умови приготування; проведено розрахунки підсумкової концентрації розчинів та оцінку рівнів стандартної та розширеної невизначеності значень цих концентрацій або розширеної невизначеності величини їх активностей.

В державному підприємстві «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт») затверджено методику готування розчинів ацетилхолінхлориду та бутирилхолінхлориду у буферному розчині з рН 7,4 та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 920-36-10, методику готування водних розчинів α -чаконіну та α -соланіну та розрахунку

розширеної невизначеності їх концентрацій за № 925-36-10, методику готування розчинів ртуті (II) нітрату та трихлорфону та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 921-36-10, методику готування розчинів афлатоксинів (B1, B2, G1, G2, M1) у буферному розчині з рН 7,4 та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 081/36-0859-13, методику готування розчину резерпіну та розрахунку розширеної невизначеності його концентрації за № 081/36-1014-15, право власності на які належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (рис. 6.4).



Рисунок 6.4 – Приклад титульних сторінок, затверджених в ДП «Укрметртестстандарт» методик №№ 925-36-10 та 081/36-0859-13

6.4.2 Відпрацювання методик градування різних варіантів лабораторних прототипів біосенсорів на основі холінестераз

В роботі відпрацьовано та стандартизовано процедури аналізу концентрацій глікоалкалоїдів, трихлорфону та афлатоксину B1 з використанням біосенсорів на основі холінестераз, враховуючи вимоги техніки безпеки та вимоги до кваліфікації

операторів, охарактеризовано засоби вимірювальної техніки, допоміжні пристрої, реактиви і матеріали, які мають бути для цього використані, та умови готування; проведено розрахунки підсумкової концентрації вказаних речовин та оцінку рівнів стандартної та розширеної невизначеності значень цих концентрацій.

В державному підприємстві «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт») затверджено методику градуювання лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації стероїдних глікоалкалоїдів в картоплі № 975-36-11, методику градуювання лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації трихлорфону в воді № 976-36-11, методику градуювання лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації афлатоксину В1 № 1174-36-14, право власності на які належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (рис. 6.5).



Рисунок 6.5 – Приклад титульних сторінок, затверджених в ДП «Укрметртестстандарт» методик №№ 975-36-11 та МК 1174-36-14

6.5 Висновки

В даному розділі було проаналізовано результати розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз та створення їхніх лабораторних прототипів. Проаналізовано та просумовано варіанти аналітичного застосування холінестераз при розробці біосенсорів. Запропоновано покрокову процедуру створення електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз, спираючись на досвід та враховуючи труднощі, що виникали в процесі цих розробок. Проведено метрологічні дослідження, за результатами яких низку розроблених методик затверджено в ДП «Укрметртестстандарт». Використання запропонованих методик буде необхідним при практичному застосуванні розроблених біосенсорів для використанні в харчовій промисловості та екологічному моніторингу.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень вперше проаналізовано, систематизовано та розроблено низку електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, що дозволило отримати обґрунтовані фундаментальні результати і розробити біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах і перевірити їх ефективність для практичного використання в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

1. Розроблено дизайн перетворювачів на основі рН-чутливих польових транзисторів та кондуктометричних металевих гребінчастих електродів та оптимізовано їх аналітичні характеристики, які враховували особливості роботи при електрохімічних вимірюваннях, що дозволило їх використання для створення біотехнологічних систем із застосуванням холінестераз як селективних елементів біосенсорів.
2. Розроблено та виготовлено експериментальні біоаналітичні системи різної конфігурації (в тому числі портативні), вимірювальні комірки різних модифікацій для подальшої роботи з біосенсорами на основі холінестераз.
3. Вперше досліджено та оптимізовано методи іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів з урахуванням впливу модифікації поверхні на характеристики як самих перетворювачів так і біосенсорів в цілому, що дозволило запропонувати декілька варіантів покращеної процедури іммобілізації ензимів (в тому числі з використанням наночастинок), що є важливою складовою аналітичної біотехнології.
4. Визначено біохімічні параметри іммобілізованих на поверхні перетворювачів холінестераз (K_M , V_{max} , K_i , $i_{0,5}$) та вперше ідентифіковано типи інгібування в залежності від природи токсинів, що дозволяє моделювати взаємодію ензимів з інгібіторами на молекулярному рівні та дає змогу адаптувати характеристики сенсорів під конкретні прикладні

біотехнологічні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсичними речовинами.

5. Результати математичного моделювання роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, що повністю описують біохімічні реакції, які відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів, вперше були застосовані для оптимізації роботи такої системи. Такі дослідження є новими та дуже важливими в аналітичній біотехнології для подальшого створення інших біосенсорів, особливо при роботі із токсичними речовинами.
6. Розроблені електрохімічні біосенсиори на основі ензимів ацетил- та бутирилхолінестераза з використанням різних процесів інгібування їхньої активності, дозволили створити низку діючих лабораторних прототипів для визначення концентрацій фосфорорганічних та карбаматних пестицидів (параоксон-метил, параоксон-етил, трихлорфон, паратіон-метил тощо), глікоалкалоїдів та індольних алкалоїдів, деяких поверхнево активних речовин (бензалконіум хлорид та додецилсульфат натрію) та афлатоксину В1, які було оптимізовано для подальшої роботи з реальними зразками. Для частини отриманих біосенсорів проведено метрологічні дослідження, зокрема розроблено стандартизовані методики визначення, які затверджені в ДП «Укрметртестстандарт».
7. За допомогою розроблених біосенсорів вперше проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі та томатів, показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора, з даними, які отримані за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (коефіцієнт кореляції $R = 0,93$).
8. Створення діючих лабораторних прототипів біосенсорів на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази вперше дало можливість провести кількісний аналіз афлатоксину В1 в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса,

спеціально інфікованих мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus*.

