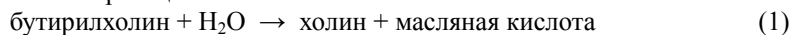


АВТОМАТИЧЕСКИЙ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННЫЙ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗАТОР ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ДРУГИХ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

А.В. Еременко, И.Н. Курочкин, Л.В. Сиголаева, Н.Л. Еремеев, А.В. Бармин, Т.Г. Морзунова, Ю.В. Кондрашов, Е.И. Райнина, С.Д. Варфоломеев, Н.В. Завьялова, В.И. Холстов

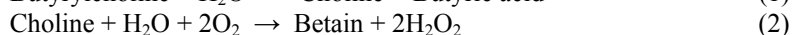
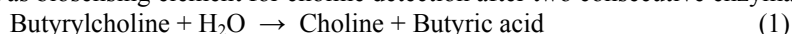
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии

Фосфорорганические соединения (ФОС), карбаматы, тяжелые металлы и другие органические соединения являются ингибиторами холинэстераз (ИХЭ). Для дискриминационного количественного и качественного анализа ФОС и других ИХЭ был разработан на основе биосенсорных технологий амперометрический проточно-инжекционный анализатор. В качестве биосенсорного элемента используется фермент холиноксидаза для детекции холина после следующих ферментативных реакций:



Аналитический отклик анализатора пропорционален току анодного окисления H_2O_2 на платиновом электроде при потенциале +600 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения. В присутствии ФОС и других ИХЭ аналитический отклик системы снижается за счет уменьшения скорости каталитического гидролиза бутирилхолина в реакции (1). Специально разработанные «программируемые» стрипы позволяют анализировать общую токсичность, определять быстрые обратимые ингибиторы и проводить количественный и качественный дискриминационный анализ ФОС и других ИХЭ. Разработаны принцип анализа и концепция дискриминации ИХЭ с использованием амперометрического проточно-инжекционного анализатора и «программируемых» стрипов.

Organophosphates (OPs), carbamates, heavy metals and many other organic compounds are inhibitors of cholinesterase (ChEIs). Amperometric flow injection analyzer based on biosensor technology has been designed for quantitative discriminative analysis of OPs and many other ChEIs. The measuring of ChEIs is based on enzymatic amperometric principle. The enzyme choline oxidase (ChO) is used as biosensing element for choline detection after two consecutive enzymatic reactions:



H_2O_2 is measured amperometrically using Pt-Ag/AgCl combined electrode in flow through cell of the analyzer. Special developed design of “programmable” strips and automatic flow-injection amperometric analyzer for cholinesterase activity analysis allow to estimate the total toxicity, fast reversible ChEIs, selective quantitative and qualitative assay of OPs and other anticholinesterase agents in the mixtures. Simple procedure of sample preparation and user-friendly design of “programmable” strips and analyzer allow fast (20–70 min) assay of water, soil, foods and whole blood samples. The principle of analysis and concept of discrimination of ChEIs using amperometric flow injection analyzer and “programmable” strips is demonstrated.

Введение

Среди химических веществ, представляющих серьезную опасность для населения и окружающей среды, особое место занимают фосфорорганические соединения (ФОС). К этой группе высокотоксичных веществ относятся агенты нервно-паралитического действия (за-

рин, зоман, VX), а также химические соединения и препараты, широко используемые в сельском хозяйстве и промышленности для борьбы с вредителями сельскохозяйственной продукции, болезнями растений и животных, сорными растениями, для регулирования роста растений [1]. Особенности, определяющими потенци-

альную опасность ФОС для человека и окружающей среды, являются: высокая биологическая активность при малых уровнях воздействия, способность к циркуляции в окружающей среде и возможность контакта с ними населения. Более того, в последнее время участились случаи угроз применения высокотоксичных химических веществ и биологических агентов в террористических целях. Поэтому разработка новых высокочувствительных методов экспресс-анализа ФОС в объектах окружающей среды и пищевых продуктах является актуальной. Однако существующие инструментальные методы анализа ФОС (газовая и жидкостная хроматография, спектрометрия, спектроскопия и т. д.) [1–3] требуют специальной процедуры пробоподготовки (экстракция органическими растворителями, прекоцентрирование и очистка образца) перед проведением анализа, что ограничивает их масштабное применение для экспресс-мониторинга.

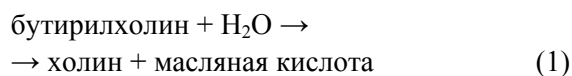
Физиологической особенностью ФОС является их способность влиять на передачу нервных импульсов, специфически блокируя фермент холинэстеразу. Это свойство фермента было использовано для создания различных тест-систем и биоаналитических устройств [4–6]. Описано большое количество электрохимических и оптических биосенсоров на основе ингибирования различных холинэстераз [6–10]. Однако существенные сложности при оценке вклада различных ингибиторов в анализируемых образцах и проведении дискриминационного анализа смесей ингибиторов являются принципиальными недостатками разработанных биосенсоров [10]. Предложенные методы также не позволяют проводить количественный анализ реальных образцов, которые могут содержать смесь различных ингибиторов (специфические необратимые, специфические обратимые, неспецифические необратимые) холинэстеразы.

