
BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 577.15, 543.554

DOI 10.18524/1815-7459.2016.4.86653

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ РОЗДІЛЬНОГО БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНІВ ТА ПЕСТИЦИДІВ

М. Ю. Коробко^{1,2}, К. В. Степурська^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}, В. М. Архипова¹, С. В. Дзядевич^{1,2}

¹ *Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна, e-mail: dzyad@yahoo.com*

² *Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна,*

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ РОЗДІЛЬНОГО БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНІВ ТА ПЕСТИЦИДІВ

М. Ю. Коробко, К. В. Степурська, О. О. Солдаткін, В. М. Архипова, С. В. Дзядевич

Анотація. Розроблено та оптимізовано процедуру біосенсорного аналізу мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди. Біосенсорне визначення афлатоксинів та пестицидів проводили з використанням інгібіторного ферментного аналізу. Для створення біоселективного елемента біосенсора використовували фермент ацетилхолінестеразу, коїмобілізовану з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою ковалентної зшивки глутаровим альдегідом на поверхні потенціометричного перетворювача. Як перетворювачі виступали рН-чутливі польові транзистори. Підібрано робочу концентрацію ацетилхоліну як субстрату для подальшого інгібіторного аналізу, оптимальний час інгібування розчином токсинів, необхідну концентрацію реактиватора піридин-2-альдоксиметилїодиду та часу реактивації ферментної мембрани після її інгібування. Досліджено синергізм дії трихлорофону та афлатоксину В1 при інгібуванні ними іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів ацетилхолінестерази. Запропоновано процедуру аналізу, яка дозволяє селективно визначати склад мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди.

Ключові слова: афлатоксини, трихлорфон, біосенсор, іммобілізована ацетилхолінестераза, рН-чутливий польовий транзистор

OPTIMIZATION OF PROCEDURE OF SEPARATE BIOSENSOR DETECTION OF AFLATOXINS AND PESTICIDES

M. Yu. Korobko, K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevych

Abstract. A procedure of separate biosensor analysis of the multicomponent sample with aflatoxins and pesticides has been developed and optimized. Biosensor determination of aflatoxins and pesticides was performed using enzyme inhibition analysis. For creation of bioselective element we used enzyme acetylcholinesterase which is co-immobilized with bovine serum albumin on the surface of potentiometric transducer by glutaraldehyde covalent crosslinking. As transducers were pH-sensitive field effect transistors. The concentration of acetylcholine chloride as a substrate for subsequent inhibition analysis was fit; optimal time of inhibition by toxins solution was determinate together with concentration of reactivator (pyridine-2-aldoxymethylidyd) and time of enzyme reactivation after inhibition. A synergism between trichlorfon and aflatoxin B1 in inhibition of immobilized on a surface pH-sensitive field-effect transistors acetylcholinesterase was investigated. The proposed procedure allows selective determination the composition of the multicomponent sample with aflatoxins and pesticides.

Keywords: aflatoxins, trichlorfon, biosensor, immobilized acetylcholinesterase, pH-sensitive field-effect transistors

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ РАЗДЕЛЬНОГО БИОСЕНСОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНОВ И ПЕСТИЦИДОВ

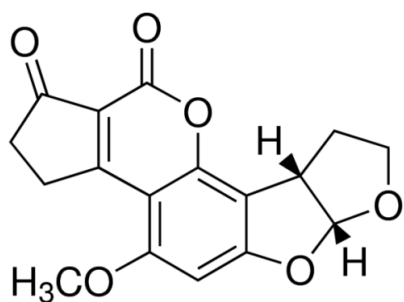
М. Ю. Коробко, К. В. Степурская, А. А. Солдаткин, В. Н. Архипова, С. В. Дзядевич

Аннотация. Разработана и оптимизирована процедура биосенсорного анализа мультикомпонентного образца, в составе которого есть как афлатоксины, так и пестициды. Биосенсорное определение афлатоксинов и пестицидов проводили с использованием ингибиторного ферментного анализа. Для создания биоселективного элемента биосенсора использовали фермент ацетилхолинэстераза, коиммобилизованный с бычьим сывороточным альбумином с помощью ковалентной сшивки глутаровым альдегидом на поверхности потенциметрического преобразователя. В качестве преобразователей выступали рН-чувствительные полевые транзисторы. Подобраны рабочая концентрация ацетилхолина как субстрата для дальнейшего ингибиторного анализа, оптимальное время ингибирования раствором токсинов, необходимая концентрация реактиватора пиридин-2-альдоксиметилйодид и время реактивации ферментной мембраны после ее ингибирования. Исследован синергизм действия трихлорофона и афлатоксина В1 при ингибировании ими иммобилизованной на поверхность рН-чувствительных полевых транзисторов ацетилхолинэстеразы. Предложенная процедура анализа позволяет селективно определять состав мультикомпонентного образца, в составе которого есть как афлатоксины, так и пестициды.

