

ключительно дозой воздействия $C_1\tau$. Кинетические параметры ингибирования коммерческих препаратов пестицидов хорошо известны, что позволяет рассчитать теоретические пределы их обнаружения, исходя из точности измерения скорости реакции. Так, при погрешности измерения 3 % предел обнаружения C_{lim} для заданного времени инкубирования τ рассчитывается по критерию 3σ по соотношению $C_{lim}\tau \approx 0.1/k_{II}$. Тем не менее, во многих случаях результаты определения пестицидов с помощью холинэстеразных сенсоров многократно отличаются от данной оценки, причем как в большую, так и в меньшую сторону. Это неоднократно обсуждалось в обзорах, посвященных ферментативным методам определения ингибитора и связывалось, прежде всего, с гетерогенным характером реакций с участием иммобилизованной холинэстеразы [5, 8—10].

Ранее при сравнительном изучении холинэстеразных сенсоров на основе электрохимических преобразователей сигнала нами были установлены роль и механизм влияния неферментативных факторов на чувствительность определения фосфорорганических пестицидов [11—14]. Так, при иммобилизации холинэстеразы на коммерческих носителях выявлено влияние гидрофобности материала носителя. Она определяет торможение переноса ионных реактантов и сорбционное накопление гидрофобных участников ферментативного процесса. При прямой иммобилизации фермента в тонком слое на электроде диффузионные факторы нивелируются и на первое место выходят параметры структурной организации поверхностного биочувствительного слоя.

В данной работе нами продолжена сравнительная характеристика холинэстеразных сенсоров с применением новых преобразователей сигнала — углеродных электродов, модифицированных гетерогенными медиаторами электронного переноса — полианилином и ферроцианидом железа (III) (берлинской лазурью).

Использовали ацетилхолинэстеразу из электрического угря (АХЭ, КФ 3.1.1.7) с удельной активностью 463 Е/мг белка и бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади (БухЭ, КФ 3.1.1.8) с удельной активностью 580 Е/мг белка (Sigma Chemical Company, США). Иммобили-

зацию проводили в присутствии бычьего сыроточного альбумина и нафиона (5 %-я эмульсия, Aldrich, Германия). Субстратами АХЭ и БухЭ служили ацетилхолин, ацетилтиохолин хлорид (Sigma Chemical Company, США). В качестве модельных токсикантов использовали хлорпирифос-метил (*O,O*-диметил-*O*-(3,5,6-трихлоро-2-пиридил)фосфоротиоат) и паратион-метил (*O',O*-диметил-*O*-(4-нитрофенил)фосфоротиоат) и параоксон-метил (диметил-(4-нитрофенил)фосфат), Riedel-de-Haen (Германия) и Chem Service (Англия). Все другие реагенты квалификации ч.д.а. и analytical grade (Экрос, Россия; Fluka, Швейцария).

Потенциометрические измерения проводили на рН-метре-иономере Экотест-001 (Эконикс-Эксперт, Москва). Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl). Электрополимеризацию анилина выполняли на компьютеризированном вольтамперографе ИВА-5 (НПВП IVA Ltd., Екатеринбург, Россия).

Изображения поверхностных слоев полианилина и нафиона получены с помощью атомно-силовой микроскопии на приборе Solver P47H-PRO производства ЗАО НТ-МДТ (Зеленоград, Россия) контактным методом постоянной силы и полуконтактным методом. Обработку данных проводили с помощью программы Surfer 8.04 (Golden Software Inc.).

Модификация электрода полианилином. Использовали два различных покрытия на основе полианилина. В первом случае (ПАНИ-х) полианилин синтезировали низкотемпературным окислением анилина персульфатом аммония, допировали камфорсульфоновой кислотой*, смешивали с фенолом в соотношении 1:1 (мас.) и далее растворяли в хлороформе. Затем 5 мкл 0.15 %-го раствора ПАНИ-х наносили на поверхность электрода и высушивали при комнатной температуре. Второе покрытие (ПАНИ-э) получали электрополимеризацией анилина из серной кислоты на стеклогуглеродном электроде, предварительно обработанном 0.05—0.001 %-м нафионом (1 мкл / см² геометрической поверхности). Электрополимеризацию проводили многократным циклированием потенциала электрода в диапазоне -200 ... +1000 мВ при скорости развертки потенциала 40 мВ/с. Качество покрытия проверяли по рН-зависимости стадио-

* Авторы выражают благодарность в.н.с. А.А.Карякину, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, и с.н.с. Г.П. Карпачевой, Институт нефтехимического синтеза им. Губкина РАН, Москва, предоставившим ПАНИ-х для исследований.

нарного потенциала электрода, модифицированного полианилином.