9. Розроблена та оптимізована процедура селективного біосенсорного визначення токсичних речовин дозволяє аналізувати складні мультикомпонентні зразки, в складі яких є як афлатоксини, так і пестициди.

ДОДАТОК А

Довідка про використання результатів дисертаційної роботи в навчальному процесі



проспект Глушкова, 4-г, м. Київ, 03187, тел. (044)5213566

Довідка

Видана Архиповій Валентині Миколаївні про те, що результати її дисертаційної роботи «Фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах», поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія, увійшли до лекційних курсів, практичних та лабораторних робіт з дисциплін «Біотехнологія», «Основи біосенсорики», «Практичні аспекти застосування сенсорних систем», «Фізико-хімічні основи біомолекулярної електроніки», які викладаються для бакалаврів та магістрів Навчально-наукового інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Директор
Навчально-наукового інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
доктор хімічних наук, професор



Ігор КОМАРОВ

Завідувач кафедри
молекулярної біотехнології та біоінформатики
ННІ високих технологій
кандидат біологічних наук, доцент

Олексій НИПОРКО

ДОДАТОК Б

Затверджені в ДП «Укрметртестстандарт» методики

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-
ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Т. в. о. заступника директора науково-
технічного інституту метрологічного
забезпечення вимірювань складу,
якісних і кількісних показників і



Д. М. Мельник

09 2010 р.

Метрологія

МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ АЦЕТИЛХОЛІНХЛОРИДУ ТА
БУТИРІЛХОЛІНХЛОРИДУ В БУФЕРНОМУ РОЗЧИНІ З pH 7,4 ТА РОЗРАХУНКУ
РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ЇХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

920-36-10

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

В. Г. Гавришкін
« 09 » 09 2010 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

С. В. Кулик
« 09 » 09 2010 р.

Київ – 2010

920-36-10

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилкін** (керівник розробки), **С. Кулик**, канд. хім. наук, **І. Алексєнко** (студент КНУТД), **С. Дзядевич**, докт. біол. наук, **В. Архипова**, канд. біол. наук

Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.
Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Держспоживстандарт України, 2010

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-
ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Т.в.о заступника директора науково-
виробничого інституту метрологічного
забезпечення вимірювань складу,
властивостей і кількості речовини і



Д.М. Мельник

2010 р.

МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ МЕРКУРІЙ (II) НІТРАТУ ТА ТРИХЛОРФОНУ
У БУФЕРНОМУ РОЗЧИНІ З рН 7,4 ТА РОЗРАХУНКУ РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ
ЇХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

921-36-10

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

В.Г. Гааріткін

« 17 » 09 2010 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

С.В. Кулик

« 17 » 09 2010 р.

Київ – 2010

921-36-10

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметрестандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилів** (керівник розробки), **С.Кулик**, канд. хім. наук, **І.Алексєєнко** (студент КНУТД), **С. Дяденюк**, докт. біол. наук, **В.Архипова**, канд. біол. наук

Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Вітворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Держспоживстандарт України, 2010

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-
ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Т. в. о. заступника директора науково-
виробничого інституту метрологічного
забезпечення вимірювань складу,
властивостей і кількості речовин і
матеріалів



Д.М. Мельник

09 2010 р.

Метрологія

МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ α -ЧАКОНІНУ ТА α -СОЛАНІНУ ТА
РОЗРАХУНКУ РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ЇХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

925-36-10

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

В.Г. Гаврилкін

« 07 » 09 2010 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

С.В. Кулик

« 07 » 09 2010 р.

Київ – 2010

925-36-10

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилкін** (керівник розробки), **С.Кулик**, канд. хім. наук, **І.Алексєєнко** (студент КНУТД), **С. Дзядевич**, докт. біол. наук, **В.Архипова**, канд. біол. наук

Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Держспоживстандарт України, 2010

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФИКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор науково-виробничого
інституту метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і
кількості речовин і матеріалів



М.С. Рожнов

2011 р.

Метрологія

**МЕТОДИКА ГРАДУЮВАННЯ ЛАБОРАТОРНОГО ПРОТОТИПУ ПРИБАДУ,
ПРИЗНАЧЕНОГО ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ МОЛЯРНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ
СТЕРОЇДНИХ ГЛІКОАЛКАЛОЇДІВ В КАРТОПЛІ**

975-36-11

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

В.Г. Гаврилкін
« 13 » 12 2011 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

С.В. Кулик
« 13 » 12 2011 р.

Київ – 2011

975-36-11

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилкін** (керівник розробки), **С.Кулик**, канд. хім. наук, **С. Дзядевич**, докт. біол. наук, **В.Архипова**, канд. біол. наук

© Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФИКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор науково-виробничого
інституту метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і
кількості речовин і матеріалів



М.С. Рожнов

12 2011 р.

Метрологія

**МЕТОДИКА ГРАДУЮВАННЯ ЛАБОРАТОРНОГО ПРОТОТИПУ ПРИБАДУ,
ПРИЗНАЧЕНОГО ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ МОЛЯРНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ
ТРИХЛОРФОНУ В ВОДІ**

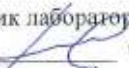
976-36-11

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

 В.Г. Гаврилкін
« 23 » 12 2011 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

 С.В. Кулик
« 13 » 12 2011 р.