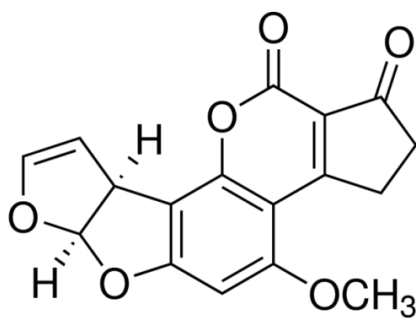
Ключевые слова: афлатоксины, трихлорфон, биосенсор, иммобилизованная ацетилхолинэстераза, рН-чувствительный полевой транзистор

Вступ

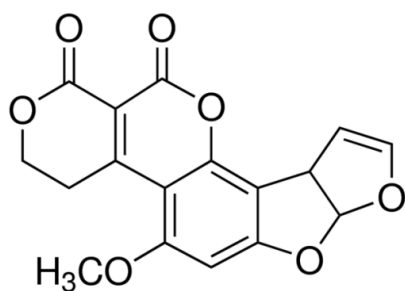
Одним з найбільш розповсюджених класів забруднювачів харчових продуктів є мікотоксини – токсичні органічні сполуки, які продукуються грибами [1]. Афлатоксини є одними з найнебезпечніших мікотоксинів, оскільки мають високу канцерогенну властивість та забруднюють широкий спектр продуктів харчування. Найбільш схильними до ураження афлатоксинами є рис, кукурудза, пшениця, а також горіхи та спеції [2]. В природі виявлено чотири основні афлатоксини: В1, В2, G1 та G2 (рис. 1), окрім них також виявлено ще понад 10 сполук, які є похідними або метаболітами цієї основної групи [3].



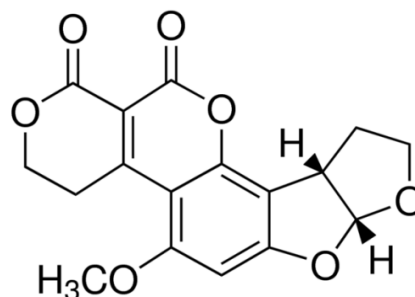
Афлатоксин В1



Афлатоксин В2



Афлатоксин G1



Афлатоксин G2

Рис.1. Хімічна структура природних афлатоксинів В1, В2, G1, G2.

Разом із забруднювачами природного походження (мікотоксинами), харчові продукти можуть бути забруднені штучними токсинами неприродного походження, такими як пестициди. Як сільськогосподарські інсектициди використовуються фосforoорганічні пестициди. Вони мають високий рівень токсичності, тому в свій час використовувались також як потенційні агенти хімічної зброї [4]. Вплив фосforoорганічних пестицидів на організм людини полягає в інгібуванні ферменту ацетилхолінестерази (АХЕ), що є необхідним для функціонування центральної і периферичної нервової системи людини. Експериментально був знайдений зв'язок між впливом пестицидів на організм людини та хворобами Альцгеймера, Паркінсона та бічного аміотрофічного склерозу [5].

До традиційних методів визначення афлатоксинів відносять тонкошарову хроматографію [6], високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [7], різні поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [8] та імуноферментний аналіз [9]. Для визначення фосforoорганічних пестицидів використовують хроматографічні методи [10-13], включаючи ВЕРХ [14, 15] та газову хроматографію [16]. Методи, що дозволяють визначати важкі метали (наприклад, кадмій, ртуть, свинець, миш'як, олово, селен, сурму, мідь, нікель, хром, телур, талій), включають атомно-абсорбційну або емісійну спектроскопію, рентгенівську флуоресцентну спектрометрію, хроматографічні або електрохімічні методи аналізу [17-19].

Ці методи добре вивчені та широко використовуються, але мають деякі недоліки, осно-

вними з яких є довготривалість та складна методика попередньої підготовки проб, висока вартість обладнання і необхідність у висококваліфікованому персоналі. Тому, сьогодні велика увага приділяється розробці експрес-методів аналізу токсикантів, наприклад біосенсорів.

На сьогодні розроблено ряд різноманітних електрохімічних біосенсорів для визначення токсичних речовин: амперометричних [20], потенціометричних [21, 22], колориметричних [23], кондуктометричних [24]. Але зовсім невелика кількість розроблених на сьогодні біосенсорів адаптовано для роботи з реальними зразками. До того ж вони не є повністю селективними до окремих токсинів. В даній роботі був використаний потенціометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази, традиційним недоліком якого є чутливість до широкого класу токсичних речовин різної природи, а тому селективне визначення окремих класів токсинів за його допомогою є нетривіальною задачею. Дана робота присвячена розробці та оптимізації процедури селективного визначення мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди, за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази.

2. Матеріали та методи

2.1. Матеріали

Біоселективні мембрани містили фермент ацетилхолінестеразу (АцХЕ) із електричного вугря (ЕС 3.1.1.7) активністю 426 од.акт./мг, альбумін сироватки бика (БСА) (фракція V), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина) та гліцерин вітчизняного виробництва. Як субстрат використовували ацетилхолін в формі ацетилхолінхлориду (АцХХ) фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина).

Як інгібітори використовували трихлорфон фірми «Riedel-de Haën» (Німеччина) та афлатоксин В1 (АФВ1) фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина).

Як реактиватор використовували розчин піридин-2-альдоксиметилйодиду (ПАМ-2). Сполеку для приготування буферного розчину та інші неорганічні речовини, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. Потенціометричні перетворювачі

В роботі використовувалися рН-чутливі сенсори з диференціальної парою р-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8×8 мм, спроектовані та виготовлені в Інституті фізики напівпровідників імені В. Є Лашкарьова НАН України. Сенсор виготовлений за МОН-технологією на кремнієвих підкладках КЕФ-4.5 з формуванням підзатворного шару діелектрика із термічно окисленої плівки SiO_2 товщиною 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 товщиною 50-70 нм. Загальний вигляд датчика і мікрображення біоселективних мембран показані на Рис. 2.

