

УДК 543.253

ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРБИЦИДА ПРОПАНИЛА

Н.Ю. Ильичева, Р.М. Бейлинсон, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников, О.Н. Ванягина

(Казанский государственный университет; e-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru)

Предложено определение хлорорганического пестицида пропанила с использованием иммобилизованных антител в качестве иммуоэкстрагентов и холинэстеразных биосенсоров двух типов, основанное на использовании активирующего действия пропанила на иммобилизованную холинэстеразу, входящую в состав разработанных биосенсоров. Показана возможность определения пропанила в рисе на уровне концентраций ниже ДОК. Проведен анализ образцов риса.

Современная аналитическая химия предлагает разные методы мониторинга остаточных количеств пестицидов. Помимо распространенных методов (хроматографии, масс-спектрометрии [1–3]) в настоящее время для определения пестицидов все чаще используют биосенсорные устройства.

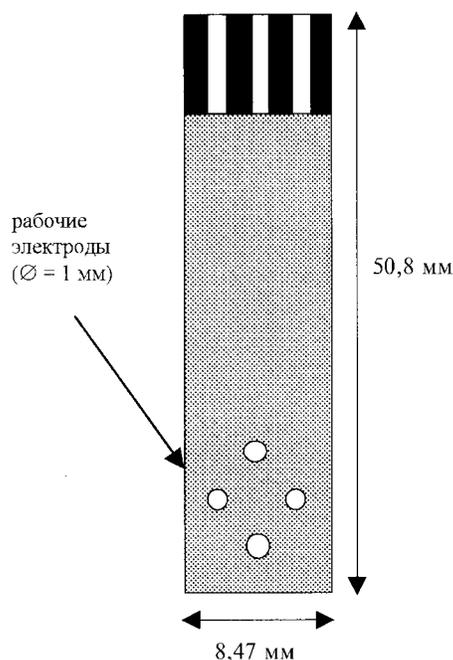
Анализ периодической литературы показывает, что одним из самых распространенных ферментов, используемых для разработки биосенсоров на пестициды, является холинэстераза (ХЭ) [4–7]. Однако следует отметить, что холинэстеразные биосенсоры в большинстве случаев не могут обеспечить селективность определения, так как многие соединения способны выступать в качестве эффекторов ХЭ, оказывая влияние на ее активность и вызывая тем самым интегральный отклик. Причем чаще всего учитывается ингибирующая способность этих соединений. С нашей точки зрения, весьма перспективным является сочетание иммунологических реакций антитело–антиген с последующей электрохимической регистрацией аналитического сигнала.

Цель данной работы – разработка варианта иммунохимического определения хлорорганического пестицида пропанила, который используется против просяных сорняков при выращивании риса и кориандра. Предлагаемый нами вариант иммунохимического анализа состоит в использовании иммобилизованных антител для предварительной иммуоэкстракции пестицида из образца и регистрации содержания анализируемого соединения с помощью холинэстеразных биосенсоров различной конструкции. Определение основано на способности изучаемого соединения вызывать увеличение каталитической активности иммобилизованной ХЭ.

Экспериментальная часть

Использовали два вида холинэстеразных биосенсоров. Один из них – амперометрический холинэстеразный биосенсор (АХЭБ), состоящий из стационарного ртутно-пленочного электрода (СРПЭ) с серебряной подложкой и бутирилхолинэстеразы (БухЭ), иммобилизованной в нитратцеллюлозную (НЦ) мембрану. Работу с таким видом биосенсора проводили на потенциостате ПИ-50–1.1, совмещенном с компьютером IBM PC-286 с ячейкой, термостатированной при $(25 \pm 0,2)^\circ$ с помощью термостата ТС-50. Электродом сравнения служил насыщенный каломельный электрод. Сенсорную часть АХЭБ получали, как описано в работе [8]. Для иммобилизации применяли препараты БухЭ сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8; активность 29 АЕ/мг), изготовленные Пермским НИИ вакцин и сывороток, органические растворители высокой чистоты (бутилацетат, толуол, гексан), а также 25%-й раствор глутарового альдегида (ГА) фирмы “ICN”. В качестве матрицы использовали НЦ типа коллоксилин со средним содержанием азота 11,5–12,0%.