Київ – 2011

976-36-11

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилкін** (керівник розробки), **С.Кулик**, канд. хім. наук, **С. Дзядевич**, докт. біол. наук, **В.Архипова**, канд. біол. наук

© Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ

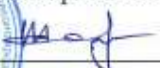
**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «Укрметртестстандарт»)**

**Науково-виробничий інститут метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і кількості речовин і матеріалів
(Метхіменерготест)**



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Метхіменерготест

 **М.С. Рожнов**

« 22 » листопада 2013 р.

МЕТРОЛОГІЯ

РОЗЧИНИ АФЛАТОКСИНІВ (B1, B2, G1, G2, M1)

У БУФЕРНОМУ РОЗЧИНІ З pH 7,4.

**МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ ТА РОЗРАХУНКУ РОЗШИРЕНОЇ
НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ЙОГО КОНЦЕНТРАЦІЇ**

081/36-0859-13

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

 **В.Г. Гаврилкін**

« _____ » _____ 2013 р.

Начальник лабораторії НВВ-36,

к. х. н.

 **С.В. Кулик**

« _____ » _____ 2013 р.

Київ – 2013

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: В. Гаврилкін (керівник розробки), С. Кулик, к. х. н., С. Дзядевич, д. б. н., В. Архипова, к. б. н.

Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ДП «Укрметртестстандарт», 2013

МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «Укрметрестестстандарт»)**

**Науково-виробничий інститут метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і кількості речовин і матеріалів
(Метхіменерготест)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Метхіменерготест



М.С. Рожнов

« 22 » листопада 2013 р.

МЕТРОЛОГІЯ

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРОТОТИП БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ
НА ОСНОВІ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ, ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ
ВИЗНАЧЕННЯ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ.
МЕТОДИКА ГРАДУЮВАННЯ**

081/36-0861-13

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

В.Г. Гаврилкін

« _____ » _____ 2013 р.

Начальник лабораторії НВВ-36,

К. Х. Н.

С.В. Кулик

« _____ » _____ 2013 р.

Київ – 2013

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: В. Гаврилкін (керівник розробки), С. Кулик, к. х. н., С. Дзядевич, д. б. н., В. Архипова, к. б. н.

Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ДП «Укрметртестстандарт», 2013

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФИКАЦІЇ
ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП «Укрметртестстандарт»)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор науково-виробничого
інституту метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і
кількості речовин і матеріалів



М.С. Рожнов

« 17 » 12 2014 р.

Метрологія

**МЕТОДИКА ГРАДУЮВАННЯ ЛАБОРАТОРНОГО ПРОТОТИПУ ПРИБАДУ,
ПРИЗНАЧЕНОГО ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ МОЛЯРНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ
АФЛАТОКСИНУ В1**

МК 1174-36-14

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

« 16 » 12 2014 р. В.Г. Гаврилкін

Начальник лабораторії відділу № 36

« 16 » 12 2014 р. С.В. Кулик

Київ – 2014

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: **В. Гаврилкін** (керівник розробки), **С.Кулик**, канд. хім. наук, **С. Дзядевич**, докт. біол. наук, **В.Архипова**, канд. біол. наук

© Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ,
СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «Укрметртестстандарт»)**

**Науково-виробничий інститут метрологічного забезпечення
вимірювань складу, властивостей і кількості речовин і матеріалів
(Метхіміенерготест)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Метхіміенерготест

«» 2015 р.

А.Б. Глебов

Метрологія

**МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ РЕЗЕРВНУ ТА РОЗРАХУНКУ
РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ЙОГО КОНЦЕНТРАЦІЇ**

081/36-1014-15

РОЗРОБЛЕНО

Начальник відділу № 36

«» В.Г. Гаврилкін

«» 2015 р.

Начальник лабораторії відділу № 36

«» С.В. Кулик

«» 2015 р.

Київ – 2015

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (ДП «Укрметртестстандарт»)

РОЗРОБНИКИ: В.Г. Гаврилкін (керівник розробки), С.В. Кулик, канд. хім. наук, С.В. Дзялевич, докт. біол. наук, В. Архипова, канд. біол. наук.



© Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ДП «Укрметртестстандарт», 2015



МІНЕКОНОМІКИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ
ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ
СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

Науково-виробничий інститут вимірювань складу, властивостей і
кількості речовин і матеріалів та оцінки відповідності засобів
вимірювальної техніки (Інститут № 2)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор інституту № 2

ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»

А.Б. Глебов

« 14 » грудня 2020 р.



Метрологія

МЕТОДИКА ГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ АЙМАЛІНУ ТА РОЗРАХУНКУ
РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ЙОГО КОНЦЕНТРАЦІЙ

36-4/20488

РОЗРОБЛЕНО

Начальник лабораторії відділу № 36,

С.В. Кулик

« 14 » грудня 2020 р.

Київ – 2020

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

РОЗРОБИНИКИ: С. Кулик, канд. хім. наук (керівник розробки), С. Дзядевич, докт. біол. наук, В. Архипова, канд. біол. наук



©Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності необхідно звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України.

ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ», 2020.

МІНЕКОНОМІКИ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ
ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ
СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

**Науково-виробничий інститут вимірювань складу, властивостей і
кількості речовин і матеріалів та оцінки відповідності засобів
вимірювальної техніки (Інститут № 2)**

ЗАТВЕРДЖУЮ



Директор інституту № 2
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»

А.Б. Глебов

«14 » грудня 2021 р.