Иммобилизация холинэстеразы. На электрод, покрытый полианилином, наносили 3 мкл смеси, содержащей 0.2 Е АХЭ или 0.1 Е БУХЭ, 1 % альбумина, 1 % глутарового альдегида и 0.1 % нафиона, высушивали при комнатной температуре и промывали в растворе глицина для связывания непрореагировавшего глутарового альдегида. Холинэстеразные сенсоры хранили при 4 °С в рабочем фосфатном буферном растворе.

Измерение сигнала биосенсора. Холинэстеразный сенсор и электрод сравнения погружали в нетермостатированную ячейку с 5 мл 0.05 М фосфатного буферного раствора, содержащего 0.1 М КСl, рН 7.0. Далее добавляли субстрат и измеряли смещение потенциала или тока при +200 мВ. Время отклика (достижение 95 % стационарного значения потенциала после введения 1.5 мМ субстрата) составляло 3—5 мин.

Определение пестицидов. Хлорпирифос-метил и паратион-метил перед измерением сигнала "активировали" окислением электрогенерированным хлором в условиях гальваностатического электролиза с платиновыми электродами при внешнем напряжении 6 В [15]. Электролиз проводили в рабочем буферном растворе в течение 2—10 мин. После этого в раствор добавляли 100 мкл 1 %-й муравьиной кислоты и доводили рН до 7.0.

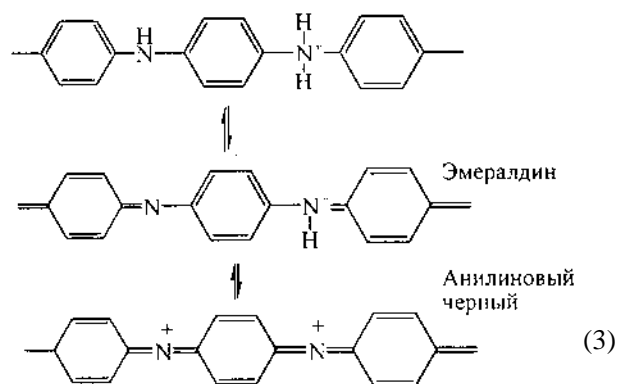
Для измерения ингибирующего действия пестицидов ферментный сенсор погружали в раствор ингибитора после электролиза на 10 мин, после чего промывали водой, переносили в буферный раствор и повторяли измерение сигнала, как описано выше. Степень ингибирования рассчитывали из относительного смещения сигнала холинэстеразного сенсора по сравнению с сигналом до его контакта с пестицидом. Для регенерации холинэстеразный сенсор выдерживали 10 мин. в 0.1 %-м 2-ПАМ (пиридинальдоксим метиодид), далее многократно промывали дистиллированной водой и кондиционировали в рабочем буферном растворе в течение 10—20 мин. Каждый сенсор позволял проводить 5—8 измерений ингибирующего действия пестицидов, если степень ингибирования не превышала 60 %.

При измерении пестицидов в виноградном соке из белого винограда *uva italia extra* выдавливали сок, добавляли в него раствор 1 мг/мл пестицида в этаноле до требуемой конечной концентрации, после чего сок разбавляли в 10 раз

рабочим буферным раствором и проводили электролиз, как описано выше. После этого измеряли сигнал и рассчитывали степень ингибирования фермента. Измерения проводили только с иммобилизованной АХЭ, после ингибирования ферментный сенсор не регенерировали.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью ППП MicroCal Origin 7.5 по не менее чем 3 измерениям.

Операционные характеристики холинэстеразных сенсоров. Сигнал потенциометрических холинэстеразных сенсоров на субстрат обусловлен изменением потенциала полианилина в результате образования в поверхностном слое уксусной кислоты (1). Поскольку в окислительно-восстановительных превращениях полианилина (3) участвуют ионы водорода, рН-чувствительность его равновесного потенциала определяется соотношением числа электронов (n) и протонов (m), переносимых в расчете на одну иминогруппу полимера (4) [16].



$$E = E^0 + \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{OX}]}{[\text{Red}]} - 0.059 \frac{m}{n} \text{pH} \quad (4)$$

В случае ПАНИ-х, содержащего камфорульфуоновую кислоту, происходит сверхэквивалентный перенос иона водорода ($m=3$, $n=2$), что определяет высокий наклон электродной функции и устойчивость полимера в нейтральной и слабощелочной среде. Потенциал электрода, модифицированного ПАНИ-х, линейно зависел от рН буферного раствора в диапазоне рН 5.0—8.0 с наклоном 85—88 мВ/ед.рН. ПАНИ-э был менее устойчив при хранении сенсора и давал наклон электродной функции 55—58 мВ/ед. рН, что согласуется с уравнением (4) при $n=m=2$. При рН > 6 в процессе эксплуатации сенсора наблюдалось прогрессирующее снижение рН-отклика, по-видимому, за счет частичной деполиме-

