

УДК 543.552+543.94

**ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОДА,  
МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

*Р.В. Шамагсумова, Е.С. Пивень, Р.Р. Ситдиков,  
И.И. Стойков, Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников*

**Аннотация**

Разработан холинэстеразный сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного углеродной чернью и наночастицами серебра для определения субстрата и ингибитора холинэстераз. Наночастицы серебра получали путем восстановления нитрата серебра макроциклическим лигандом, содержащим пирокатехиновые фрагменты. Найдены рабочие условия измерения сигнала на ацетилтиохолин и малаоксон. Введение наночастиц серебра в состав поверхностного слоя позволило снизить рабочий потенциал измерения сигнала до 150 мВ и повысить чувствительность отклика на малаоксон по сравнению с аналогичными биосенсорами в отсутствие модификатора. Биосенсор позволяет проводить определение  $2 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4}$  М ацетилтиохолина и  $4 \cdot 10^{-10}$ – $4 \cdot 10^{-8}$  М малаоксона при пределе обнаружения 0.4 нМ.

**Ключевые слова:** холинэстеразный сенсор, биосенсор, химически модифицированные электроды, ингибирование, определение тиолов.

**Введение**

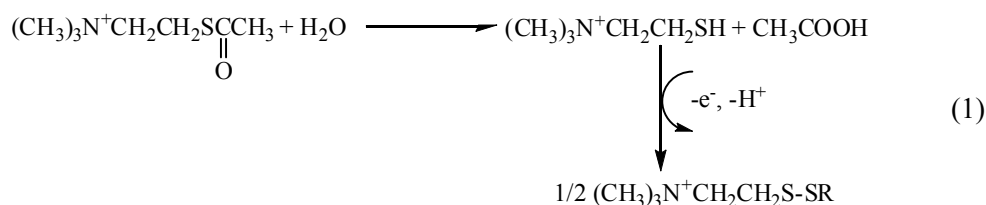
Вещества антихолинэстеразного действия – фосфорорганические и карбаминатные пестициды – находят широкое применение в сельском хозяйстве и в быту в качестве инсектоакарицидов и противопедикулезных препаратов [1, 2]. Несмотря на тенденцию к сокращению мирового производства указанной группы пестицидов, остаются актуальными вопросы их чувствительного определения в связи с их умеренно высокой токсичностью для теплокровных животных и человека, а также в связи с угрозами химического терроризма и с контролем процессов уничтожения химического оружия [3]. Блокада гидролиза нейротрансмиттера – ацетилхолина – приводит к мышечным судорогам, миозу зрачка, а при большой дозе воздействия – к смерти пострадавшего. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – биологическая мишень фосфорорганических и карбаминатных производных – является естественным компонентом биохимических аналитических устройств (биосенсоров), предназначенных для решения задач качественного обнаружения и количественного определения соединений антихолинэстеразного действия [4].

На сегодняшний день известны две стратегии определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов [5]. В первой производится оценка ингибирования АХЭ по относительному уменьшению скорости ферментативного гидролиза специфического субстрата [6]. Во второй стратегии сами пестициды выступают в качестве субстратов органофосфатгидролазы, фермента микробного

происхождения, катализирующего гидролиз эфиров органических кислот фосфора [7]. Несмотря на то что второй подход позволяет создать биосенсоры многократного действия, применение АХЭ позволяет добиться более высокой чувствительности определения пестицидов, что исключает необходимость предварительного концентрирования образца. Это является важным преимуществом, поскольку максимально разрешенные содержания пестицидов антихолинэстеразного действия находятся в наномолярном интервале концентраций, недоступных для определения с помощью органофосфатгидролазы.

Электрохимические принципы регистрации сигнала биосенсоров позволяют создать компактные устройства, отличающиеся высокой чувствительностью измерения сигнала, простотой конструкции и возможностью применения в отрыве от лабораторной базы. Поскольку ацетилхолин и продукты его ферментативного гидролиза электрохимически не активны, разработка биосенсоров на основе АХЭ требует использования химически модифицированных электродов в сочетании с синтетическими субстратами, такими как ацетилтиохолин (АТХ) или индоксилацетат.