Целью настоящей работы являлась разработка проточно-инжекционного экспресс-анализатора и специальных форматов анализа, позволяющих выделять вклады и проводить качественную и количественную оценку различных групп ингибиторов в смесях.

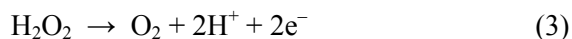
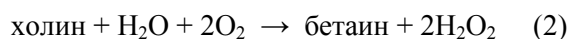
Принцип анализа ФОС и других ингибиторов холинэстераз

Для анализа ФОС и других ингибиторов использовали бутирилхолинэстеразу (БХЭ) слюворотки крови лошади (3.1.1.8.), которая представляет собой гликопротеин (МВ 360 000), состоящий из 4 одинаковых субъединиц. БХЭ катализирует гидролиз холиновых эфиров до соответствующей кислоты и холина.

Для определения активности БХЭ в электрохимическом анализаторе используется реакция (1) каталитического гидролиза бутирилхолина до холина и масляной кислоты:



Накопившийся холин измеряется с помощью амперометрического биосенсора на основе холиноксидазы (ХО) согласно реакциям (2) и (3):



Аналитический отклик анализатора пропорционален току анодного окисления перекиси водорода на платиновом электроде при потенциале +600 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения. В присутствии ФОС и других ингибиторов БХЭ аналитический отклик системы снижается за счет уменьшения скорости каталитического гидролиза бутирилхолина (реакция (1)).

Автоматический проточно-инжекционный анализатор

Конструкция анализатора. Внешний вид анализатора представлен на рис. 1. Анализатор состоит из следующих основных частей: пробоотборник, механизмы для горизонтального перемещения и вертикального перемещения пробоотборника, два перистальтических насоса, проточная измерительная ячейка, содержащая Pt-Ag/AgCl комбинированный электрод и биосенсор на основе ХО, держатель для 12-луночного стрипа, жидкокристаллический дисплей, кнопки управления, RS 232 порт, контейнеры для буферного раствора и слива, микропроцессор. Для анализа ФОС и других ингибиторов



Рис. 1. Внешний вид автоматического проточно-инжекционного анализатора ФОС и других ингибиторов БХЭ

БХЭ стрипы содержат 12 лунок, в которых находятся ферменты, субстрат и другие реагенты в определенной последовательности в зависимости от типа анализа. Последовательность переноса, фиксирование времени инкубации растворов и их отбора в измерительную ячейку проводятся в соответствии с программой микропроцессора для данного конкретного анализа [11].

Биосенсор на основе ХО. Фермент ХО, используемый для измерения холина, включен в полимерный комплекс с поли-4-винилпиридином, модифицированным на 24% лаурилбромидом, и зафиксирован между двумя слоями ацетатцеллюлозной мембраны с помощью пластикового держателя. Биосенсор фиксируется на комбинированном платиновом/хлорсеребряном электроде в проточной измерительной ячейке

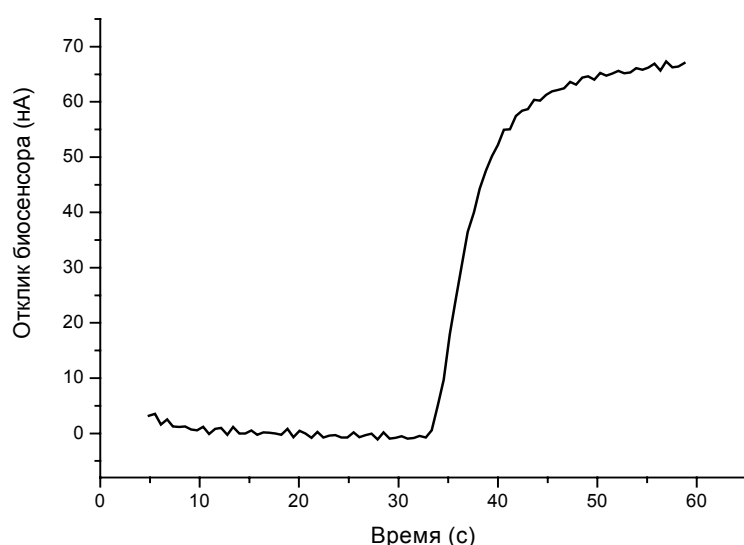


Рис. 2. Отклик проточно-инжекционного анализатора с биосенсором на основе ХО на введение в систему 400 мкМ холина

анализатора. Типичный отклик проточно-инжекционного анализатора с биосенсором на основе ХО представлен на рис. 2. Технические и эксплуатационные характеристики биосенсора на основе ХО представлены в табл. 1. Биосенсор позволяет измерять активность БХЭ в линейном диапазоне до 0,7 нМ фермента с чувствительностью $12,6 \text{ нАс}^{-1}\text{нМ}^{-1}$. Быстрый аналитический отклик биосенсора, а также хорошие технические характеристики позволяют его использовать в качестве детектора активности БХЭ и достаточно точно оценивать влияние ингибиторов на фермент.