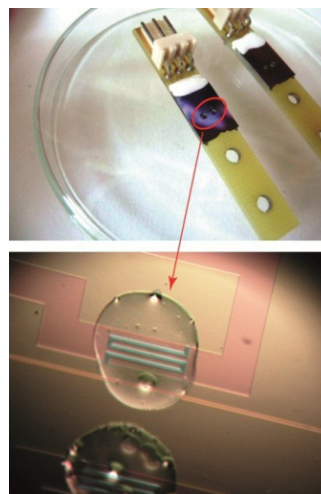


Рис. 2. Загальний вигляд потенціометричного датчика і мікрображення ферментної і референтної мембран.

2.3. Виготовлення біоселективних елементів

Для виготовлення робочих біоселективних мембран використовували наступний розчин: 1 % ацетилхолінестераза, 4 % БСА та 10 % гліцерин у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА з кінцевою концентрацією 5 %. Після нанесення приготовлених розчинів на робочі поверхні перетворювачів, датчики розміщували у насичених парах глутарового альдегіду на 20 хв., а потім витримували 5 хв. на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани відмивали буферним розчином від надлишку незв'язаних компонентів мембрани.

3. Результати та обговорення

Серед токсичних речовин, які інгібують АцХЕ є як необоротні (фосфорорганічні пестициди, важкі метали тощо), так і оборотні інгібітори (мікотоксини, глікоалкалоїди та інші) [25]. Пестицид трихлорфон інгібуює АцХЕ необоротно, а в свою чергу афлатоксин В1 є оборотним інгібітором. Механізми дії цих інгібіторів відрізняються, тому перш за все необхідно було визначити оптимальну процедуру біосенсорного вимірювання для кожного.

Перш за все було виявлено, що найкращий рівень інгібування АцХЕ в складі біосенсора спостерігається при 8 мМ АцХХ, тому для проведення наступних експериментів саме 8 мМ АцХХ було обрано як робочу концентрацію субстрату.

Традиційно для оборотного інгібітора відсутня залежність від послідовності внесення субстрату та токсину в електрохімічну комірку, а також часу, що необхідний для інгібування ферменту після внесення токсичної речовини в комірку [26]. Тому першочерговим завданням був підбір оптимальної процедури інгібування саме пестицидом трихлорфон. Було перевірено три різні процедури інгібування АцХЕ трихлорфоном (рис. 3):

1) Після отримання відгуків біосенсора на додавання субстрату (АцХХ), в комірку вносили пестицид трихлорфон (кінцева концентрація 250 мкМ) і чекали 20 хвилин з інтенсивним перемішуванням. Метод не дав очікуваних результатів, зміни сигналу, а, відповідно, інгібіторного ефекту не було виявлено. Після відмивки біосенсора буферним розчином, додавали знову АцХХ, величина відгуку біосенсора була такою ж, як і раніше, до внесення пестициду.

2) В комірку з біосенсором, що знаходився в буферному розчині, додавали пестицид трихлорфон, чекали 20 хвилин з інтенсивним перемішуванням, після чого отримували біосенсорний відгук на додавання АцХХ. Експеримент знову не дав очікуваних результатів, зменшення відгуку на внесення АцХХ було в межах похибки.

3) Після отримання відгуку на субстрат, біосенсор інкубували в розчині інгібітору протягом певного часу, тобто додавали розчин пестициду трихлорфону концентрацією 250 мкМ

безпосередньо на сам датчик і чекали 20 хвилин. Далі біосенсор відмивали від інгібітору та знову одержували відгук на субстрат. Було отримано зменшення величини відгуку на 70%.

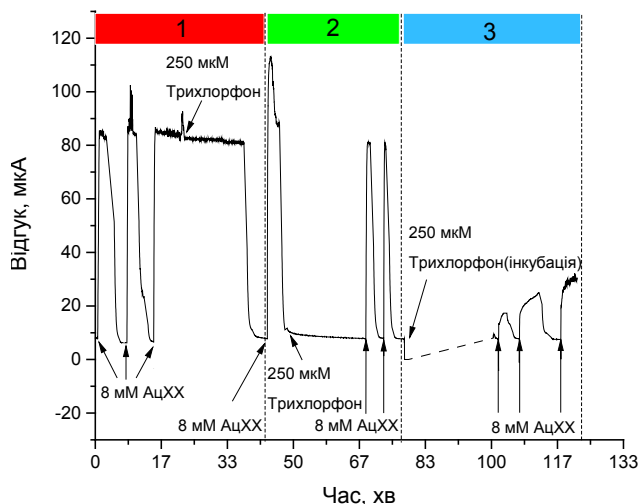


Рис. 3. Типові сигнали біосенсора за різних процедур інгібування АцХЕ пестицидом трихлорфон (1-додавання трихлорфону в комірку з субстратом; 2 - додавання трихлорфону в комірку за відсутності субстрату; 3 – інкубація біосенсора в каплі розчину трихлорфону).

Таким чином ефект інгібування було отримано лише при інкубації біосенсора в розчині трихлорфону, але ця процедура не підходить для роздільного визначення афлатоксинів і пестицидів в мультикомпонентного зразку. Було проведено ще один дослід, в якому пестицид трихлорфон додавали у комірку з буферним розчином, що перемішувався, до кінцевої концентрації 250 мкМ, через 3 хв. перемішування вимикали та додатково чекали ще 30 хвилин, після чого отримували відгуки на субстрат (рис.4).