АТХ гидролизуеться по механизму, аналогичному механизму реакции природного субстрата (1) с образованием тиохолина, который в последующем можно регистрировать по току его окисления до дисульфида [8].



Окисление тиохолина на немодифицированных электродах осложняется частичным отравлением электродов и побочным образованием сульфонов, что приводит к большому перенапряжению процесса и, как следствие, к высоким потенциалам измерения сигнала. Это снижает селективность отклика биосенсора, поскольку электрохимические примеси, присутствующие в анализируемом образце, способны мешать регистрации тока окисления целевого продукта.

Для снижения рабочего потенциала и повышения чувствительности измерения сигнала биосенсора в качестве первичного преобразователя сигнала используют электроды из благородных металлов и углеродных материалов, дополнительно модифицированные гетерогенными медиаторами электронного переноса. Описано использование в этих целях углеродных нанотрубок [9–11], оксидов [12, 13] и комплексов переменновалентных металлов [14–16], наночастиц золота [17, 18]. Однако процессы модификации электродов, как и достижение воспроизводимых характеристик сигнала холинэстеразных биосенсоров, продолжают оставаться областью интенсивных исследований.

В настоящей работе предложен новый способ регистрации сигнала холинэстеразного сенсора, в основе которого лежит реакция анодного окисления тиохолина на наночастицах серебра, получаемых путем химического восстановления нитрата серебра макроциклическими лигандами, несущими пирокатехиновые фрагменты. Выбранный способ получения наночастиц серебра позволяет

получить их устойчивые дисперсии, которые легко наносятся на стеклоуглеродный электрод и обеспечивают улучшение аналитических характеристик определения тиохолина и ингибиторов АХЭ.

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Материалы и реактивы.** В работе использовали АХЭ из электрического угря (687 Е/мг белка), *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид хлорид (EDC), *N*-гидросукцинимид (NHS), (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), ацетилтиохолин хлорид, малаоксон производства Sigma-Aldrich (Германия, США), нитрат серебра («ПЗЦМ-ВТОРМЕТ»), углеродную чернь (Cabot Corporation, Италия).

5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,26,27,28-тетраakis-[1-(2'-гидроксиэтил)-*N*-(3'',4''-дигидроксифенил)-амидокарбонил)-метокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс [4]арен в конформации *1,3-альтернат* (рис. 1) синтезирован на кафедре органической химии Казанского (Приволжского) федерального университета по методике [19]. Структура соединения подтверждена методами ИК-, ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии и данными элементного анализа.

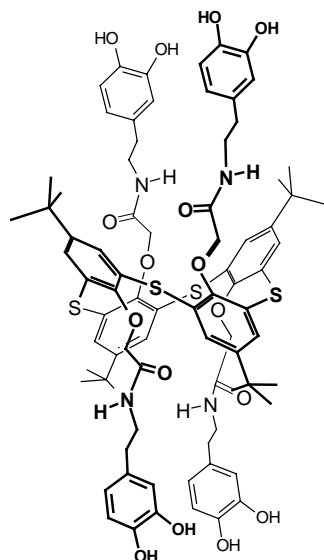


Рис. 1. Тиакаликс[4]арен с пирокатехиновыми фрагментами в заместителях нижнего обода, использованный для синтеза наночастиц серебра

Раствор тиакаликс[4]арена готовили путем растворения точной навески стандартного вещества в ацетоне. Дисперсию наночастиц серебра готовили путем смешения приготовленного раствора тиакаликсарена в ацетоне и нитрата серебра в воде в мольном соотношении 1 : 8 в присутствии триэтанолamina с последующим инкубированием в темноте в течение 30 мин.

Электрохимические измерения выполняли в 0.05 М фосфатном буферном растворе (ЗАО «Вектон», г. Санкт-Петербург) на фоне 0.1 М хлорида натрия (ООО

НПО «ТатХимПродукт», г. Казань) при pH 7.8. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду Milli-Q (компания Merck Millipore, США).