Концепция анализа с использованием «программируемых» стрипов и автоматического анализатора

В настоящей работе приведены экспериментальные данные, полученные на основе описанного ранее теоретического рассмотрения условий проведения качественного и количественного анализа обратимых и необратимых ингибиторов с использованием ферментов [12].

Образцы для анализа. Анализируемым образцом может быть вода и экстракты из воды, почвы и пищевых продуктов. Анализатор позволяет определить в водных образцах только растворенные ингибиторы БХЭ. Однако ингибиторы БХЭ могут находиться в водных растворах и во взвешенном состоянии, в виде мицелл и различных агрегатов. В этом случае для полного анализа можно использовать процедуру экстракции органическим растворителем, такую как в случае пробоподготовки для газохроматографического анализа с последующим переводом образца в изопропанол. Для измерения ФОС и других ингибиторов БХЭ в водных образцах разработан следующий протокол. К

Таблица 1. Технические и эксплуатационные характеристики биосенсора на основе ХО

Линейность калибровки по холину	от 10 до 400 мкМ
Ошибка измерения концентрации холина	не более 2%
Операционная стабильность ХО мембран	14 дней или 1000 измерений
Стабильность ХО мембран при хранении	не менее 3 месяцев при +4°C
Рабочая температура	+15–30°C

относительно которого оценивается активность в анализируемом образце, используется дистиллированная вода, подготовленная так же, как описано выше. После этого анализируемый и

2 мл анализируемого образца в пробирке добавляется 50 мкл реактива для окисления (0,1%-ная бромная вода), проба перемешивается и инкубируется в течение 3–10 минут. Затем к образцу добавляется 250 мкл буфера-концентрата (500 мМ HEPES , 300 мМ KCl , 30 мМ EDTA , pH 7,5) и перемешивается. В качестве бланк-раствора,

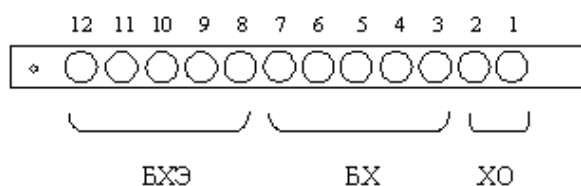
бланк- растворы готовы для проведения анализа.

Для измерения ФОС и других ингибиторов холинэстераз в экстрактах из воды, почвы и пищи проводится стандартная аналитическая процедура пробоподготовки для газовой хроматографии [3] с последующим упариванием органического растворителя и растворением полученного осадка в 1–2 мл изопропилового спирта. Далее 20 мкл экстракта добавляют к 2 мл дистиллированной воды и готовят образец для анализа так же, как в случае водных образцов. При подготовке контрольной пробы (бланк-раствор) используют 20 мкл чистого изопропанола.

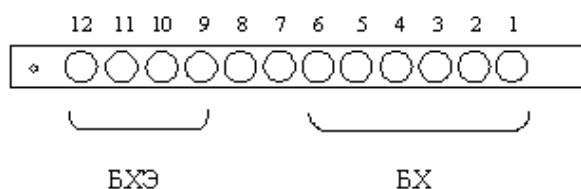
«Программируемые» стрипы для анализа ФОС и других ингибиторов БХЭ. Специально подготовленные «программируемые» стрипы предназначены для калибровки и предварительного анализа образца (А), анализа быстрых обратимых ингибиторов (Б), количественного и качественного дискриминационного анализа ФОС и других необратимых ингибиторов БХЭ (В). Для этих видов анализа используются 12-луночные стрипы с разнесенными заранее реагентами по схеме, представленной на рис. 3.

Влияние ионов тяжелых металлов. Влияние ингибиторов этой группы на активность БХЭ исключается за счет введения EDTA в состав всех буферных растворов, используемых в ходе анализа. Этот комплексон исключает влияние катионов ртути, кадмия, свинца, никеля в концентрациях до 2 мМ на активность БХЭ, оргонофосфатгидролазы (ОФГ) и величину аналитического отклика биосенсора на основе ХО. На рис. 4 показаны калибровочные зависимости для диизопропилфторфосфата (ДФФ) в отсутствии и присутствии Cd^{2+} -ионов. Введение в буферный раствор 3 мМ EDTA полностью элиминирует эффект Cd^{2+} -ионов на константу ингибирования для ДФФ, при этом не оказывая суще-

А. Стрип для калибровки и предварительного анализа



Б. Стрип для анализа быстрых обратимых ингибиторов



В. Стрип для дискриминационного анализа ФОС и других необратимых ингибиторов

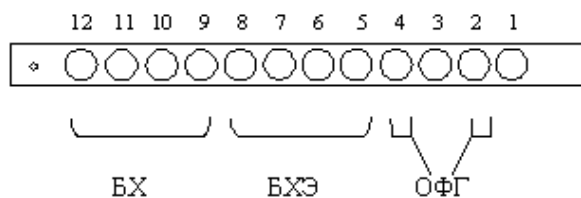


Рис. 3. «Программируемые» стрипы для предварительного анализа (А), для анализа быстрых обратимых ингибиторов (Б) и дискриминационного анализа ФОС и других необратимых ингибиторов БХЭ (В). Для стрипа (А) в лунках 3–7 находится бутирилхолин (БХ), в лунках 8–12 – БХЭ; для стрипа (Б) в лунках 1–6 находится БХ, в лунках 8–12 – БХЭ, для стрипа (В) в лунках 2 и 4 находится ОФГ, в лунках 5–8 – БХЭ, в лунках 9–12 – БХ