В результаті експерименту отримали рівень інгібування АцХЕ – 51,8 %. Тому саме цю процедуру інгібіторного визначення пестициду трихлорфон з вимкненим перемішуванням було обрано для проведення подальших експериментів.

Наступним етапом роботи був підбір робочої концентрації ацетилхолінхлориду (АцХХ) як субстрату фермента АцХЕ, для подальшого інгібіторного аналізу. Для цього отримували відгуки на різні концентрації АцХХ. Концен-

трації субстрату в комірці об'ємом 2,5 мл давали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованого 500 мМ розчину АцХХ.

У випадку інгібування ферменту афлатоксинном АФВ1 додавали невеликі аліквоти концентрованого розчину токсину в робочу комірку з субстратом до кінцевої концентрації 6,4 мкМ, після цього вимірювали зменшення сигналу біосенсора. У випадку інгібування ферменту 75 мкМ трихлорфоном, додавання токсиканту і процедура визначення відбувалися за попередньо вибраним методом (рис. 4). Після кожної процедури біоселективний елемент промивали протягом 5 хв робочим буферним розчином для видалення надлишків субстрату, інгібітору і продуктів реакції.

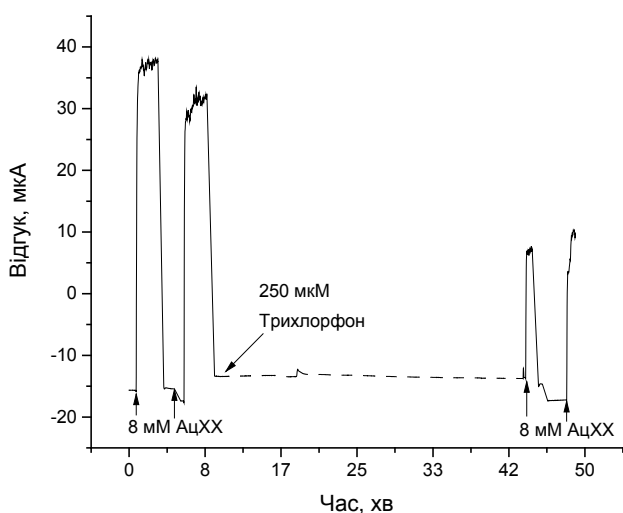


Рис. 4. Процедура інгібування АцХЕ в складі біосенсора пестицидом трихлорфон з вимкненим перемішуванням.

Далі необхідно було підібрати оптимальний час інгібування АцХЕ пестицидом трихлорфон концентрацією 75 мкМ. Додавання пестициду відбувалося у комірку з буферним розчином, з вимкненим перемішуванням, згідно з попередньо підбраною процедурою. За результатами дослідження побудовано діаграму залежності рівня інгібування біосенсора пестицидом трихлорфон від часу інгібування (рис. 5).

Згідно отриманих результатів 30 хв було обрано як час інгібування для проведення подальших експериментів.

Наступним кроком було визначення оптимальної концентрації реактиватора ПАМ-2 та

часу реактивації ферментної мембрани після її інгібування трихлорфоном.

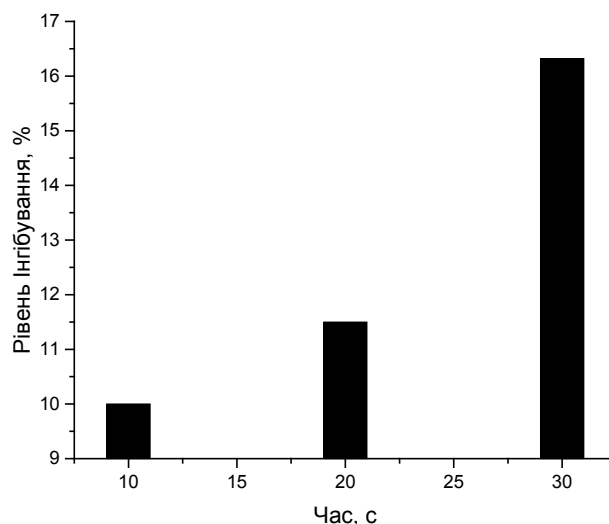


Рис. 5. Залежність рівня інгібування АцХЕ в складі біосенсора пестицидом трихлорфон від часу інгібування. Концентрація АцХХ – 8 мМ, концентрація трихлорфону – 75 мкМ.

Для оптимізації процедури реактивації були проведені чотири серії експериментів з різними концентраціями ПАМ-2. У кожній серії дослідження відбувалося інгібування біоселективного елементу біосенсора трихлорфоном протягом 30 хв. Підбиралися такі концентрації пестициду, щоб рівень інгібування знаходився в межах від 0 до 100%. В результаті дослідження (рис. 6) отримано, що 0,01 мМ ПАМ-2 виявилось недостатньо для відновлення активності біоселективного елементу навіть тоді, коли рівень інгібування трихлорфоном був низьким. Використовуючи 0,1 мМ ПАМ-2 реактивація біосенсора відбувалась у випадку, коли інгібування ферменту трихлорфоном було не більше 50% (дані не представлено). Концентрації 10 мМ ПАМ-2 виявилось достатньою, щоб реактивувати біоселективний елемент після використання інгібіторів з високою концентрацією (рівень інгібування приблизно 85%). Тому для подальших експериментів була обрана 10 мМ концентрація ПАМ-2 як реактиватора ацетилхолінестерази.