ризации полианилина и его смыва с электрода в растворе. Для стабилизации полимера было предложено до электролиза покрывать электрод тонким слоем нафiona (1 мкл 0.05—0.001 % нафiona на 1 см² геометрической площади электрода). В результате рН-зависимость потенциала электрода стабилизировалась, а верхнее рабочее значение рН повысилось до 7.0. Изображения поверхности, полученные методом атомно-силовой микроскопии, показали (рис. 1), что нафion в процессе высыхания на электроде образует округлые поры, в которых начинается процесс полимеризации анилина. В результате после первых нескольких циклов сканирования потенциала полианилин формируется в виде чет-

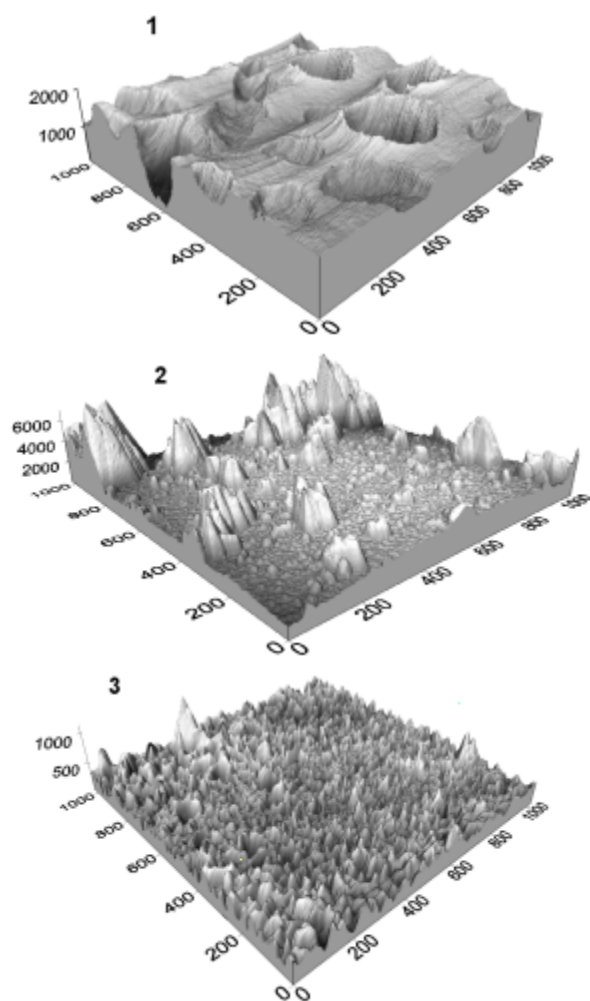


Рис. 1. Поверхность стеклоглеродного электрода, покрытого 0.05 %-м нафionом (1 мкл/см²) (1) и полианилином поверх нафiona, 6 (2) и 10 (3) циклов сканирования потенциала. Размерности по осям *x* и *y* — нанометры, по оси *z* — ангстремы.

ко выраженных пиков, соответствующих, по видимому, порам в низлежащем слое нафiona. Далее микрорельеф несколько сглаживается, но остается заметным при числе циклов до 20. В последующем использовали 10 циклов сканирования потенциала, обеспечивающие воспроизводимую шероховатую поверхность. Вероятно, образование такого наноструктурированного полианилина на полианионной матрице нафiona стабилизирует его структуру и расширяет область допирования и диапазон рН-зависимости равновесного потенциала.

Характеристики сигнала потенциометрических холинэстеразных сенсоров на основе электродов, модифицированных полианилином, приведены в табл. 1. Оптимальный состав смеси, используемой для иммобилизации, был определен ранее для сходных условий эксперимента [13].

Показатели удельной активности иммобилизованных ферментов с учетом различной рН-чувствительности потенциала электрода, модифицированного ПАНИ-х и ПАНИ-э, слабо зависят от природы субстрата. Возможно, различия в скорости холинэстеразного гидролиза эфиров холина и тиохолина частично компенсируются более кислым характером SH-группы тиохолина по сравнению с OH-группой холина [17], а значит, ее меньшим вкладом в суммарный сдвиг рН на поверхности электрода.

По продолжительности функционирования и устойчивости сигнала сенсор на основе ПАНИ-э показал лучшие характеристики по сравнению с электродом, покрытым ПАНИ-х. Так, холинэстеразный сенсор с электрополимеризованным полианилином показал 50 %-е снижение сигнала после 5 мес хранения в буферном растворе при 4 °С, дрейф сигнала в серии многократных измерений при комнатной температуре в течение недели составил в среднем 4 % в день. Соответствующие показатели для биосенсора на базе электрода, модифицированного ПАНИ-х, составили 2–3 месяца и 6 % соответственно. Вероятно, большей стабильности холинэстераз, иммобилизованных на ПАНИ-э, способствует выраженная шероховатость микрорельефа полианилина на подложке нафiona. Сходный эффект был получен при сравнении стабильности иммобилизованной АХЭ на микропористых и гладких графитовых носителях [18].