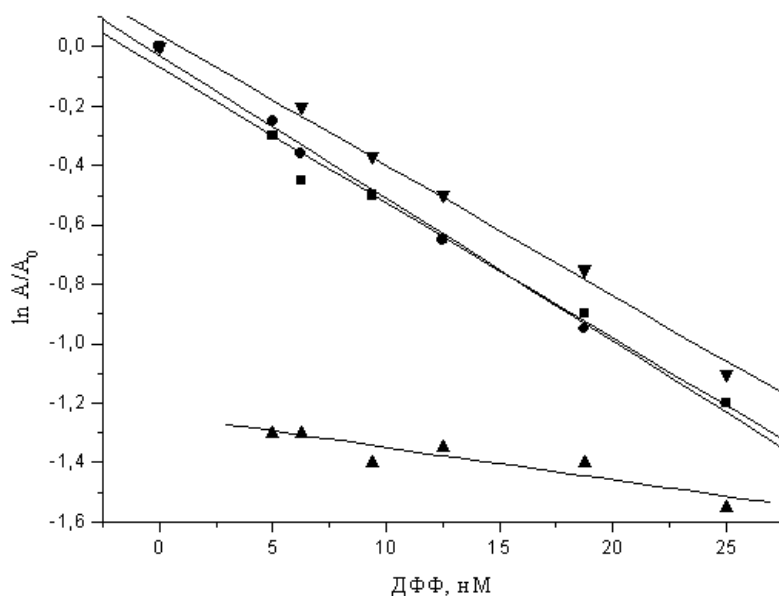


Рис. 4. Калибровочные зависимости для ДФФ, полученные в различных условиях:

- – в стандартном буферном растворе (50 мМ HEPES, 30 мМ KCl, pH 7,5)
- ▲ – в стандартном буферном растворе, содержащем 2 мМ CdCl₂
- – в рабочем буферном растворе с ЭДТА (50 мМ HEPES, 30 мМ KCl, 3 мМ ЭДТА, pH 7,5)
- ▼ – в рабочем буферном растворе с ЭДТА, содержащем 2 мМ CdCl₂

ственного влияния на активность БХЭ. Следует отметить, что концентрация 2 мМ превосходит ПДК для перечисленных выше катионов в 1000 и более раз. Проведение анализа в присутствии более высоких концентраций ионов тяжелых металлов требует разбавления исходного образца.

Предварительный анализ образца. Предварительный анализ неизвестного образца рекомендуется проводить с целью интегральной оценки вкладов всех типов ингибиторов БХЭ, за исключением ионов тяжелых металлов. Такая оценка проводится с использованием специального стрипа (рис. 3А). Для этого в лунку 3 вносится 300 мкл бланк-раствора, а в лунки 4, 5, 6 и 7 вносится 300 мкл анализируемого образца. Далее в режиме интегральной оценки всех типов ингибиторов анализатор по специальной программе проводит измерения активности БХЭ после 10 минут инкубации в стандартных условиях без ингибитора (А) и с анализируемым образцом (А_{см}).

Если относительная активность БХЭ после инкубации с анализируемым образцом А_{см}/А меньше 0,8 (активность фермента упала более

чем на 20%), то это указывает на наличие в нем ингибиторов БХЭ.

Анализ быстрых обратимых ингибиторов. К этой группе ингибиторов БХЭ относятся ароматические бис-кватернизованные аммониевые основания, органические растворители, детергенты, углеводороды, катионы металлов. Анализ этих ингибиторов основан на следующих физико-химических особенностях протекания реакций взаимодействия фермент–ингибитор. Скорость установления равновесия в реакциях образования комплексов фермент–субстрат и фермент–обратимый ингибитор, как правило, значительно выше скорости ковалентной модификации

активного центра фермента под действием необратимых ингибиторов. Это означает, что при одновременном смешении всех компонентов реакционной смеси (фермент (Е), субстрат (S) и ингибитор (I)) начальная скорость (V_{н.о}) образования продукта ферментативной реакции (Р) не будет зависеть от присутствия в системе необратимых ингибиторов (рис. 5, кривая Б). Присутствие же в системе быстрого обратимого ингибитора окажет влияние на начальную скорость ферментативной реакции при любом порядке смешения компонентов (рис. 5, кривая В).

Этот подход позволяет выделить вклад быстрых обратимых ингибиторов в присутствии достаточно высоких концентраций необратимых ингибиторов. Для этой цели анализатор снабжен стрипом для определения быстрых обратимых ингибиторов (рис. 3Б) с программой их анализа. В лунки 1, 2 и 3 этого стрипа вносится по 300 мкл бланк-раствора и такое же количество анализируемого образца вносится в лунки 4, 5 и 6.