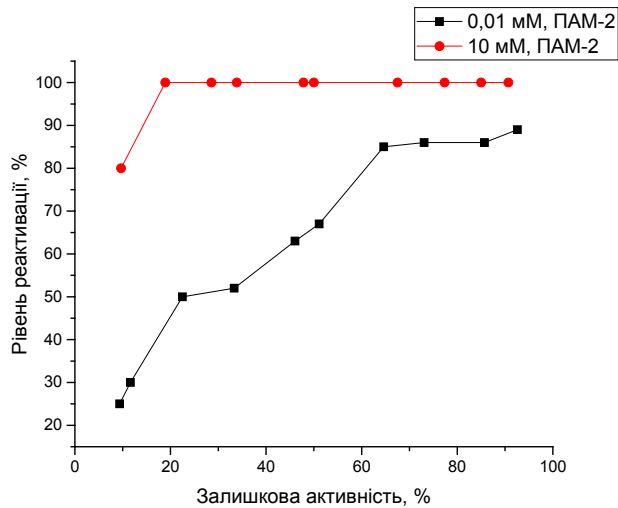


Рис. 6. Залежність рівня реактивації ацетилхолінестерази в складі біосенсора від її залишкової активності після попереднього інгібування трихлорфоном для концентрацій ПАМ-2 10 мМ та 0,01 мМ.

Наступним кроком було дослідження рівня реактивації активності іммобілізованого ферменту від часу інкубації біосенсора в 10 мМ розчині ПАМ-2. Після інгібування пестицидом трихлорфон концентрацією 75 мкМ (рівень інгібування приблизно 85%), датчик відмивали та додавали реактиватор ПАМ-2 безпосередньо у комірку з буфером і чекали деякий час, після чого отримували новий відгук на ту ж саму концентрацію АцХХ.

За результатами дослідження побудовано діаграму залежності залишкової активності іммобілізованої АцХЕ від часу реактивації датчика в розчині ПАМ-2 (рис. 7).

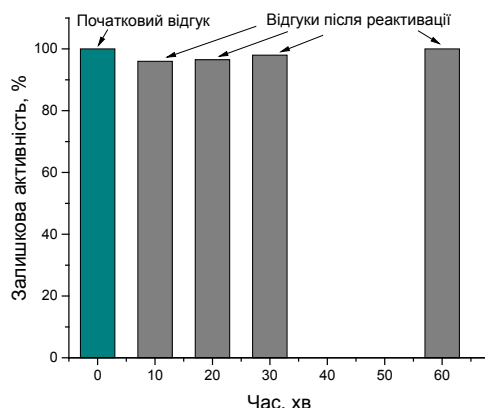


Рис. 7. Залежність залишкової активності АцХЕ від часу реактивації в 10 мМ ПАМ-2. Концентрація АцХХ – 8 мМ, концентрація трихлорфону – 75 мкМ.

З отриманих даних видно, що найбільш компромісним часом реактивації є 30 хв, оскільки різниця між відгуками на субстрат (до інгібування та після відновлення) становить приблизно 2%, що з одного боку відповідає майже повній реактивації датчика, а з іншого не потребує так багато часу, як при реактивації протягом 60 хв.

Наступним завданням було підібрати процедуру інгібування іммобілізованої АцХЕ в складі біосенсора афлатоксином В1. Для цього досліджували два варіанти (рис. 8):

1) Додавання АФВ1 в комірку з біосенсором до кінцевої концентрації 12,8 мкМ відбувалось відразу після отримання відгуку на субстрат АцХХ концентрацією 8 мМ. Після цього чекали 30 хвилин, та оцінювали рівень інгібування.

2) Додавали афлатоксин в комірку з біосенсором заповнену буфером (без субстрату), 3 хвилини інтенсивно перемішували, після цього мішалку вимикали і чекали ще 30 хвилин. Потім додавали субстрат АцХХ концентрацією 8 мМ і отримували відгук біосенсора.

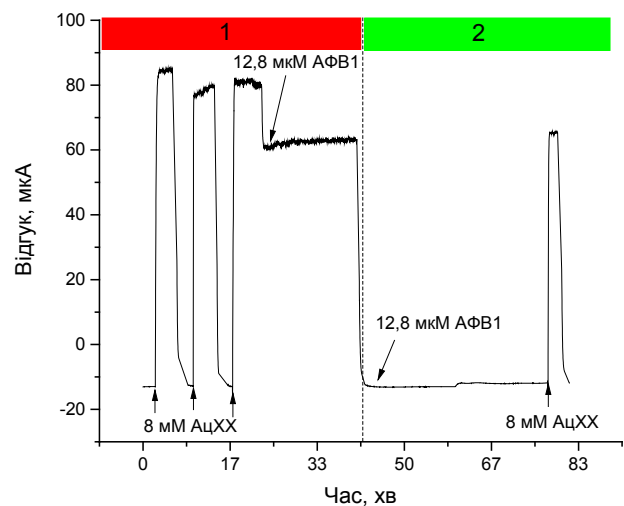


Рис. 8. Типові сигнали біосенсора за різних процедур інгібування АцХЕ афлатоксином В1 (1 – додавання афлатоксину в комірку з субстратом; 2 – додавання афлатоксину в комірку за відсутності субстрату).