Насыщение мембраны субстратом наблюдалось практически при одной и той же концентрации субстрата независимо от источника фермента и природы модификатора. Это подтверж-

Т а б л и ц а 1

Характеристики сигнала потенциометрических холинэстеразных сенсоров на основе электродов, модифицированных полианилином, на различные субстраты *

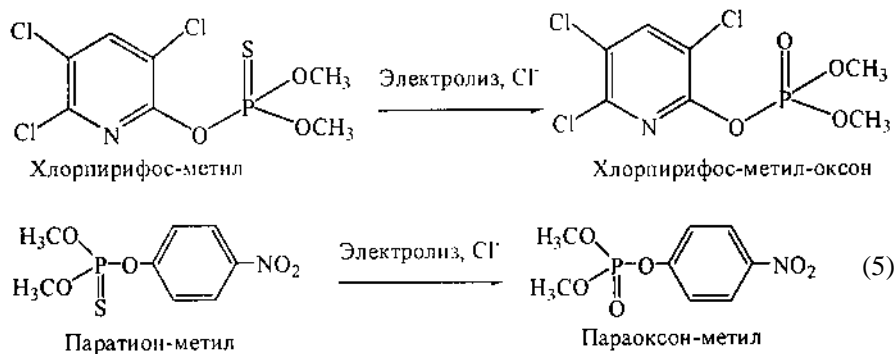
Фермент	Модификатор	Субстрат **	Диапазон определяемых концентраций, мМ	C_{lim} , мМ	S , мВ/ $\lg C_S$ ***	Максимальный сигнал, мВ
АХЭ	ПАНИ-х	АХХ	0.1–1.5	0.05	81 ± 3	120
		АТХХ	0.1–4.0	0.07	75 ± 2	86
	ПАНИ-э	АХХ	0.5–7.0	0.1	56 ± 3	85
		АТХХ	0.5–6.0	0.2	58 ± 4	85
БуХЭ	ПАНИ-х	АХХ	0.1–1.5	0.05	74 ± 5	95
		АТХХ	0.4–3.0	0.1	88 ± 5	90
	ПАНИ-э	АХХ	1–10	0.4	64 ± 4	50
		АТХХ	0.3–12	0.3	65 ± 5	55

* Диапазон определяемых концентраций соответствует линейной области зависимости сигнала биосенсора в координатах E , мВ— $\lg C_S$, М; ** АХХ — ацетилхолин хлорид, АТХХ — ацетилтиохолин хлорид; *** чувствительность (наклон линейной части градуировочной зависимости в координатах E , мВ— $\lg C_S$, М).

дает отсутствие диффузионных ограничений переноса субстрата в поверхностном слое, поскольку по содержанию белка и активности фермента условия иммобилизации практически не отличались. Несколько большее количество АХЭ, взятое для иммобилизации, связано с меньшей эффективностью ее связывания глутаровым альдегидом по сравнению с БуХЭ. Это приводит к дополнительным потерям фермента, частично вымываемого в раствор после формирования поверхностного слоя на этапе кондиционирования. Поскольку максимальная чувствительность определения ингибиторов достигается при использовании концентраций субстрата, отвечающих насыщению поверхностного слоя, все последующие эксперименты по определению пестицидов проводили при концентрации АХХ 1.5 мМ.

Определение пестицидов в модельных растворах. Хлорпирифос-метил и паратион-метил при концентрациях, превышающих 10 мкМ, показали незначительное обратимое ингибирующее действие на иммобилизованные ферменты. Снижение сигнала холинэстеразных сенсоров слабо и нерегулярно зависело от продолжительности инкубирования и концентрации пестицида. Окси-

сление пестицидов электрогенерированным хлором позволило значительно — более чем в 10000 раз — снизить определяемые концентрации ингибиторов. По-видимому, основным процессом при электролизе растворов пестицидов в присутствии хлоридов натрия или калия является окисление тионной серы с образованием фосфорильных аналогов пестицидов — хлорпирифос-метил-оксона и параоксон-метила:



Эффективность окисления несколько выше в щелочной среде, по-видимому, за счет образования гипохлорита натрия, однако и при pH 7.0 за 10 мин электролиза степень превращения тиофосфатов превышает 90%. Об этом судили по соответствию степени ингибирования, полученной для продукта электролиза паратион-метила и параоксон-метила, измеренной в одинаковых условиях. Также не отличались накло-

ны соответствующих градуировочных зависимостей.