Однако измерение величины V_{н.о} сопряжено с определенной погрешностью. Особенности конструкции анализатора не позволяют изме-

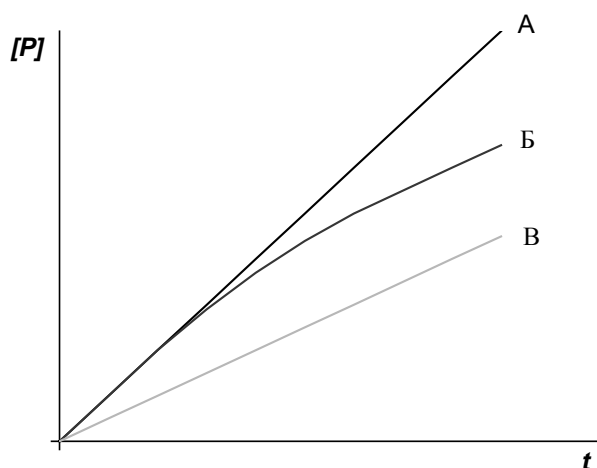


Рис. 5. Кривая накопления продукта ферментативной реакции после одновременного смешения всех компонентов реакционной смеси (фермент, субстрат и ингибитор): А – в отсутствии ингибитора, Б – в присутствии необратимого ингибитора, В – в присутствии быстрого обратимого ингибитора

речь первую точку на кривой накопления продукта быстрее, чем через 2 минуты. Поэтому реальная оценка величины начальной скорости будет занижена, если в системе присутствуют высокие концентрации необратимых ингибиторов. Верхние пределы концентраций ряда необратимых ингибиторов, при которых все еще возможно выделить вклад быстрых обратимых ингибиторов следующие: ДФФ – 1 мкМ, диазинон – 0,25 мкМ, хлорпирифос – 32 нМ, карбарил – 40 мкМ, карбофуран – 2,3 мкМ.

Программа, заложенная в конструкцию стрипа для определения быстрых обратимых ингибиторов, позволяет измерить следующие параметры процессов взаимодействия фермент–ингибитор и фермент–субстрат:

А) максимальную начальную скорость (в отсутствии ингибитора) ферментативного гидролиза бутирилхолина (V_m),

Б) скорость ферментативной реакции через 2 минуты в режиме одновременного смешения компонентов (V_2),

В) скорость ферментативной реакции через 10 минут в режиме одновременного смешения компонентов (V_{10}),

Г) начальную скорость ферментативной реакции в режиме одновременного смешения компонентов ($V_{н.о.} = (V_2 + V_{10})/2$)

Измеренные величины позволяют сделать ряд выводов о качественном составе смеси. Ва-

рианты качественного состава смеси при различных соотношениях измеренных величин приведены в табл. 2.

Количественная оценка вклада обратимых ингибиторов проводится следующим образом. Отношение величин $V_m/V_{н.о.}$ связано с концентрацией обратимого ингибитора уравнением:

$$V_m/V_{н.о.} = K_m/[S] + (K_m/[S]) \times ([I]/K_i) + 1,$$

где K_m – константа Михаэлиса реакции гидролиза бутирилхолина под действием БХЭ, $[S]$ – концентрация бутирилхолина, используемая для определения активности БХЭ, $[I]$ – концентрация ингибитора, K_i – константа обратимого ингибирования. Поскольку ингибитор (или качественный состав ингибиторов) при анализе образца заранее не известен, то концентрация обратимых ингибиторов в этом случае может быть выражена только в некоторых эффективных единицах. В настоящем анализаторе для выражения количества быстрых обратимых ингибиторов используется понятие Единицы Обратимого Ингибитора (ЕОИ). ЕОИ – это величина, равная отношению концентрации ингибитора к общей концентрации субстрата, используемой для измерения активности БХЭ, в предположении, что $K_i = K_m$.

$$ЕОИ = [I]/[S] = V_m/V_{н.о.} - 1 - K_m/[S]$$

Если концентрация ингибитора в анализируемой смеси равна 1 ЕОИ, то это означает, что $V_{н.о.}$ меньше максимально возможной скорости ферментативной реакции в 2 раза при $[S] \gg K_m$.

Следует отметить, что присутствие в анализируемом образце обратимых ингибиторов в большинстве случаев будет приводить к повышению величины минимально определяемых концентраций и занижению эффективных концентраций необратимых ингибиторов. Поэтому для разделения вкладов различных групп необратимых ингибиторов и их количественной оценки, при обнаружении обратимых ингибиторов, рекомендуется разбавлять анализируемую смесь так, чтобы исключить влияние обратимых ингибиторов на активность БХЭ.