Метрологія

**МЕТОДИКА БІОСЕНСОРНОГО ВИМІРЮВАННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ
ПАРАОКСОН-МЕТИЛУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ ТА СПОСОБУ
ОЦІНЮВАННЯ РОЗШИРЕНОЇ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ РЕЗУЛЬТАТУ
ВИМІРЮВАННЯ**

МВ 004-36-2021

РОЗРОБЛЕНО

Начальник лабораторії відділу № 36,

С.В. Кулик

«14 » грудня 2021 р.

Київ – 2021

ПЕРЕДМОВА

РОЗРОБЛЕНО: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

РОЗРОБНИКИ: **С. Кулик**, канд. хім. наук (керівник розробки), **С. Дзидевич**, докт. біол. наук, **О. Солдаткін**, докт. біол. наук, **В. Архипова**, канд. біол. наук.



©Право власності на цей документ належить Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено. Стосовно врегулювання прав власності необхідно звертатися до Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України.

ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ», 2021

ДОДАТОК В

Акти впровадження

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи,
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
заслужений діяч науки і техніки України,
доктор біологічних наук, професор
Кліщ І.М.



_____ 2025 р.

Акт впровадження

результатів дисертаційної роботи Архипової Валентини Миколаївни
«Фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах»,
поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук в галузі знань
091 «Біологія» за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Цим актом підтверджується, що у Тернопільському національному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського МОЗ України на кафедрі медичної фізики діагностичного та лікувального обладнання при викладанні навчальної дисципліни “Медична фізика з медичною інформатикою і біостатистикою” для студентів 1 курсу медичного факультету, тема 25 “Основи функціонування апаратів для моніторингу життєвих функцій людського організму” впроваджено результати математичного моделювання роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, яка повністю описує біохімічні реакції, що відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів.

Розроблені біосенсиори для визначення глікоалкалоїдів можуть успішно застосовуватись в різних сферах людської діяльності для контролю вмісту алкалоїдів у посівних лініях та потенційних комерційних сортах. Це дозволить уникнути перевищення небезпечних для споживання концентрацій алкалоїдів, вибрати відповідні умови вирощування та процедур транспортування та зберігання врожаю та проводити селекцію сортів картоплі, що володіють інсектицидною, антимікробною та фунгітоксичною активністю.

Використання математичного моделювання є корисним інструментом для кращого розуміння біохімічних процесів та може використовуватись для оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів. Дослідження проводились спільно з доктором технічних наук, професором кафедри медичної інформатики Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Сверстюком Андрієм Степановичем, про що свідчать спільні публікації. Отримані результати чисельного моделювання є особливо актуальними при роботі із токсичними речовинами та при створенні нових біосенсорів, коли біоселективний елемент є дуже дорогим чи дефіцитним.

Завідувач кафедри медичної фізики
діагностичного та лікувального обладнання
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
д.т.н., професор

Рудяк Ю.А.

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.О. директора Інституту
фізики напівпровідників
ім. В.Є. Лашкарьова НАН України
д.ф.-м.н., професор,
Мельник В.П.

**Акт впровадження**

результатів дисертаційної роботи Архиповій Валентині Миколаївні
«Фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в
біосенсорах», поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук в
галузі знань 091 «Біологія» за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Цим актом підтверджується, що в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України у відділі біохемосенсорики впроваджено дослідні зразки біосенсорної системи на основі холінестераз. Електрохімічні біосенсиори на основі ензимів ацетил- та бутирилхолінестераза з використанням процесу інгібування їхньої активності застосовуються для експресного визначення концентрацій фосфорорганічних пестицидів та карбаматних гербицидів, іонів важких металів та глікоалкалоїдів. Такі електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз та запропоновані їхні лабораторні прототипи в подальшому можуть бути використані для експрес-аналізу вмісту низки токсичних речовин в реальних зразках довкілля.

Розроблено дизайн та оптимізовано електрохімічні перетворювачі на основі рН-чутливих польових транзисторів, що враховували особливості роботи при електрохімічних вимірюваннях за участю холінестераз. Розроблено та виготовлено експериментальні вимірювальні системи (в тому числі портативні) різної конфігурації, вимірювальні кювети та комірки різних модифікацій для роботи з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів. Це також закладає основу для їхнього подальшого застосування з іншими ензимами як селективними елементами біосенсорів.

Дослідження проводились спільно з доктором фізико-математичних наук, старшим науковим співробітником, завідувачем відділу Куклюю Олександром Леонідовичем та науковим співробітником Павлюченко Олексієм Сергійовичем, про що свідчать спільні публікації. Створені лабораторні прототипи електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз можуть бути основою комерційних пристроїв для експресного аналізу токсичних речовин різної природи, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Завідувач відділу біохемосенсори
Інституту фізики напівпровідників
ім. В.Є.Лашкарьова НАН України
д.ф.-м.н., с.н.с.

Кукла О.Л.