Дальнейшее увеличение продолжительности электролиза до 20 мин практически не влияет на ингибирующее действие хлорпирифос-метила и несколько снижает ингибирование паратион-метила, возможно, за счет окислительной деградации пестицида. Следует отметить, что устойчивость пестицидов после электролиза значительно понижается: хлорпирифос-метил-оксон снижает ингибирующее действие на АХЭ в два раза в течение 4 ч хранения при комнатной температуре, параоксон-метил — за 6 ч, причем динамика распада пестицида практически совпадала для нативной и иммобилизованной АХЭ.

Результаты определения пестицидов приведены в табл. 2. Значения k_{II} определяли по углу наклона анаморфозы зависимости ингибирования от концентрации ингибитора в координатах $C_I - \ln \frac{100}{100-I}$, где C_I — объемная концентрация пестицида и $I, \%$ — степень ингибирования фермента. Данная зависимость является формой уравнения Элдриджа в предположении, что отсутствует диффузионное торможение переноса субстрата и изменение сигнала биосенсора отражает изменение скорости его холинэстеразного гидролиза.

Обращает внимание совпадение расчетных

значений k_{II} , полученных с нативным и иммобилизованным ферментами при использовании в составе ферментного сенсора электрода, модифицированного ПАНИ-х. В то же время, при применении модификатора ПАНИ-э расчетные значения k_{II} существенно возросли. Наклон градуировочной зависимости $I, \%$ — $\lg C_I$ (чувствительность определения пестицида) в целом менее зависит от модификатора и определяется скорее диапазоном концентраций пестицида, используемым для расчетов. При переходе от ПАНИ-х к ПАНИ-э происходит не только закономерное снижение нижней границы определяемых содержаний, но и увеличение верхней границы, что нивелирует изменение чувствительности, обусловленное кинетикой взаимодействия фермент—пестицид.

Можно предположить, что улучшение характеристик определения фосфорорганических пестицидов связано со структурой полимерного покрытия. Высокая шероховатость микрорельефа увеличивает доступность фермента для взаимодействия с пестицидом. Возможно, имеет значение также взаимодействие ароматических фрагментов полианилина и молекул пестицида. Так, более гидрофобный хлорпирифос-метил меняет ингибирующее действие в зависимости от природы модификатора в большей степени, нежели паратион-метил.

Полученные результаты определения пестицидов сопоставимы или превосходят данные, приводимые в литературе для близких условий измерения сигнала. Так, амперометрический сенсор на основе печатного графитового электрода с иммобилизованной БуХЭ показал предел обнаружения хлорпирифос-метила — $1 \cdot 10^{-6}$ М [19]. В случае паратион-метила, исходный пестицид весьма слабо ингибирует АХЭ (предел обнаружения 2 мг/л, или $8 \cdot 10^{-6}$ М, кондуктометрическое измерение сигнала биосенсора [20]). Оценку чувствительности разработанных сенсоров к паратион-метилу можно оценить по литературным данным, относящимся к фосфорильным формам — параоксон-метилу и близкому аналогу параоксону. Они варьируют в очень широких пределах — от $n \cdot 10^{-9}$ М (потенциометрический сенсор на основе оксидов палладия и иридия с АХЭ,

Т а б л и ц а 2

Аналитические характеристики определения пестицидов (инкубирование 10 мин, в скобках приведены значения k_{II} для нативной БуХЭ)

Модификатор	Фермент	$k_{II}, \text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	C_{lim}, M	Диапазон концентраций, М	Чувствительность, % на порядок концентрации
Хлорпирифос-метил ($2 \cdot 10^6$)					
ПАНИ-х	АХЭ	$1 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7} - 9 \cdot 10^{-7}$	65 ± 3
	БуХЭ	$3 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	70 ± 4
ПАНИ-э	АХЭ	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8} - 4 \cdot 10^{-7}$	50 ± 5
	БуХЭ	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-7}$	51 ± 3
Паратион-метил ($3 \cdot 10^5$)					
ПАНИ-х	АХЭ	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^{-8}$	$3.5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$	90 ± 7
	БуХЭ	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-6}$	55 ± 3
ПАНИ-э	АХЭ	$2 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$	74 ± 5
	БуХЭ	$5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-7}$	69 ± 3