З результатів експерименту видно, що обидві процедури інгібування призводять до одного і того ж рівня пригнічення ферменту (18,4%), тому для подальшої роботи була обра-

на друга процедура, тому що саме вона є оптимальною для інгібування як афлатоксином, так і трихлорфоном.

Наступним завданням роботи було дослідження синергізму дії трихлорофону та афлатоксину В1 при інгібуванні ними іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів ацетилхолінестерази. Для інтерпретації отриманих результатів використовували метод ізоболограм для оцінки синергізму між двома речовинами [27]. На такому графіку дози двох речовин відкладаються на осях x та y , а ізоболі представляють собою лінії, що зв'язують рівноеквівалентні дози цих речовин поодиночки та разом.

При побудові такої діаграми кожна компонента перераховується в комплексні одиниці токсичності, які відкладаються на осях x та y . Точки, що знаходяться значно нижче кривої концентраційного додавання, визначають ефект синергізму, тобто багатократного збільшення комбінованого ефекту впливу суміші речовин порівняно зі впливом цих компонент окремо. Точки, що знаходяться вище кривої концентраційного додавання, визначають ефект додавання, коли комбінований ефект впливу суміші дорівнює сумарному ефекту впливу цих окремих компонент. Точки, що лежать за межами границі незалежності однієї компоненти від іншої, визначаються як ефект антагонізму, тобто коли відбувається зменшення комбінованого ефекту впливу суміші речовин порівняно зі впливом окремої компоненти. Одиниці токсичності для кожної суміші визначають як відношення ефекту інгібування ферменту кожною компонентою поодиночки до ефекту інгібування ферменту їхньою сумішшю [27]. Ізобольні діаграми для різних співвідношень афлатоксину АФВ1 та пестициду трихлорфон наведено на рис. 9.

Із рисунка видно, що у випадку інгібування іммобілізованої ацетилхолінестерази різними сумішами афлатоксину АФВ1 та пестициду трихлорфон ми маємо точки, які знаходяться в межах кривої концентраційного додавання, тому можемо рахувати, що маємо ефект до-

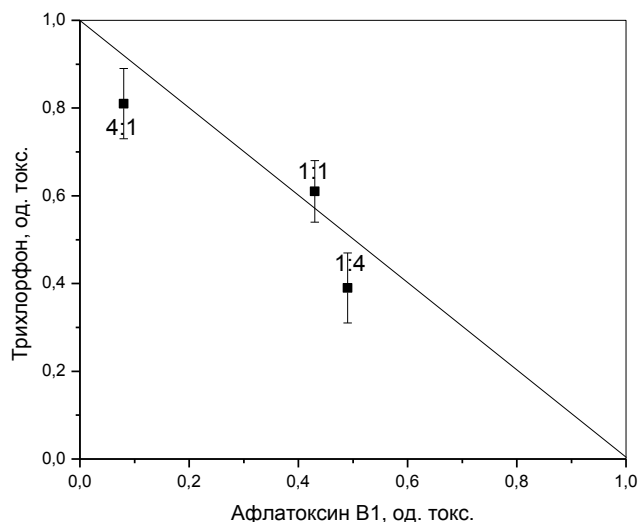


Рис. 9. Ізобольна діаграма інгібування іммобілізованої АцХЕ сумішами афлатоксину АФВ1 та пестициду трихлорфон з різними співвідношеннями компонент.

Останнім кроком було визначення трихлорофону та афлатоксину В1 в суміші (рис.10). Для цього отримували відгук біосенсора на 8 мМ АцХХ. Після відмикки датчика буферним розчином, відбувалося додавання суміші токсинів безпосередньо у комірку з буферним розчином, чекали 3 хвилини з інтенсивним перемішуванням, після цього перемішування вимикали і чекали ще 30 хвилин. Потім знову відбувалось додавання субстрату АцХХ концентрацією 8 мМ і отримували відгук біосенсора. Рівень сумарного інгібування АцХЕ трихлорфоном та АФВ1 складав $I_{\text{Трих}} + I_{\text{АФВ1}} = 37,2\%$.

Після отримання відгуку біосенсор відмиквали та отримували ще один відгук на внесення субстрату, який виявився більшим ніж попередній, що пояснюється тим, що афлатоксин В1 інгібує ацетилхолінестеразу оборотно на відміну від трихлорфону. Після відмикки біосенсора відгук на субстрат збільшився і рівень інгібування вже складав 16,8%, що відповідає незворотному інгібуванню фермента трихлорфоном. Виходячи з цього, можна з легкістю вирахувати інгібування кожного компонента окремо. Отже для пестициду трихлорфон рівень інгібування складає $I_{\text{Трих}} = 16,8\%$, а для афлатоксину В1 $I_{\text{АФВ1}} = 37,2\% - 16,8\% = 20,4\%$.