ДОДАТОК Г

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача)

Монографії (розділи монографій):

1. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Electrochemical enzyme biosensors. Kiev: Akadempriodika; 2006. 72 p. (** проаналізовано літературні джерела стосовно ензимних біосенсорів на основі потенціометричних датчиків*).
2. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Conductometric enzyme biosensors. In: Marks RS, Lowe CR, Cullen DC, Weetall HH, Karube I, editors. Handbook of Biosensors and Biochips. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. p. 379–394. (** проаналізовано літературні джерела стосовно кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз*).
3. Arkhypova V. Enzyme biosensor based on ISFETs for determination of glycoalkaloids content in potato. In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D, editors. Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. Rzeszow: University of Rzeszow; 2015. p. 99–112.
4. Shkotova L, Soldatkin O, Arkhypova V, Pyeshkova V, Saiapina O, Sergeyeva T, Soldatkin A, Dzyadevych S. Biosensors. Practical application. In: Stabnikova O, Shevchenko O, Stabnikov V, Paredes-López O, editors. Bioconversion of Food Industry Wastes: Transformation into Value-Added Products. Boca Raton: CRC Press; 2023. p. 305–352. (** експерименти по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі та афлатоксинів в зернових*).

Статті у наукових фахових виданнях, що належать до бази даних Scopus

5. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Jaffrezic H, Martelet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for

- determination of different toxic substances. *Talanta*. 2001;55:919–927. (** перевірено роботу іммобілізованої ацетилхолінестерази*). Q1
6. Архипова ВН, Дзядевич СВ, Щувайло ОН, Солдаткин АП, Ельская АВ, Жафрезик-Рено Н, Жафрезик Г, Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа. *Biopolym. Cell*. 2001;17(1):70–77. (** перевірено роботу іммобілізованих холінестераз*). Q4
 7. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosens Bioelectron*. 2003;18:1047–1053. (** розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення глікоалкалоїдів*). Q1
 8. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377:496–506. (** участь в експериментах по визначенню іонів важких металів*). Q2
 9. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. *Anal. Letters*. 2004;37(8):1–14. (** розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення томатину*). Q2
 10. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, El'skaya AV, Soldatkin AP. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases. *Electroanalysis*. 2004;16:1873–1882. (** участь в експериментах по визначенню пестицидів*). Q2
 11. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. *Sensors Actuators B*. 2004;103:416–422. (** оптимізація роботи біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів*). Q1

12. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Georgiou C, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for the environmental monitoring based on enzyme inhibition effect. *Sensors and Actuators B*. 2005;55:81–87. (* участь в експериментах по визначенню токсинів різного походження). Q1
13. Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'Skaya AV, Gravouelle JM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*. 2005;66(1):28–33. (* участь в експериментах по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі). Q1
14. Бенілова ІВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартлє К, Солдаткін ОП. Кінетика функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз та інгібуючий вплив на них стероїдних глікоалкалоїдів. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(2):131–141. (* дослідження кінетики функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз). Q4
15. Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартлє К, Солдаткін ОП. Дослідження взаємодії основних глікоалкалоїдів картоплі за інгібування ними іммобілізованої бутирилхолінестерази. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(5):138–144. (* дослідження інгібування іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестерази). Q4
16. Benilova IV, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Kinetics of human and horse sera cholinesterases inhibition with solanaceous glycoalkaloids: study by potentiometric biosensor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2006;86(3):203–210. (* дослідження впливу глікоалкалоїдів на іммобілізовані бутирилхолінестерази різного походження). Q2
17. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon JM, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilised cholinesterases. *International Journal of applied electromagnetics and mechanics*.

- 2006;23(2–3):229–244. (** участь в експериментах по дослідженню інгібування холінестераз різними токсинами*). Q3
18. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора. Biopolym. Cell. 2008;24(1):41–50. (** оптимізація роботи бутирилхолінестерази в складі мультибіосенсора*). Q3
 19. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Biosensors for assay of glycoalkaloids in potato tubers. Appl Biochem Microbiol. 2008;44(3):314–318. (** аналіз глікоалкалоїдів в картоплі*). Q3
 20. Pavluchenko AS, Kukla AL, Goltvianskyi YV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Investigation of stability of the pH-sensitive field-effect transistor characteristics. Sensor Letters. 2011;9:2392-2396. (** дослідження стабільності рН-чутливих польових транзисторів*). Q3
 21. Soy E, Arkhypova V, Soldatkin O, Shelyakina M, Dzyadevych S, Warzywoda J, Sacco AJr, Akata B. Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals. Material Science Engineering C. 2012;32:1835-1842. (** дослідження впливу бета-цеолітів на характеристики біосенсора на основі бутирилхолінестерази*). Q1
 22. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Novel biosensor method for surfactant determination based on acetylcholinesterase inhibition. Measurement Science and Technology. 2012;23:1–6. DOI:10.1088/0957-0233/23/6/065801. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення поверхнево активних речовин*). Q2
 23. Soldatkin OO, Burdak OS, Sergeyeva TA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. Sensors Actuators B. 2013;188:999–1003. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення афлатоксину B1*). Q1

24. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Sergeeva TA, Arkhypova VN, Biloivan OA, Soldatkin OO, Shkotova LV, Zinchenko OA, Peshkova VM, Sayapina OY, Marchenko SV, El'skaya AV. Biosensors. A quarter of century of R&D experience. Biopolym. Cell. 2013;29(3):188–206. (* узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз). Q3
25. Stepurska KV, Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. Anal Chim Acta. 2015;854:161–168. (* участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення токсинів різного походження). Q1
26. Soldatkin OO, Shelyakina MK, Arkhypova VN, Soy E, Kirdeciler SK, Ozansoy Kasap B, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Akata Kurç B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Nano- and micro-sized zeolites as a perspective material for potentiometric biosensors creation. Nanoscale Research Letter. 2015;10:59. DOI 10.1186/s11671-015-0768-8. (* дослідження впливу цеолітів на характеристики потенціометричного біосенсора на основі холінестерази). Q2
27. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. Development of novel enzyme potentiometric biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Talanta. 2015;144:1079–1084. (* розробка потенціометричного прототипу біосенсора для визначення афлатоксину B1). Q1
28. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Dzyadevych S. Identifying the inhibition type of the immobilized acetylcholinesterase by aflatoxin B1 within the potentiometric biosensor. Biopolym. Cell- 2016;32(4):271-278. (* дослідження типу інгібування ацетилхолінестерази афлатоксином B1). Q3
29. Nakonechnyi A, Martsenyuk V, Sverstiuk A, Arkhypova V, Dzyadevych S. Investigation of the Mathematical Model of the Biosensor for the Measurement of A-Chaconine Basing on the Impulsive Differential System. CEUR Workshop

- Proceedings. 2020;2762:209–217. (* участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсора для визначення α -чаконіну).
30. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Practical application of electrochemical enzyme biosensors. Biopolymers and Cell. 2022;38(2):71–92. (* узагальнення даних з практичного застосування біосенсорів на основі холінестераз). Q4
 31. Arkhypova V, Soldatkin O, Moghylevska L, Konvalyuk I, Kunakh V, Dzyadevych S. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for assessment of total indole alkaloids content in tissue culture of *Rauwolfia serpentine*. Electrochemical Science Advance. 2022;2(5):1–8. <https://doi.org/10.1002/elsa.202100152>. (* розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів). Q2
 32. Shkotova L, Zinchenko O, Arkhypova V, Dzyadevych S. Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. Applied Nanoscience. 2023;13(7):5133–5138. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02715-z>. (*участь в експериментах по застосування золотих наночастинок при іммобілізації холінестерази) Q2
 33. Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Dzyadevych S. Electrochemical biosensors based on enzyme inhibition effect. Chemical Records. 2024;24:e202300214.- <https://doi.org/10.1002/tcr.202300214>. (* узагальнення даних розробці біосенсорів на основі інгібування холінестераз) Q1
 34. Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Kucherenko IS, Velychko TP, Bakhmat VA, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Application of butyrylcholinesterase-based biosensor for simultaneous determination of different toxicants using inhibition and reactivation steps. Electroanalysis. 2024;36:e202300400. <https://doi.org/10.1002/elan.202300400>. (*участь в експериментах по реактивації активності бутирилхолінестерази). Q3

Статті у наукових фахових виданнях України категорії Б

35. Архипова ВМ, Бережецький АЛ, Шульга ОА, Шовелон Ж-М, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження та оптимізація кондуктометричних перетворювачів

- на основі планарної технології. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2005;2:48–54. (** дослідження роботи кондуктометричних перетворювачів*).
36. Кукла ОЛ, Павлюченко ОС, Голтвянський ЮВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Сенсорні масиви на основі диференційних ІСПТ-елементів для моніторингу токсичних речовин природного та штучного походження. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2008;2:58–68. (** дослідження характеристик потенціометричних перетворювачів*).
37. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Кукла ОЛ, Назаренко ОА, Осипчук АА, Єльська ГВ. Біосенсорний аналіз глікоалкалоїдів в картоплі. *Biotechnologica Acta*. 2009;2(3):64–73. (** проведення експериментів по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі*).
38. Soy E, Pyeshkova V, Arkhylova V, Khadro B, Jaffrezic-Renault N, Sacco A, Dzyadevych S, Akata Kurc B. Potentialities of zeolites for immobilization of enzymes in conductometric biosensors. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2010;1:27–34. (** участь в експериментах з використання цеолітів при іммобілізації холінестераз*).
39. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази для визначення катіонних поверхнево-активних речовин в водних розчинах. *Biotechnologica Acta*. 2011;4(5):83–89. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР*).
40. Коробко МЮ, Степурська КВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Оптимізація процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2016;13(4):61–72. (** участь в експериментах з розробки процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів*).
41. Архипова ВМ, Степурська КВ, Циганенко КВ, Савчук ЯІ, Єльська ГВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2019;16(4):37–52.

(проведення експериментів по визначенню афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції).*

42. Сверстюк АС, Архипова ВМ, Степурська КВ, Марценюк ВП, Бойко ІВ, Дзядевич СВ. Розробка та верифікація математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну. Вісник Хмельницького національного університету. 2020;281(1):230–237. *(* участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну).*
43. Солдаткін ОО, Солдаткіна ОВ, Архипова ВМ, Пилипонський П, Рєзніченко ЛС, Грузіна ТГ, Дибкова СМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Використання наночастинок золота для покращення аналітичних характеристик кондуктометричних ферментних біосенсорів. Sensor Electronics and Microsystems Technologies. 2021;18(1):20–34. *(* участь в експериментах з використання наночастинок золота для кондуктометричних біосенсорів).*
44. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Можилевська ЛП, Конвалюк П, Кунах ВА, Дзядевич СВ. Розробка ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina Benth. Ex Kurz*). Sensor Electronics and Microsystems Technologies. 2021;18(3):38–50. *(* розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів).*
45. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Кучеренко ІС, Кучеренко ДЮ, Дзядевич СВ. Адаптація процедури коїмобілізації ферментів з різними модифікаціями цеолітів на поверхню кондуктометричних перетворювачів. Sensor Electronics and Microsystems Technologies. 2021;18(4):11–26. *(* участь в експериментах з коїмобілізації холінестераз з різними модифікаціями цеолітів).*
46. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Жаффрезік-Рено Н. Фізична модель тимчасової нестабільності струму в іон-селективних польових транзисторах з діелектричними шарами оксиду/нітриду кремнію. Sensor Electronics and Microsystem Technologies. 2023;20(3):79–91. *(* участь в експериментах з дослідження стабільності перетворювачів).*

47. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Архипова ВМ, Еррашид А, Дзядевич СВ. Визначення впливу температурної та УФ обробки на характеристики диференційних ІСПТ електродів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2023;20(4):4–18. (** участь в експериментах з дослідження впливу температури на характеристики ІСПТ електродів*).