иммобилизованной в полиакриламидном геле [21], амперометрические сенсоры с электродом, модифицированным тетрацианохиноди-метаном [22, 23]) до $n \cdot (10^{-7}—10^{-6})$ М (биосенсоры на основе полевых транзисторов и кондуктометрических сенсоров [24], амперометрический сенсор с АХЭ и холиноксидазой, иммобилизованных на нейлоне [25]). Как уже отмечалось, различие в указанных значениях не может быть связано только с фермент-ингибиторной специфичностью и разной степенью приближения к теоретическому пределу, определяемому величиной бимолекулярной константы ингибирования и точностью измерения сигнала. К сожалению, в большинстве работ, посвященных холинэстеразным сенсорам, отсутствуют кинетические параметры ингибирования, а аналитические характеристики, как показано в данном исследовании, менее информативны. Можно предполагать, что снижение чувствительности определения в неоптимальных условиях может быть связано с потерями ингибитора в результате его спонтанного гидролиза в щелочной среде. Кроме того, изменение активности фермента после ингибирования зависит от его исходной удельной активности, а также от чувствительности измерения сигнала на субстрат. Не случайно наиболее низкие пределы обнаружения ингибиторов получены с использованием медиаторных амперометрических сенсоров, отличающихся высокой точностью измерения отклика и низкими нагрузками ферментов, взятых для иммобилизации. Как показано в данной работе, при прочих равных условиях дальнейшее повышение чувствительности к ингибиторам достигается за счет улучшения доступа реагентов к иммобилизованному ферменту в результате микроструктурирования подложки. Сходные идеи реализованы в конструкциях амперометрических сенсоров на основе высокопористых углеродных материалов [18]. Близкого эффекта можно добиться, иммобилизуя АХЭ с использованием полиэтиленimina и других спейсеров, обеспечивающих определенную дистанцию между ферментом и электродом и конформационную подвижность АХЭ, достаточную для свободного подхода ингибитора к активному центру фермента [26]. При использовании ПАНИ-э ту же роль играет микрорельеф полимерного покрытия.

Определение пестицидов в виноградном соке. Фосфорорганические пестициды находят широкое применение в сельском хозяйстве при выращивании винограда для производства вина.

Нормы внесения пестицидов при этом многократно превосходят максимальные уровни, разрешенные при выращивании столовых сортов. Это связано с низкой устойчивостью пестицидов в процессе сбраживания виноградного сока. Тем не менее, отмечается возможность сохранения остаточных количеств пестицидов в молодом вине и их влияние на процесс брожения и созревания вина. Ранее нами была показана возможность определения до 50 мкг/кг хлорпирифос-метила в свежесобранном виноградном соке с использованием в качестве преобразователя сигнала электрода, модифицированного ПАНИ-х [13]. Представляло интерес сравнить чувствительность определения и влияние матрицы для электродов, покрытых ПАНИ-х. Измерения проводили, инкубируя холинэстеразные сенсоры в растворе сока из белых сортов винограда *uva italia extra*, с последующей отмывкой и измерением сигнала в рабочем буферном растворе. Влияние матрицы оценивали по изменению сигнала сенсора в контрольном измерении с соком, не содержащем пестицидов антихолинэстеразного действия. В качестве примера на рис. 2 представлена зависимость сигнала биосенсора на основе иммобилизованной АХЭ при добавлении 1.5 мМ ацетилхолина в фосфатном буферном растворе и после инкубирования в течение 10 мин в неразбавленном виноградном соке. Как видно, наблюдается незначительное — до 7 % — снижение сигнала

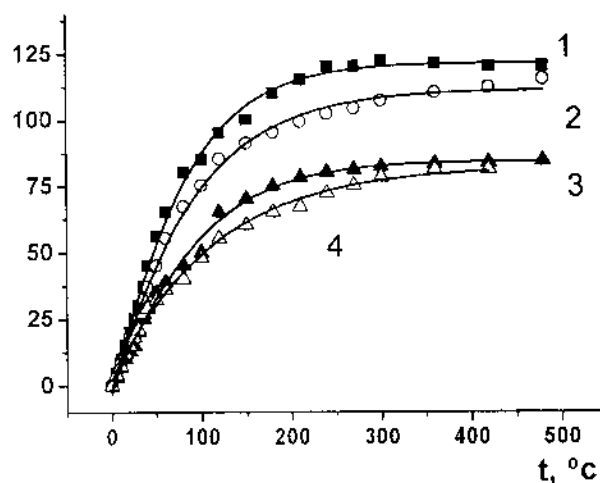


Рис. 2. Изменение потенциала холинэстеразного сенсора после добавления 1.5 мМ ацетилхолина. Электроды модифицированы ПАНИ-х (1, 2); ПАНИ-э (3, 4). Измерение в фосфатном буферном растворе, рН 7.0 (1, 3); в тех же условиях после 10 мин инкубирования в виноградном соке (2, 4).

для электрода, модифицированного ПАНИ-х при постоянстве сигнала для сенсора на основе ПАНИ-э. Возможно, это связано с влиянием электрохимически активных примесей, таких, как биогенные фенолы, на окислительно-восстановительное равновесие в системе полианилин—раствор.