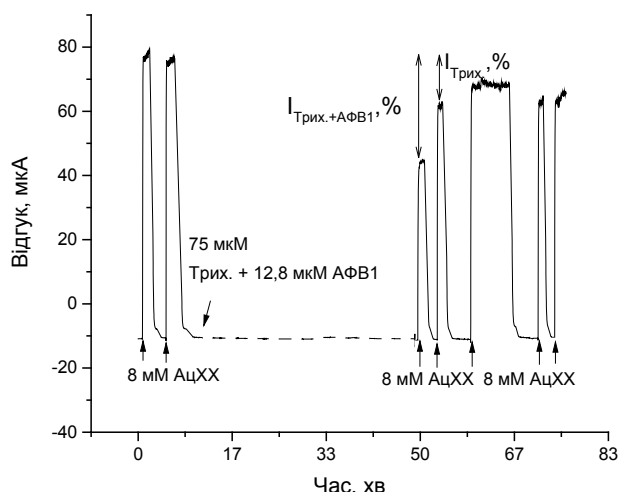


Рис. 10. Типові сигнали біосенсора при одночасному визначенні трихлорфону та афлатоксину В1 в суміші.

Інкубація біосенсора в 10 мМ розчині ПАМ-2 призводила до повного відновлення величини відгука, і біосенсор знову був готовий до проведення досліджень.

Висновки

Таким чином було розроблено та оптимізовано процедуру селективного аналізу мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди за допомогою потенціометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

Список використаної літератури

[1]. S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment // *Food Chem. Toxicol.*, 60, pp. 218–237 (2013).

[2]. I. B. Rejeb, F. Arduini, A. Arvinte, A. Amine, M. Gargouri, L. Micheli, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi, Development of a bioelectrochemical assay for AFB1 detection in olive oil // *Biosensors and Bioelectronics*, 24, pp. 1962–1968 (2009).

[3]. L. Campone, A. L. Piccinelli, R. Celano, L. Rastrelli, Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products // *Journal of Chromatography A*, 1218, pp. 7648–7654 (2011).

[4]. M. Kazemi, A. M. Tahmasbi, R. Valizadeh, A. A. Naserian, and A. Soni, Organophosphate pesticides: A general review // *Agric. Sci. Res. J.*, 2(9), pp. 512–522 (2012).

[5]. F. Sanchez-Santed, M. T. Colomina, E. Herrero Hernandez, Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration // *Cortex*, 74, pp. 417–426 (2016).

[6]. I. Var, B. Kabak, F. Gok, Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC // *Food Control*, 18, pp. 59–62 (2007).

[7]. W. S. Khayoon, B. Saad, C. B. Yan, N. H. Hashim, A. S. Mohamed Ali, M. I. Salleh, B. Salleh, Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up // *Food Chemistry*, 118, pp. 882–886 (2010).

[8]. M. Solfrizzo, A. De Girolamo, V. M. T. Lattanzio, A. Visconti, J. Stroka, A. Alldrick and H. P. van Egmond, 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*, 5 (1), pp. 15–48 (2013).

[9]. W. Jiang, Z. Wang, G. Nölke, J. Zhang, L. Niu, J. Shen, Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // *Food Anal. Methods*, 6, pp. 767–774 (2013).

[10]. V. Andreu and Y. Picñ, Determination of currently used pesticides in biota // *Anal. Bioanal. Chem.*, 404, pp. 2659–2681 (2012).

[11]. D. Sharma, A. Nagpal, Y. B. Pakade, J. K. Katnoria, Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review // *Talanta*, 82, pp. 1077–1089 (2010).

[12]. G. Martínez-Domínguez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, Analytical approaches for the determination of pesticide residues in nutraceutical products and related matrices by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry // *Talanta*, 118, pp.

277–291 (2014).

[13]. R. Raina-Fulton, *New Trends in Pesticide Residue Analysis in Food, Dietary Supplements, and Highly Processed Consumer Products* // *J. AOAC Int.*, 98, pp. 1163-1170 (2015).

[14]. K. Sharafi, N. Fattahi, A. H. Mahvi, M. Pirsahab, N. Azizzadeh, and M. Noori, Trace analysis of some organophosphorus pesticides in rice samples using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, // *J. Sep. Sci.*, 38(6), pp. 1010–1016 (2015).

[15]. Q. Wang, X. Zhang, Z. Xu, and H. Gao, Simultaneous Determination of Three Trace Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography // *Food Anal. Methods*, 8, pp. 2044-2051 (2015).

[16]. X. Miao, D. Liu, Y. Wang, Y. Yang, X. Yang, and H. Gong, Modified QuEChERS in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of the Floating Organic Droplet Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Milk Samples // *J. Chromatogr. Sci.*, 2, p. bmv089 (2015).

[17]. X. Yuan, R. L. Chapman, Zhiqian Wu, *Analytical Methods for Heavy Metals in Herbal Medicines* // *Phytochem. Anal.*, 22, pp. 189–198 (2011).

[18]. M. Zaib, M. M. Athar, A. Saeed, U. Farooq, Electrochemical determination of inorganic mercury and arsenic // *Biosens. Bioelectron.*, 74, pp. 895–908 (2015).

[19]. G. March, T. D. Nguyen, B. Piro, Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis // *Biosensors*, 5(2), pp. 241-275 (2015).

[20]. Shi chuan Li, Jun hua Chen, Hong Cao, Dong sheng Yao, Da ling Liu, Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes // *Food Control*, 22, pp. 43-49 (2011).

[21]. S. Piermarini, L. Micheli, N. H. S. Ammida, G. Palleschi, D. Moscone, Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B-1 detection // *Biosens. Bioelectr.*, 6, pp. 1434–1440 (2007).