Основой второго типа холинэстеразных биосенсоров служила система из четырех печатных платиновых электродов на планарной керамической подложке (*BVT Technologies*, г. Брно, Чехия) (рисунок). Все измерения с использованием этих электродов проводили в потенциостатическом режиме с помощью многоцелевого электрохимического детектора “МЭВ” с компьютеризированным управлением. Псевдоэлектродом сравнения служила впаянная в рабочую микроячейку (объем микроячейки 200 мкл) серебряная проволока, образующая в растворах иодидсодержащего субстрата иодидсеребряный электрод сравнения.



Система из четырех платиновых электродов на керамической подложке

Использовали систему из двух холинэстеразных биосенсоров, один из которых включал БУХЭ сыворотки крови лошади, а другой – ацетилхолинэстеразу (АХЭ) электрического угря. Для иммобилизации ХЭ на печатных платиновых электродах готовили смесь, содержащую бычий сывороточный альбумин (БСА), фермент и ГА (1%-й раствор). 1 мкл этой смеси наносили на рабочую поверхность электрода.

В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) и ацетилтиохолин иодид (АТХИ) (“Sigma”). Водные растворы пропанила (N-(3,4-дихлорфенил)пропионамид) готовили путем их растворения в небольшом количестве метанола, а затем в бидистиллированной воде. Для получения иммобилизованных Ат (ИАт) использовали промышленно изготавливаемые ацетат целлюлозные (АЦ) мембранные фильтры типа

МФАС-Б-4 с размером пор 0,2 мкм (ЗАО НТЦ “Владимир”, г. Владимир). Антитела против пропанила были любезно предоставлены для исследования ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ С.А. Ереминым.

Результаты и их обсуждение

При использовании АХЭБ аналитическим сигналом служила величина тока восстановления меркаптида ртути ($E = -0,55$ В), образующегося в результате взаимодействия продукта ферментативного гидролиза субстрата БУХЭ БТХИ (тиола) с материалом СРПЭ – ртутью [8]. В присутствии пропанила в диапазоне концентраций от 1×10^{-12} до 1×10^{-9} моль/л наблюдается увеличение отклика биосенсора по сравнению с контрольным опытом в его отсутствие. При больших концентрациях пестицида изменения аналитического сигнала не наблюдалось. Эффект активации, возможно, связан с взаимодействием молекул гербицида с гидрофобными участками, расположенными вблизи активного центра фермента. Эти взаимодействия, вероятно, приводят к таким конформационным изменениям в молекуле фермента или в расположении отдельных участков его активного центра, которые могут создать благоприятные условия для участия дополнительных молекул субстрата в ферментативном процессе.

Для подбора оптимальных условий определения пропанила с помощью АХЭБ были проведены кинетические исследования в области концентраций субстрата $0,8 \times 10^{-3}$ – $2,0 \times 10^{-3}$ М в отсутствие пестицида и в его присутствии (в концентрации 5×10^{-11} и 5×10^{-10} М). Установлено, что более прочное связывание гербицида и фермента происходит при концентрации субстрата $2,0 \times 10^{-3}$ М, т.е. эта концентрация субстрата наиболее подходит для детектирования пропанила с помощью АХЭБ. Все измерения проводили в растворах с рН $7,50 \pm 0,05$, при котором сохраняется химическая стабильность изучаемого гербицида, а иммобилизованная ХЭ (ИХЭ) проявляет достаточную активность.

В интервале концентраций от 5×10^{-12} до 1×10^{-9} моль/л наблюдали линейную зависимость аналитичес-

Таблица 1

Результаты определения пропанила с помощью АХЭБ и биосенсоров на основе планарных электродов ($n = 5, P = 0,95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л					
	АХЭБ	$S, \times 10^2$	АХЭ–биосенсор*	$S, \times 10^2$	БУХЭ–биосенсор**	$S, \times 10^2$
$5,0 \times 10^{-8}$	–	–	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-8}$	4,2	$(4,8 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	6,2
$3,0 \times 10^{-10}$	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-10}$	4,3	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	5,0	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^{-10}$	4,8
$5,0 \times 10^{-11}$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^{-11}$	4,0	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-11}$	9,3	$(5,8 \pm 0,4) \times 10^{-11}$	6,9
$3,0 \times 10^{-12}$	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^{-12}$	2,6	–	–	–	–

* Биосенсор на основе иммобилизованной АХЭ электрического угря;

** биосенсор на основе иммобилизованной БУХЭ сыворотки крови лошади.

кого сигнала от концентрации, что позволяет проводить определение пестицида в указанном диапазоне концентраций с помощью АХЭБ (табл. 1). Нижняя граница определяемых содержаний составила 1×10^{-12} моль/л.