Анализ ФОС и других необратимых ингибиторов. Присутствие ФОС и других необратимых ингибиторов определяется по степени уменьшения начальной скорости ферментативной реакции гидролиза бутирилхолина после

Таблица 2. Варианты качественного состава смеси при различных соотношениях измеренных скоростей с использованием стрипа для анализа быстрых обратимых ингибиторов

Вариант	Соотношения скоростей	Состав смеси	Рекомендации
1	$V_{10}/V_2 > 0,8$; $V_{н,о}/V_m > 0,8$	Нет быстрых обратимых ингибиторов, необратимые ингибиторы находятся в концентрациях ниже, чем, например, ДФФ – 1 мкМ, диазинон – 0,25 мкМ, хлорпирифос – 32 нМ, карбарил – 40 мкМ, карбофуран – 2,3 мкМ.	Для определения необратимых ингибиторов и дискриминации их вкладов использовать дискриминационный стрип.
2	$V_{10}/V_2 > 0,8$; $V_{н,о}/V_m < 0,8$	Есть быстрые обратимые ингибиторы, необратимые ингибиторы находятся в концентрациях ниже, чем, например, ДФФ – 1 мкМ, диазинон – 0,25 мкМ, хлорпирифос – 32 нМ, карбарил – 40 мкМ, карбофуран – 2,3 мкМ.	Концентрация обратимых ингибиторов будет выражена в reversible inhibitor units (r.i.u.) – подробнее см. ниже. Для определения необратимых ингибиторов разбавить анализируемую смесь так, чтобы реализовался вариант 1.
3	$V_{10}/V_2 < 0,8$	Необратимые ингибиторы находятся в концентрациях выше, чем, например, ДФФ – 1 мкМ, диазинон – 0,25 мкМ, хлорпирифос – 32 нМ, карбарил – 40 мкМ, карбофуран – 2,3 мкМ.	Для продолжения анализа и выделения вклада обратимых ингибиторов разбавить анализируемую смесь так, чтобы реализовались варианты 1 или 2.

10-минутной (или 60-минутной) предварительной инкубации БХЭ с анализируемым образцом. В этом случае начальную скорость ферментативной реакции (V_n) (или активность фермента – $A_{см}$ через 60 минут предварительной инкубации) следует отнести к начальной скорости ферментативной реакции, измеренной без ингибитора (V_m) (или активности фермента – A через 60 минут предварительной инкубации без ингибитора). На рис. 6 представлены в полулогарифмических координатах калибровочные зависимости необратимых ингибиторов БХЭ параоксона (А) и карбарила (Б) в присутствии необратимых ингибиторов ДФФ и параоксона, соответственно. Подобные зависимости были получены для всех возможных сочетаний качественного состава смеси следующего ряда ингибиторов: ДФФ, параоксон, диазинон, хлорпирифос, карбарил, карбафуран. Параллельный ход этих зависимостей указывает на то, что константы ингибирования фермента отдельными необратимыми ингибиторами не изменяются в присут-

ствии других ингибиторов [12]. Это позволяет определять данный класс ингибиторов в смеси.

Разделение вкладов ФОС и других необратимых ингибиторов осуществляется за счет использования фермента ОФГ, включенного в состав программируемых стрипов, который обеспечивает гидролиз ФОС, таких как ДФФ, диазинон, хлорпирифос, параоксон вплоть до концентрации 1 мМ ФОС в течение 3 минут, не разрушая при этом карбаматы и другие ингибиторы БХЭ. Таким образом, измеряя степень необратимого ингибирования до и после обработки анализируемого образца ОФГ, можно оценить парциальные вклады ФОС и других необратимых ингибиторов. Для этой цели анализатор снабжен стрипом для дискриминационного анализа (рис. 3В), в лунки которого вносится по 300 мкл бланк-раствора (лунки 1 и 2) и такое же количество анализируемого образца (лунки 3 и 4).

Количественный анализ и разделение вкладов ФОС и других необратимых ингибиторов БХЭ осуществляется по специальной програм-

ме, заложенной в конструкцию дискриминационного стрипа и микропроцессор анализатора. В режиме количественного анализа программа позволяет измерить начальные скорости фер-

ментативного гидролиза бутирилхолина в следующих условиях:

А) после 10 минут инкубации БХЭ без ингибитора – V_M ,

Б) после 10 минут инкубации БХЭ с анализируемым образцом – $V_{н,см}$,

В) после 10 минут инкубации БХЭ с анализируемым образцом, предварительно выдержанном не менее 5 минут с ОФГ, – $V_{н,офг}$.

Инкубация БХЭ с ингибиторами в течение 10 минут позволяет оценить фактически начальные скорости процесса ингибирования фермента. В этом случае выполняются следующие соотношения:

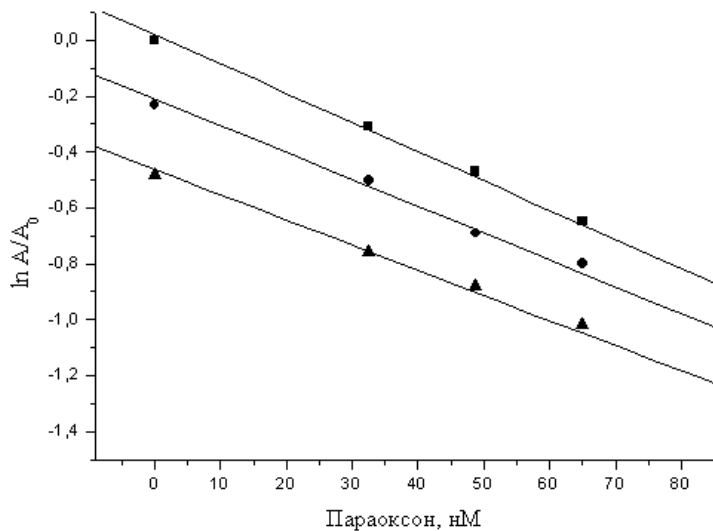
$$\ln(V_{н,см}/V_M) = \sum k_{i,ФОС} [I_{i,ФОС}] + \sum k_{j,другие} [I_{j,другие}],$$