Растворы субстрата и ингибитора готовили непосредственно перед использованием аликвотным разбавлением исходного раствора буферным раствором или водой. Буферные растворы хранили при температуре 4–8 °С не более недели.

**1.2. Приборы и методы эксперимента.** Электрохимические измерения выполняли в трехэлектродной ячейке объемом 5 мл с помощью вольтамперометрического анализатора BAS CV-50W (Bioanalytical Systems, США) в режиме постоянно-токовой циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. В качестве рабочего электрода использовали дисковые стеклоуглеродные электроды (СУЭ) площадью рабочей поверхности 0.0176 см<sup>2</sup>, которые представляют собой стержни из стеклоуглерода СУ2500 (НИИ Графит, г. Москва), впрессованные в тефлоновый корпус. Токосъемником служил цилиндр из нержавеющей стали, закрепляемый с помощью резьбового соединения с противоположного рабочего торца тефлонового корпуса. Герметизацию соединений проводили с помощью клея на основе эпоксидной смолы. Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl (BAS Inc., США), противoeлектродом – платиновый электрод (BAS Inc., США). Все измерения проводили при комнатной температуре без термостатирования.

Контроль pH рабочих растворов проводили с помощью pH-метра «Эксперт-001» (ЗАО «Эконикс-Эксперт», г. Москва).

**Модификация стеклоуглеродного электрода.** На механически очищенную поверхность стеклоуглеродного электрода наносили 2 мкл дисперсии, содержащей 1 мг/мл углеродной черни в ДМФА, полученной путем обработки ультразвуком (30 Вт) в течение 30 мин. После нанесения дисперсии электрод высушивали в течение 20 мин при 70 °С. Далее на электрод наносили 2 мкл дисперсии наночастиц серебра и высушивали при комнатной температуре.

**Иммобилизация АХЭ.** На поверхность модифицированного электрода последовательно наносили 5 мкл 15 мМ раствора EDC в 0.05 М MES (pH 5.5) и 5 мкл 8.7 мМ раствора NHS в 0.05 М MES (pH 5.5). Через 30 мин электроды ополаскивали деионизированной водой и высушивали на воздухе. На сухую поверхность электрода наносили 2 мкл раствора АХЭ (6.25 или 2 Е/мл) в 0.005 М NEPES (pH 7.2) и высушивали. Готовые электроды хранили при 4 °С в сухом виде.

**Электрохимические измерения** проводили в режиме постоянно-токовой вольтамперометрии в 0.05 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, в диапазоне потенциалов от –1000 до 1000 мВ со скоростью сканирования 50 мВ/с. Хроноамперометрические измерения проводили при 150 мВ в течение 300 с после введения в раствор субстрата. Регистрировали ток окисления тиохалина как разность значений тока до и после введения в раствор 0.5 мМ раствора субстрата.

Для определения ингибитора электрод инкубировали в его растворе в течение 10 мин, после чего повторяли измерение сигнала на субстрат в тех же условиях. Степень ингибирования I% рассчитывали по уравнению

$$I\% = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

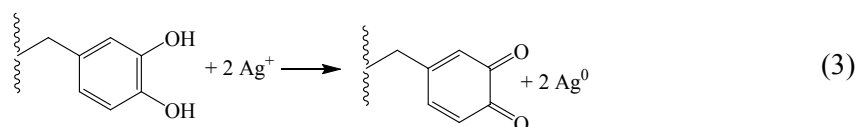
где  $I_0$  и  $I$  – токи окисления тиохолина, полученные до и после контакта биосенсора с ингибитором соответственно.

Обработку результатов измерения проводили с помощью пакета Microcal Origin 8.0.

## 2. Результаты и их обсуждение

### 2.1. Электрохимическая характеристика модифицированного электрода.

Образование нанодисперсии серебра при взаимодействии тиакаликс[4]арена и нитрата серебра было изучено ранее [19]. Реакция протекает в соответствии с уравнением (3) с образованием частиц, по данным трансмиссионной микроскопии равномерно распределенных в органической матрице, обеспечивающей как ограничение роста зародышей металлической фазы, так и перенос электрона от наночастиц к электроду:



Для ускорения процесса формирования наночастиц элементарного серебра был использован триэтанолламин. Это позволило сократить время формирования устойчивой нанодисперсии с 24 до 0.5 ч. Средний размер частиц, на который приходится до 80% их численности, составил 3–5 нм.