Статті в інших виданнях

48. Dzyadevych SV, Arkhylova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. *Current Topics in Analytical Chemistry*. 2001;2:179–186. (** участь в експериментах по визначенню пестицидів*).
49. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мартле К, Жаффрезик-Рено Н, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз для екологічного моніторингу. *Екологія і ноосфера*. 2004;15:5–17. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсинів*).
50. Павлюченко АС, Кукла АЛ, Голтвянский ЮВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткин АП. Исследование стабильности характеристик рН-чувствительных полевых транзисторов. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2010;45:90–99. (** досліджено стабільність та рН-чутливість польових транзисторів*).
51. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мельник ВГ, Ленков СВ. Метод експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин з використанням кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз. *Сучасна спеціальна техніка*. 2011;1(24):118–124. (** участь в експериментах з розробки методу для визначення токсинів різної природи*).

Патенти

52. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Мультибіосенсор для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах. Патент України на

- корисну модель № 27284. Подано: 08.06.2007. Опубліковано: 25.10.2007; бюл. № 17. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення фосфорорганічних пестицидів*)
53. Солдаткін ОО, Кучеренко ІС, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 52437. Подано: 05.03.2010. Опубліковано: 25.08.2010; бюл. № 16. (** участь в експериментах з розробки кондуктометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
54. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ. Ферментний біосенсор для визначення аніонних поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 55939. Подано: 16.07.2010. Опубліковано: 27.12.2010; бюл. № 24. (** участь в експериментах з розробки потенціометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
55. Степурська КВ, Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Циганенко КС, Савчук ЯІ, Зайченко ОМ. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових. Патент України на корисну модель № 106062. Подано: 12.11.2015. Опубліковано: 11.04.2016; бюл. № 7. (** розробка біосенсорів для визначення афлатоксинів у пробах зернових*).
56. Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Кунах ВА, Можилевська ЛП, Пороннік ОО. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфія зміїна. Патент України на корисну модель № 118762. Подано: 06.04.2017. Опубліковано: 28.08.2017; бюл. № 16. (** розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів*).
57. Солдаткін ОО, Пешкова ВМ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Резніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїмобілізованої ацетилхолінестерази з наночастинками золота для

інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148725. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах*).

58. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Рєзніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїммобілізованої бутирилхолінестерази з наночастинками золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148726. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах*).

Методичні вказівки

59. Архипова ВМ, Степурська КВ, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення глікоалкалоїдів у картоплі : методичні рекомендації до виконання лабораторної роботи. Київ: ВПЦ "Київський університет"; 2018. 30 с. (** розробка методичних рекомендацій до виконання лабораторної роботи для визначення глікоалкалоїдів*).

Матеріали і тези доповідей наукових конференцій і з'їздів

60. Korpan Y, Arkhipova V, Nazarenko E, El'skaya A, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A. Novel electrochemical biosensors for stearoidal glycoalkaloids detection based on butyrylcholinesterase. Book of 1st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry; 2001 September 11-15; Odessa, Ukraine. 2001. P. 38-39. (форма участі – очна).
61. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Arkhipova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical microbiosensors based on cholinesterases for environmental and food toxins analysis. Proc. of Journees Maghreb-Europe "Les Materiaux et leurs Applications aux Dispositifs Capteurs. Physiques, Chimiques et

- Biologiques “MADICA 2001”; 2001 October 29-31; Hammamet, Tunisie. 2001. P. 29. (форма участі – очна).
62. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensors for detection of glycoalkaloids in potatoes and their application for studying the enzyme inhibition mechanisms. Proc. of Eurosensors XVI; 2002 September 15-18; Prague, Czech Republic. 2002. P. 677-678. (форма участі – очна).
 63. Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensor for detection of potato glycoalkaloids. Book of abstract of International Conference “Functionalized materials: synthesis, properties and application”; 2002 September 24-29; Kyiv, Ukraine. 2002. P. 280-281(форма участі – очна).
 64. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Chovelon J-M, Georgiou C, Soldatkin AP. Early-warning system in the environment based on electrochemical biosensors and enzyme inhibition effect. Proc. of 3rd Aegean Analytical Chemistry Days; 2002 September 29–October 3; Polihnitos, Lesvos, Greece. 2002. P. 425. (форма участі – очна).
 65. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of biosensors based on ISFETs for fast detection of total solanaceous glycoalkaloids in potatoes samples. 17th European Conference on Solid-State Transducers; 2003 September 21-24; Guimaraes, Portugal. 2003. P. 592-593(форма участі – заочна).
 66. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, Soldatkin AP. Application of conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. 3rd International Conference of Instrumental Methods of Analysis; 2003 September 23-27; Thessaloniki, Greece. 2003. (форма участі – очна).
 67. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. International

- Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring; 2003 October 9-11; Marrakech, Morocco. 2003. P. 32. (форма участі – очна).
68. El'skaya AV, Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors: 15 years of experience. 8 World Congress "Biosensors' 2004"; 2004 May 24-26; Granada, Spain. 2004. P3.7.60. (форма участі – заочна).
 69. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Development of enzyme biosensors based on pH-sensitive field effect transistors for tomatine determination in tomatoes. International Conference on Sensors Electronics and Microsystem technology; 2004 June 1-5; Odessa, Ukraine. 2004. P. 217. (форма участі – очна).
 70. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Cholinesterase-based biosensor for glycoalkaloids analysis in potatoes and tomatoes. VIIIth International Meeting on Cholinesterases; 2004 September 26-30; Perugia, Italy. 2004. P. 9. (форма участі – очна).
 71. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Cholinesterases-based potentiometric biosensors. MADICA 2004; 2004 November 29–December 1; Tunis, Tunisia. 2004. P. 137. (форма участі – очна).
 72. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical enzyme biosensors based on cholinesterases. Second International Symposium on Intelligent Artifacts and Bio-systems; 2005 January 27-28; Lyon, France. 2005. P. 61. (форма участі – очна).
 73. Gravouelle J-M, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs: a rapid method. 16th Triennial Conference of the European Association for potato research; 2005 July 17-22; Bilbao, Spain. 2005. (форма участі – заочна).
 74. Архипова ВН, Мартле К, Жаффрезик-Рено Н, Солдаткин АП. Биосенсоры на основе иммобилизированных холинестераз. 2-а Міжнародна науково-технічна

- конференція „Сенсорная електроніка та мікросистемні технології”; 26-30 червня 2006 р.; Одеса, Україна. 2006. С. 187. (форма участі – очна).
75. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Electrochemical biosensors based on cholinesterases. Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology; 2006 December 14-16; Kyiv, Ukraine. 2006. P. 52. (форма участі – очна).
 76. Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Архипова ВМ, Кукла ОЛ, Єльська ГВ. Ферментні біосенсиори на основі іон-селективних польових транзисторів. 4-а Міжнародна науково-технічна конференція „Сенсорна електроніка та мікросистемні технології”; 28 червня - 2 липня 2010 р.; Одеса, Україна. 2010. С.12-13. (форма участі – очна).
 77. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Шелякіна МК, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Розробка кондуктометричного біосенсора на основі ацетилхолін естерази для визначення поверхнево-активних речовин в водних розчинах. III міжнародна наукова конференція “Фізичні методи в екології, біології та медицині”; 9-12 вересня 2010 р.; Львів-Шацьк, Україна. 2010. С. 61-63. (форма участі – очна).
 78. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Enzyme-based sensor for surfactant determination. International Conference “Functional Materials”; 2011 October 3-8; Partenit, Crimea, Ukraine. 2011. P. 388. (форма участі – заочна).
 79. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Kirdeciler SK, Galioglu S, Akata B, Lagarde F, Dzyadevych SV. The application of the nanosized zeolites for optimization of the acetylcholinesterase based biosensors for determination of the aflatoxin B1. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials”; 2014 August 23-30; Yaremche-Lviv, Ukraine. 2014. P. 61. (форма участі – очна).
 80. Stepurska K, Soldatkin OO, Arkhypova V, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych S. Potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of aflatoxin B1 in real samples. 6 International scientific

- and technical conference “Sensor electronics and microsystems technologies”; 2014 September 29 - October 3; Odessa, Ukraine. 2014. P. 81. (форма участі – очна).
81. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Novel acetylcholinesterase biosensor for aflatoxin B1 determination. EMRS 2015 Spring Meeting; 2015 May 11-15; Lille, France. 2015. (форма участі – заочна).
 82. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Journee de Printemps de la SCF en Rhone Alpes; 2015 Juin 11; Villeurbanne, France. 2015. P. 51. (форма участі – очна)).
 83. Stepurska KV, Arkhypova VM, Soldatkin OO, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV Application of potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase for detection of aflatoxin B1. International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition PPM 2015; 2015 September 15-18; Cesme Izmir, Turkey. 2015. P. 25. (форма участі – очна).
 84. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Lagarde F, Dzyadevych S. Application of a potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase inhibition for the determination of toxic compound of different types. Vème Journée Rhône-Alpes des Biomolécules; 2016 Juin 7; Villeurbanne, France. 2016 (форма участі – заочна).
 85. Архипова ВМ, Циганенко КВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 у зразкаї зернових. XII Український біохімічний конгрес; 30 вересня-4 жовтня 2019 р; Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. 2019; 21(3):260. (форма участі – очна).
 86. Soldatkin OO, Soy E, Arkhypova V, Pyeshkova V, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych S. Using zeolites for improvement of performance of biosensor based on ISFET for inhibitory determination of toxic compoinds. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. P.259. (форма участі – заочна).

87. Shkotova LV, Zinchenko OA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV. Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. (форма участі – заочна).
88. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Electrochemical enzyme biosensors and their practical application. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche-Comté; 2022 Novembre 24-25; Dijon, France. 2022. P. 26. (форма участі – заочна).
89. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Жаффрезік-Рено Н, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Ензимні біосенсори на основі ефекту інгібування. IX з'їзд Українського біофізичного товариства; 30 жовтня - 2 листопада 2023 р.; Київ, Україна. 2023. С. 153-154. (форма участі – очна)