[22]. H. S. Ammida, L. Micheli, S. Piermarini, D. Moscone, G. Palleschi, Detection of aflatoxin

B-1 in barley: Comparative study of immunosensor and HPLC // *Anal. Lett.*, 39, pp. 1559–1572 (2006).

[23]. F. Arduini, I. Errico, A. Amine, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Moscone, Enzymatic Spectrophotometric Method for Aflatoxin B Detection Based on Acetylcholinesterase Inhibition // *Anal. Chem.*, 79, pp. 3409-3415 (2007).

[24]. O. O. Soldatkin, O. S. Burdak, T. A. Sergeyeva, V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1 // *Sensors and Actuators B*, 188, pp. 999 – 1003 (2013).

[25]. K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature // *Analytica Chimica Acta*, 854, pp. 161–168 (2015).

[26]. V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // *Biosensors and Bioelectronics*, 18, pp. 1047–1053 (2003).

[27]. V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, O. P. Soldatkin, Investigation of main potato glycoalkaloids interaction in inhibition of immobilized butyryl cholinesterase by them // *Ukr. biokhim. Zhurnal*, 78(5), pp. 155-161 (2006).

Стаття надійшла до редакції 10.10.2016 р.

УДК 577.15, 543.554

DOI 10.18524/1815-7459.2016.4.86653

OPTIMIZATION OF PROCEDURE OF SEPARATE BIOSENSOR DETECTION OF AFLATOXINS AND PESTICIDES

M. Yu. Korobko^{1,2}, K. V. Stepurska^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,2}, V. N. Arkhypova¹, S. V. Dzyadevych^{1,2}

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., 03680, Kyiv, Ukraine*

² *Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska str., 01003, Kyiv, Ukraine*

Summary

Aflatoxins are the most dangerous natural toxins as carcinogenic properties are highly polluting and could contaminated a wide range of food products. In addition, food could be contaminated with toxins of artificial origin, such as pesticides. Today, number of different electrochemical biosensors for detection of toxic substances has been developed, but a very small number of biosensors were adapted for use with real samples. Moreover, they are not completely selective to certain classes of toxins.

Aim. Development and optimization of procedure of separate biosensor analysis of the multicomponent sample with aflatoxins and pesticides.

Methods. The potentiometric biosensor method of analysis was used. As transducers were pH-sensitive field effect transistors. Acetylcholinesterase was immobilized on the surface of potentiometric transducer using covalent cross-linking of the enzyme with BSA via glutaraldehyde.

Results. The concentration of acetylcholine as a substrate for subsequent inhibition analysis was fit (8 mM acetylcholine chloride); optimal time of enzyme inhibition by toxins solution was determinate (30 min) together with concentration of reactivator pyridine-2-aldoxymethylidyd (10 mM) and time of enzyme reactivation after inhibition (30 min). A synergism of trichlorfon and aflatoxin B1 in inhibition of immobilized on a surface pH-sensitive field-effect transistors acetylcholinesterase was investigated.

Conclusions: The proposed procedure allows selective determination the composition of the multicomponent sample with aflatoxins and pesticides, and adapted for application to real environmental samples.

Keywords: aflatoxins, trichlorfon, biosensor, immobilized acetylcholinesterase, pH-sensitive field-effect transistors

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ РОЗДІЛЬНОГО БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНІВ ТА ПЕСТИЦИДІВ

М. Ю. Коробко^{1,2}, К. В. Степурська^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}, В. М. Архипова¹, С. В. Дзядевич^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна, e-mail: dzyad@yahoo.com

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна,

Реферат

Афлатоксини є одними з найнебезпечніших токсинів природного походження, оскільки мають високі канцерогенні властивості та забруднюють широкий спектр продуктів харчування. Також харчові продукти можуть бути забруднені штучними токсинами неприродного походження, такими як пестициди. На сьогодні розроблено ряд різноманітних електрохімічних біосенсорів для визначення токсичних речовин, але зовсім невелика кількість із них адаптовано для роботи з реальними зразками. До того ж вони не є повністю селективними до окремих класів токсинів.

Метою даної роботи була розробка та оптимізація процедури селективного визначення мультикомпонентного зразку, в складі якого є як афлатоксини, так і пестициди, за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази.

Методи дослідження: В роботі використовували потенціометричний біосенсорний метод досліджень. Як перетворювачі виступали рН-чутливі польові транзистори. Імобілізація ацетилхолінестерази на поверхні потенціометричного перетворювача здійснювалась за допомогою ковалентного зшивання ферменту з БСА за допомогою глутарового альдегіду.

Результати дослідження: Підібрано робочу концентрацію ацетилхоліну як субстрату для подальшого інгібіторного аналізу (8 мМ ацетилхолін хлорид, АцХХ), оптимальний час інгібування ферменту розчином токсинів (30 хв), необхідну концентрацію реактиватора піридин-2-альдоксимметилйодиду (10 мМ) та часу реактивації ферментної біоселективної мембрани після її інгібування пестицидом (30 хв). Досліджено синергізм дії трихлорофону та афлатоксину В1 при інгібуванні ними іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів ацетилхолінестерази.

Узагальнення та висновки: Запропонована процедура дозволяє селективно визначати склад мультикомпонентного зразку, що містить як афлатоксини, так і пестициди.

Ключові слова: афлатоксини, трихлорфон, біосенсор, іммобілізована ацетилхолінестераза, рН-чутливий польовий транзистор