Введение модификаторов в состав поверхностного слоя стеклоуглеродного электрода приводит к формированию пары пиков, соответствующих окислению (**ра**) и восстановлению (**рс**) частиц серебра при 150 и 80 мВ соответственно. В отсутствие углеродной черни на вольтамперограммах наблюдается только пик окисления, причем его высота более чем в 2 раза ниже наблюдаемого при внесении модификатора. Внесение фермента блокирует процесс выноса ионов серебра в раствор, в результате чего токи пика несколько снижаются, а катодный пик исчезает. Соответствующие вольтамперограммы приведены на рис. 2.

При сужении диапазона сканирования потенциала до 0...300 мВ ток окисления тиохолина в присутствии наночастиц серебра увеличивается пропорционально концентрации АТХ за счет протекания согласованного процесса:



В отсутствие наночастиц серебра ток окисления тиохолина регистрируется при потенциале около 250 мВ, причем его величина в 2.5 раза меньше наблюдаемого в присутствии наночастиц металла. Таким образом, присутствие элементарного серебра снижает потенциал окисления тиохолина до 150 мВ и увеличивает абсолютное значение тока в 2.5 раза, что можно отнести как к облегчению окисления за счет включения в процесс серебра, имеющего высокое сродство к тиолам, так и к увеличению площади поверхности электрода при внесении наночастиц модификатора.

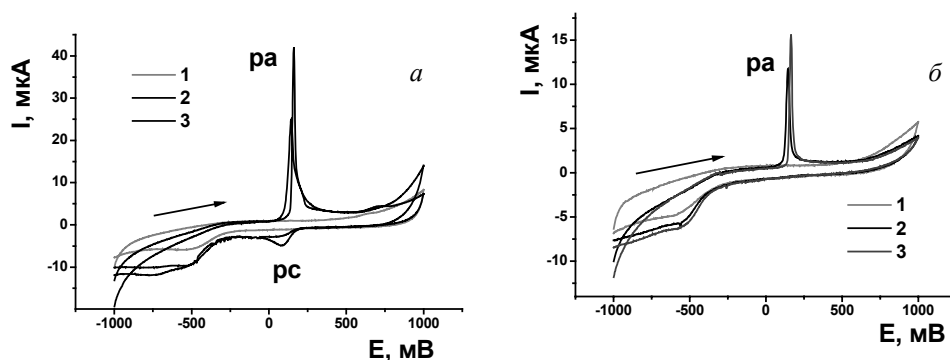


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы, полученные на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродной чернью (1), углеродной чернью и наночастицами серебра (2) и тем же покрытием после иммобилизации АХЭ (3): *a* – в присутствии и *б* – в отсутствие углеродной черни в поверхностном слое. Скорость сканирования 50 мВ/с

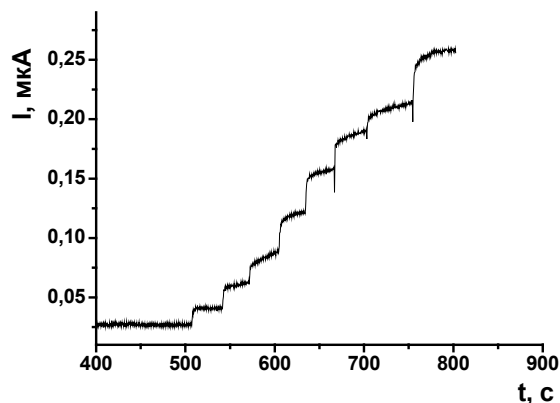


Рис. 3. Хроноамперограмма, регистрируемая при 150 мВ с помощью холинэстеразного сенсора при введении в раствор  $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  М АТХ. Измерения в 0.05 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl (рН 7.8)

В последующих измерениях использовали хроноамперометрический режим, регистрируя ток окисления при 150 мВ и последовательно вводя в раствор аликвоты АТХ. Полученные хроноамперограммы приведены на рис. 3.