$$\ln(V_{н,офг}/V_M) = \sum k_{j,другие} [I_{j,другие}],$$

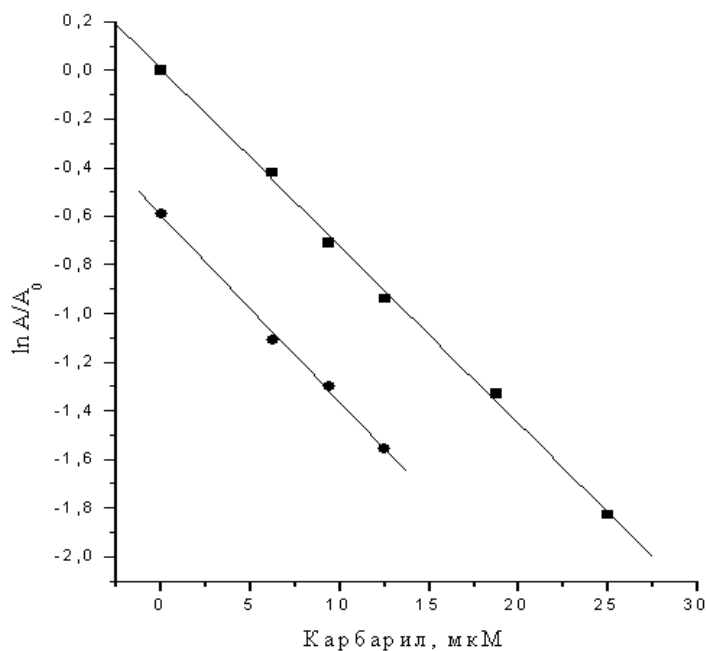
$$\ln(V_{н,см}/V_{н,офг}) = \sum k_{i,ФОС} [I_{i,ФОС}],$$

где $[I_{i,ФОС}]$ – концентрация i -го ингибитора, относящегося к классу ФОС, $k_{i,ФОС}$ – эффективная константа скорости ингибирования БХЭ данным ФОС, $[I_{j,другие}]$ – концентрация j -го ингибитора, относящегося к классу «другие необратимые ингибиторы БХЭ», $k_{j,другие}$ – эффективная константа скорости ингибирования БХЭ другим необратимым ингибитором.

Поскольку ингибитор или качественный состав ингибиторов в анализируемом образце заранее не известен, а эффективные константы ингибирования некоторых ФОС и карбаматов отличаются на несколько порядков (табл. 3), то концентрация необратимых ингибиторов в этом случае может быть выражена только в эффективных единицах. В настоящем анализе для коли-



А



Б

Рис. 6. А. Калибровочные зависимости для параоксона, полученные в присутствии различных концентраций ДФФ:

- – 0 нМ ДФФ
- – 4 нМ ДФФ
- ▲ – 8 нМ ДФФ

Б. Калибровочные зависимости для карбарила, полученные в присутствии различных концентраций параоксона:

- – 0 нМ параоксона
- – 50 нМ параоксона

Таблица 3. Эффективные константы ингибирования БХЭ для некоторых ФОС и карбаматов

Соединение	Константа ингибирования (Л·мкмоль ⁻¹ мин ⁻¹)
ДФФ	5,0±0,6
Параоксон	0,9±0,3
Карбофуран	0,05±0,01
Карбарил	0,008±0,002

качественного выражения необратимых ингибиторов в образце используются ДФФ-единицы. Другими словами, предполагается, что все необратимые ингибиторы в смеси имеют эффективные константы скорости ингибирования БХЭ, равные по величине соответствующей константе ДФФ. Тогда общие концентрации других необратимых ингибиторов БХЭ и ФОС будут следующим образом связаны с измеряемыми величинами начальных скоростей:

$$\ln(V_{н,офг}/V_m) = k_{ДФФ} [I_{эф, другие}],$$

$$\ln(V_{н,см}/V_{н,офг}) = k_{ДФФ} [I_{эф, ФОС}].$$

Значение $k_{ДФФ}$ введено в постоянную память микропроцессора, обслуживающего процесс анализа. Таким образом, эффективные концентрации необратимых ингибиторов выражаются в ДФФ-единицах – величине, равной концентрации ДФФ, которая приводит к степени ингибирования БХЭ, равной степени ингибирования, вызываемой анализируемой смесью.