Другой вид холинэстеразного биосенсора представлял из себя систему из двух печатных платиновых электродов с иммобилизованными на их рабочих поверхностях разными холинэстеразами. Исследование влияния рН на величину отклика этой системы в фосфатных буферных растворах в диапазоне значений рН от 7,0 до 8,0 (50 мМ) показало, что при рН $7,50 \pm 0,05$ отмечается достижение наибольшей активности иммобилизованных АХЭ и БуХЭ. Субстратом для функционирования этих биосенсоров служил АТХИ (1×10^{-3} М), так как при использовании БТХИ не наблюдалось отклика АХЭ. За величину аналитического сигнала принимали величину тока, появляющегося в результате окисления продукта гидролиза АТХИ – тиола и регистрируемого в потенциостатическом режиме при потенциале 0,6 В.

Установлено, что на эти биосенсоры пропанол также оказывает активирующее действие. В изученной области концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} моль/л наблюдалась линейная зависимость отношения активности ХЭ после инкубирования в растворе, содержащем пропанол, к величине первоначальной активности фермента от $-\lg C$, что позволяет проводить определение пропанила в этой области концентраций. Правильность определений оценивали способом “введено–найдено” (табл. 1). Нижняя граница определяемых концентраций в этом случае составляла 8×10^{-12} М. Следует также отметить, что при работе с биосенсорами для проведения единичного измерения требовалось не более 200 мкл анализируемого раствора.

Полученные результаты показывают, что оба вида предлагаемых холинэстеразных биосенсоров могут быть использованы для чувствительного детектирования малых содержаний пестицида пропанила.

Для проведения стадии иммуноэкстракции, обеспечивающей селективность определения, нами был разработан способ иммобилизации антител к пропанолу на АЦ-мембранах, состоящий в равномерном распределении раствора Ат на мембранах с последующей обработкой их в парах 12,5%-го глутарового альдегида (1 ч). Для иммобилизации применяли разведение Ат к пропанолу 1:10 из первоначального раствора 1 мг/мл. Полученные ИАт сохраняли способность к связыванию

Т а б л и ц а 2

Определение пропанила в воде с помощью ИАт и АХЭБ
($n = 5, P = 0,95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	$S, \times 10^2$
$5,0 \times 10^{-10}$	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^{-10}$	4,2
$5,0 \times 10^{-11}$	$(5,1 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	3,9
$8,0 \times 10^{-12}$	$(3,6 \pm 0,4) \times 10^{-12}$	10,3

Т а б л и ц а 3

Определение пропанила в рисе с помощью ИАт и АХЭБ
($n = 5, P = 0,95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	$S, \times 10^2$
$5,0 \times 10^{-10}$	$(6,9 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	4,3
$5,0 \times 10^{-11}$	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	7,1
$5,0 \times 10^{-12}$	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^{-12}$	12,9

Т а б л и ц а 4

Иммунохимическое определение пропанила в образцах риса с помощью ИАт и АХЭБ ($n = 4, P = 0,95$)

Образцы риса (страна–производитель)	Содержание пестицида, мг/кг	$S, \times 10^2$
Таиланд	$(6,9 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	10,1
США	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-8}$	6,8
Индия	–	–
Вьетнам	–	–

антигена не менее 1 мес. Константы связывания Ат–Аг ($K_{a1} = (1,36 \pm 0,09) \times 10^{14}$ и $K_{a2} = (6,37 \pm 0,20) \times 10^{12}$ л/моль), рассчитанные по графику Скэтчарда, указывают на высокую специфичность иммунологических взаимодействий.