Ингибирующее действие хлорпирифоса и паратион-метила, добавленных в сок, изменилось незначительно, но определяемые концентрации по сравнению с водными растворами уменьшились. Основная причина состоит в недостаточной эффективности электрохимического окисления тионовых пестицидов до фосфорильных аналогов. Если в водных растворах для этого достаточно электролиза в течение 10 мин, то в неразбавленном виноградном соке окисление приводит к увеличению влияния компонентов матрицы, скорее всего, полифенолов. Поэтому пришлось предварительно разбавлять сок рабочим буферным раствором в пропорции 1:10. Результаты определения приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Определение фосфорорганических пестицидов в виноградном соке, разбавленном 1:10 фосфатным буферным раствором ($I, \% = a + b \lg C_1$, мкг/кг)

Модификатор	b	a	R	C_{lim} , мкг/кг	Диапазон концентраций, мкг/кг
Хлорпирифос-метил					
ПАНИ-х	64 ± 2	-110 ± 4	0.9989	30	50–500
ПАНИ-э	55 ± 2	-35 ± 5	0.9978	3	10–200
Паратион-метил					
ПАНИ-х	100 ± 7	-100 ± 6	0.9969	8	15–120
ПАНИ-э	65 ± 3	-20 ± 2	0.9899	1	4–45

Наклоны градуировочных зависимостей практически совпали с наблюдаемыми в модельных водных растворах, сохранилось также соотношение пределов обнаружения, полученных при использовании ПАНИ-х и ПАНИ-э. Возможно, различие между характеристиками были бы еще выше, если бы не повышенная погрешность измерения сигнала, связанная, по-видимому, с влиянием на модификатор электроактивных компонентов сока. Тем не менее, разработанные холинэстеразные сенсоры позволяют надежно регистрировать присутствие изу-

ченных пестицидов на уровне, достаточном для контроля продукции, используемой для производства вина.

Модификация преобразователей сигнала — удобный и универсальный способ улучшения аналитических характеристик ферментных сенсоров. Помимо иммобилизации биологического компонента и генерирования аналитического сигнала, модификаторы могут быть использованы для улучшения характеристик взаимодействия низкомолекулярных соединений с биополимерами. Как показано на примере полианилина различного строения, при этом удается добиться существенного снижения определяемых концентраций и влияния матрицы объекта контроля. Учитывая, что наноструктурированный полианилин образуется в процессе электрополимеризации непосредственно на электроде и не требует трудоемких стадий предварительного синтеза и включения в состав биосенсора, данный способ модификации представляет несомненный интерес с точки зрения производства и последующего внедрения холинэстеразных сенсоров в эколого-аналитический контроль пестицидов антихолинэстеразного действия.

РЕЗЮМЕ. Проведено порівняльне вивчення потенціометричних холинэстеразних сенсорів на основі скловуглецевих електродів, модифікованих поліаніліном різної будови. Хімічно синтезований поліанілін, допований камфорсульфоновою кислотою, показав більш високий сигнал на вміст субстратів холинэстераз, тоді як поліанілін, що одержують електрополімеризацією на тонкому шарі нафіону, забезпечив вищу чутливість визначення пестицидів антихолинэстеразної дії. Показано можливість визначення хлорпирифос-метилу і паратион-метилу з межею виявлення 5 і 0.5 нмоль·л⁻¹ відповідно. Запропоновано метод визначення залишкових кількостей пестицидів у виноградному соці з електрохімічною пробопідготовкою.

SUMMARY. Comparative investigation of potentiometric cholinesterase sensors based on glassy carbon electrodes modified with polyaniline of different structure has been performed. Chemically synthesized polyaniline doped with camphor sulfonic acid showed higher signal to cholinesterase substrates whereas polyaniline obtained by electropolymerization in thin layer on Nafion provided higher sensitivity of the determination of anticholinesterase pesticides. Enzyme sensors developed make it possible to detect Chloropyrifos-methyl and Parathion-methyl with the limits of detection of 5 and 0.5 nmol·L⁻¹, respectively. Determination of pesticide residues in grape juice with electrochemical sample treatment was proposed.