В целом предлагаемый режим (количественный) анализа позволяет с высокой чувствительностью определять ингибиторы БХЭ. В табл. 4 представлены предельно детектируемые концентрации некоторых ФОС и карбаматов. Однако с целью повышения в несколько раз чувствительности определения необратимых ингибиторов в анализаторе предусмотрен режим 60-минутной предварительной инкубации анализируемого образца с БХЭ. При таких больших временах инкубации ингибитора с ферментом проведение количественного анализа компонентов смеси невозможно [12], поэтому в конструкции анализатора предусмотрен режим качественного анализа. Для этой цели используется тот же дискриминационный стрип

(рис. 3В), как и в случае количественного анализа. В режиме качественного анализа проводится измерения активности БХЭ:

А) после 60 минут инкубации БХЭ без ингибитора – V_m ,

Б) после 60 минут инкубации БХЭ с анализируемым образцом – $V_{н,см}$,

В) после 60 минут инкубации БХЭ с анализируемым образцом, предварительно выдержанном не менее 5 минут с ОФГ, – $V_{н,офг}$.

Измеренные величины A , $A_{см}$, $A_{ОФГ}$, а точнее их соотношения $A_{см}/A$, $A_{ОФГ}/A$, $A_{см}/A_{ОФГ}$, позволяют делать выводы о наличии в анализируемой смеси ФОС и других необратимых ингибиторов БХЭ в режиме качественного анализа. А именно: а) если относительная активность БХЭ после инкубации с образцом $A_{см}/A$ меньше 0,8 (активность упала более чем на 20%), то это указывает на наличие в ней необратимых ингибиторов, б) если относительная активность БХЭ после инкубации с образцом после обработки в течение 5 минут с ОФГ $A_{ОФГ}/A$ меньше 0,8 (активность упала более чем на 20%), то это указывает на наличие в образце других необратимых ингибиторов, в) если отношение $A_{см}/A_{ОФГ}$ меньше 0,8, то это говорит о наличии в анализируемом образце ФОС. В табл. 4 приведено сравнение предельно определяемых концентраций некоторых необратимых ингибиторов БХЭ в воде в режиме качественного и количественного анализа.

Предлагаемая стратегия проведения анализа ФОС и других ингибиторов БХЭ с использова-

Таблица 4. Пределы обнаружения ФОС и карбаматов непосредственно в воде без использования стандартной процедуры экстракции

Соединение	Концентрация (нМ)	
	Количественный анализ	Качественный анализ
ДФФ	4,5±0,2	0,5
Диазинон	1,8±0,3	0,2
Хлорпирифос	0,5±0,1	0,1
Параоксон	25±2	5
Карбарил	2300±300	1000
Карбофуран	43±12	10

нием автоматического биосенсорного анализатора и «программируемых» стрипов включает следующие этапы. В начале проводится предварительный анализ неизвестного образца и анализ быстрых обратимых ингибиторов с использованием соответствующих стрипов. Если по результатам анализа быстрых обратимых ингибиторов не выявлено, то далее следует проводить количественный или качественный дискриминационный анализ. При обнаружении значительного влияния образца на активность БХЭ (активность упала более чем на 20%) рекомендуется разбавлять образец, пока влияние его компонентов не будет существенно влиять на активность фермента (активность более 80%). Только после этого можно проводить анализ по выделению вкладов всех типов необратимых ингибиторов с использованием дискриминационного стрипа в режиме количественного или качественного вариантов.

Таким образом, разработан метод количественного и качественного дискриминационного анализа ФОС и других ингибиторов БХЭ с помощью специально сконструированного автоматического проточно-инжекционного анализатора и «программируемых» стрипов. Дискриминация различных групп ингибиторов основана на кинетических особенностях их взаимодействия с БХЭ и введении в состав «программируемых» стрипов фермента органофосфатгидролазы, что позволяет разделять и выделять вклады различных групп ингибиторов.

Выражаем глубокую благодарность сотрудникам ГУП ГосНИИОХТ за проведение экспериментов по верификации биосенсорного анализатора методом газовой хроматографии.

Литература

1. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р., Пылова Т.Н. Справочник по пестицидам. М.: Химия. 1985, с. 352.
2. Pieper G.R. Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1979. 22, p. 167–173.
3. Унифицированная методика определения фосфорорганических пестицидов в продуктах растительного и животного происхождения, лекарственных растениях, кормах, воде, почве хроматографическими методами. Утверждена Минздравом СССР за № 3288-85 от 11.03.85 г.
4. Makower A., Barmin A., Morzunova T., Eremenko A., et al. Anal. chim. acta. 1997. 357, p. 13–20.
5. Бармин А.В., Еременко А.В., Осипова Т. и др. Сенсор. системы. 1999. 13, № 3, с. 239–248.
6. Гиндилис А.Л., Курочкин И.Н. Прикл. биохимия и микробиол. 1998. 34, № 3, с. 326–331.
7. Campanella L., Achili M., Sammartino M.P., et al. Bioelectrochem. and Bioenerg. 1991. 26, p. 237–249.
8. Mascini M., Moscone D. Anal. chim. acta. 1986. 179, p. 439–444.
9. Ricny J., Coupek J., Tucek S. Anal. Biochem. 1989. 176, p. 221–227.
10. Luque de Castro M.D., Herrera M.C. Biosens. and Bioelectron. 2003. 18, p. 279–294.
11. Свидетельство РФ на полезную модель № 2003100360/20(001056). Приоритет 15.01.2003.
12. Еремеев Н.Л., Курочкин И.Н., Еременко А.В. и др. Вестн. МГУ, сер. 2. Химия. 2002. 53, № 6, с. 411–416.