Иммуноэкстракция определяемого соединения с помощью ИАт состояла в последовательном проведении стадий образования иммунного комплекса (ИК) антитело–пестицид на поверхности АЦ-мембраны с последующим его разрушением. Образование ИК проводили в нейтральной среде при комнатной температуре. Для разрушения комплекса Ат–Аг применяли раствор HCl, содержащий 0,15 М NaCl (рН 4,0). Разработанная методика иммунохимического определения пропанила позволяет определять пестицид в области концентраций 5×10^{-12} – 1×10^{-9} моль/л (табл. 2). Предварительными исследованиями установлено, что перекрестная реактивность с родственными соединениями, такими как 3,4-дихлоранилин, не превышает 0,2% [9].

Содержание пестицидов в пищевых продуктах представляет на сегодняшний день одну из серьезнейших проблем. В Российской Федерации пропанол не разрешен к применению [10], однако в ряде стран его используют как гербицид против просовидных сорняков на посевах риса. В связи с этим нами была разработана методика определения пропанила в рисе (ДОК 0,3 мг/кг [11]). В качестве объектов анализа были использованы образцы риса, выращенного за рубежом и продаваемого на российском рынке. Для учета возможного влияния состава матрицы градуировочный график для определения пропанила был построен на основе водных вытяжек риса, выращенного на территории Российской Фе-

дерации (Краснодарский край). Предварительный анализ показал, что исследуемый рис не содержит пропанила (после иммуноэкстракции с помощью ИАт против пропанила величина отклика холинэстеразного биосенсора имела такое же значение, что и в отсутствие экстракта из риса). Полученные результаты указывают также на то, что в условиях разработанной методики не происходит соэкстракции каких-либо мешающих компонентов.

Методика определения пропанила в модельных ра- створах и образцах риса. Измельченный рис (1 г) заливали дистиллированной водой (5 мл) и оставляли на 12 ч, затем экстракт отфильтровывали. Для проведения иммуноэкстракции аликвоту (0,5 мл) полученного экстракта доводили водой до объема 5 мл и в полученный раствор помещали на 15 мин ИАт для образования иммунного комплекса, затем ИАт переносили на 15 мин в 5 мл раствора для разрушения ИК (раствор HCl, содержащий 0,15 М NaCl с pH 4,0). Аликвоту 0,5 мл переносили в колбу на 5 мл, в которую добавляли 0,5 мл ра-

створа БТХИ с концентрацией 2×10^{-2} моль/л и довели до метки фосфатным буфером с pH 7,5. Раствор переносили в электрохимическую ячейку и определяли содержание пропанила по градуировочному графику с помощью АХЭБ. При построении градуировочного графика для получения модельных растворов в экстракты из краснодарского риса вводили определенную концентрацию пропанила. Методом “введено-найденно” оценена правильность определений с помощью разработанной методики (табл. 3).

Проведенный анализ образцов риса выявил присутствие пропанила в некоторых из них (табл. 4). Установленное содержание пропанила в рисе из США и Таиланда находится на уровне ниже допустимых остаточных количеств. Таким образом, показана возможность селективного определения остаточных количеств пестицидов (на примере пропанила) с помощью иммуноэкстракции с использованием амперометрических холинэстеразных биосенсоров.

СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

1. Nowak J., Lewandowska L. // Chem. Anal. 1997. **42**. P. 239.
2. Baglio D., Kotzias D., Larsen BR. // Journal of Chromatography. 1999. **854**. P. 207.
3. Pan Yuanhai, Jin Jun, Jiang Ke. // Anal. Chem. 2000. **28**. P. 666.
4. Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А. // ЖАХ. 1992. **47**. С. 1358.
5. Gyurcsanyi R.E., Vagfoldi Z., Toth K., Nagy G. // Electroanalysis. 1999. **11**. P. 712.
6. Alberada-Sirvent M., Merkoci A., Alegret S. // Sensors and Actuators. 2000. **8**. P. 153.
7. Yuan-Guang Li, Yong-Xing Zhou, Jian-Lin Feng et al. Analytica Chimica Acta. 1999. № 382.P. 277.
8. Медянцева Э.П., Будников Г.К., Бабкина С.С. // ЖАХ. 1990. **45**. С. 1386.
9. Краснова А.И., Рыжова В.В., Буркин А.А., Еремин С.А. // Агрохимия. 2001. № 4. С. 76.
10. “Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению в Российской Федерации”. Приложение к журналу “Защита и карантин растений” 1998. № 5.
11. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Пылова Т.Н. Химические средства защиты растений: Справочник. М., 1980.

Поступила в редакцию 25.10.02