1. Castillo J., Gaspar S., Leth S. et al. // Sensors Actuators B. -2004. -**102**. -P. 179—194.
2. Nistor C., Emneus J. // Waste Management. -1999. -**19**. -P. 147—170.
3. Mehrvar M., Abdi M. // Anal.Sci. -2004. -**20**. -P. 1113—1126.
4. Quinn D.M. // Chem. Rev. -1987. -**87**. -P. 955—979.
5. Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А. // Журн. аналит. химии. -1992. -**47**. -С. 1358—1378.
6. Goodson L.H., Jacobs W.B., Davis A.W. // Anal. Biochem. -1973. -**51**. -P. 362—367.
7. Aldridge W.N. // Biochem. J. -1950. -**46**. -P. 451—456.
8. Marty J.-L., Garcia D., Rouillon R. // Trends in AC. -1995. -**14**. -P. 329—333.
9. Skladal P. // Food Technol. Biotechnol. -1996. -**34**. -P. 43—49.
10. Jaffrezic-Renault N. // Sensors . -2001. -**1**. -P. 60—74.
11. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Ризаева Е.П. и др. // Журн. аналит. химии. -1999. -**54**. -С. 973—982.
12. Ivanov A.N., Evtugyn G.A., Gyurcsanyi R.E. et al. // Anal. Chim. Acta. -2000. -**404**. -P. 55—65.
13. Ivanov A., Evtugyn G., Budnikov H. et al. // Anal. Bioanal. Chem. -2003. -**377**. -P. 624—631.
14. Snejdarkova M., Svobodova L., Evtugyn G. et al. // Anal. Chim. Acta. -2004. -**514**. -P. 79—88.
15. Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Stoikova E.E., Budnikov H.C. // Electroanalysis. -1997. -**14**. -P. 1124—1128.
16. Karyakin A.A., Lukachova L.V., Karyakina E.E. et al. // Anal. Commun. -1999. -**36**. -P. 153—156.
17. Матерова Е.А., Никольская Е.Б. // Успехи химии. -1980. -**69**. -С. 1937—1944.
18. Sotiropoulou S., Vamvakaki V., Chaniotakis N.A. // Biosens. Bioelectron. -2005. -**20**. -P. 1674—1679.
19. Gogol E.V., Evtugyn G.A., Marty J.L. et al. // Talanta. -2000. -**53**. -P. 379—389.
20. Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Chovelon J.-M. // Anal. Chim. Acta. -2002. -**459**. -P. 33—38.
21. Tran-Minh C., Pandey P.C., Kumaran S. // Biosens. Bioelectron. -1990. -**5**. -P. 461—471.
22. Skladal P. // Anal. Chim. Acta. -1992. -**269**. -P. 281—287.
23. Rippeth J.J., Gibson T.D., Hart J.P. et al. // Analyst. -1997. -**122**. -P. 1425—1429.
24. Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet P. et al. // Sensors Materials. -1996. -**8**. -P. 161—167.
25. Bernabei M., Cremisini C., Mascini M., Palleschi G. // Anal. Lett. -1991. -**24**. -P. 1317—1332.
26. Vakurov A.A., Simpson C.E., Daly C.L. et al. // Biosens. Bioelectron. -2004. -**20**. -P. 1118—1125.
27. Navarro S., Oliva J., Barba A. et al. // J. Agriculture Food Chem. -2000. -**48**. -P. 3537—3541.

Казанский государственный университет
Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казань

Поступила 23.05.2005

УДК 543.54:547.562.1

В.Н. Зайцев, В.А. Халаф, Г.Н. Зайцева, С.А. Алексеев

ПОЛИОКСИЭТИЛИРОВАННЫЙ КРЕМНЕЗЕМ ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ФЕНОЛА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

В качестве твердофазного экстрагента фенола предложено использование кремнезема, содержащего на поверхности ковалентно закрепленные группы неионогенного поверхностно-активного соединения — полиоксиэтилированного изооктилфенола (ТХ-SiO₂). Установлено, что фенол количественно извлекается на ТХ-SiO₂ в форме ионного ассоциата (ИА) 4-нитрофенилазофенолята с катионом цетилтриметиламмония. При этом емкость по фенолу в области Генри составляет 2.3 мг/г сорбента, а коэффициенты распределения фенола достигают значений $3.4 \cdot 10^4$ см³/г.

В настоящее время определение фенола в воде на уровне ПДК (0.001 мг/л) возможно лишь после его экстракционного или сорбционного концентрирования [1, 2]. Сорбционное концентрирование считается более перспективным, чем экстракционное, так как позволяет проводить извлечение аналита в динамических условиях из больших объемов проб [3]. Для сорбционного концентрирования фенола и его производных применяют сополимеры [4, 5], иониты типа ХАД-4 [6], химически модифицированные кремнеземы

(ХМК) [7, 8] и др. Однако все перечисленные адсорбенты неселективны. Например, для твердофазной экстракции фенолов описано применение кремнезема с ковалентно закрепленными группами октадецилсилана [9], хотя очевидно, что на указанном ХМК адсорбируется большинство растворенных в воде органических соединений. Кроме того, из-за высокой дисперсности твердофазного экстрагента фенол в адсорбированном состоянии подвергается быстрому химическому окислению [10], что приводит к ис-

© В.Н. Зайцев, В.А. Халаф, Г.Н. Зайцева, С.А. Алексеев, 2005