**2.2. Выбор рабочих условий определения АТХ.** Поскольку определение пестицидов основано на регистрации сигнала биосенсора на субстрат, большое значение имеет установление влияния экспериментальных факторов на ток окисления тиохолина. С этой целью в режиме хроноамперометрии были установлены параметры отклика холинэстеразного сенсора на АТХ.

На рис. 4 представлены градуировочные зависимости АТХ, полученные при различных потенциалах измерения сигнала. Как следует из рисунка, при переходе от 250 к 150 мВ значения токов увеличиваются в среднем в 2.0–2.5 раза. Дальнейшее снижение рабочего потенциала сужает область линейности графика. По этой причине остальные измерения проводили при 150 мВ.

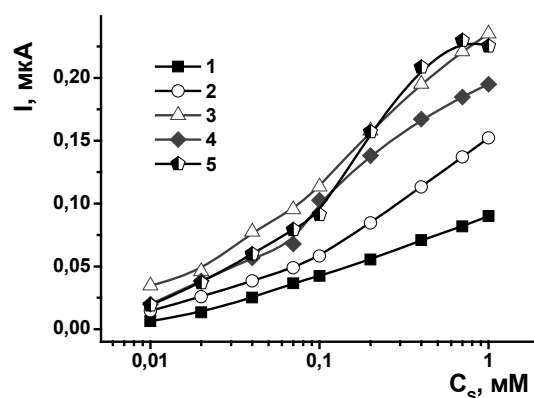


Рис. 4. Зависимость тока окисления холинэстеразного сенсора от концентрации АТХ. Измерения в 0,05М фосфатном буферном растворе, содержащем 0,1 М NaCl (рН 7,8) при разных потенциалах измерения: 1 – 250, 2 – 200, 3 – 150, 4 – 100, 5 – 50 мВ

Табл. 1

Характеристики определения АТХ с помощью холинэстеразного сенсора на основе углеродной черни и наночастиц серебра,  $I = a + b \cdot C$  ( $n = 6$ ,  $P < 0.10$ )

рН	$a$	$b$	$R^2$	Интервал концентраций, М
7.0	$0.005 \pm 0.001$	$170 \pm 15$	0.9592	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$
7.3	$0.008 \pm 0.003$	$200 \pm 31$	0.9557	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-4}$
7.5	$0.015 \pm 0.004$	$390 \pm 50$	0.9693	$1 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-4}$
7.8	$0.042 \pm 0.007$	$626 \pm 79$	0.9696	$1 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-5}$
8.0	$0.027 \pm 0.01$	$702 \pm 92$	0.9668	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5}$

Как и в случае нативного фермента, максимальный ток окисления тиохолина наблюдался в слабощелочной области при рН 7.8–8.0. Для сравнения, при рН 7.0–7.2 значение тока окисления в 4.5 раза ниже. Результаты определения АТХ приведены в табл. 1

Увеличение рН приводит к закономерному увеличению наклона градуировочной зависимости, что отражает изменение аффинности активного центра АХЭ к субстрату. В слабощелочной области интервал определяемых концентраций субстрата охватывает два порядка величины концентрации, что достаточно характерно для амперометрических ферментных сенсоров.

Сигнал сенсора показал высокую устойчивость при хранении и эксплуатации. Погрешность измерения тока окисления не превышает 5.3% в серии из 6 измерений, выполненных на одном сенсоре, и 7.8% для измерений, выполненных для 4 сенсоров, изготовленных с использованием одних и тех же реактивов. В процессе хранения в течение двух недель в сухом состоянии при 4 °С величина сигнала на 1.0 мМ АТХ уменьшается на 15%. При этом каждый сенсор позволяет провести не менее чем 20 измерений без обновления биочувствительного слоя.

**2.3. Определение малаоксона.** Для оценки возможности применения разработанного сенсора для определения ингибитора был использован малаоксон, фосфорорганический препарат, являющийся действующим началом пестицидов карбофоса и малатиона. Измерение ингибирующего действия проводили,

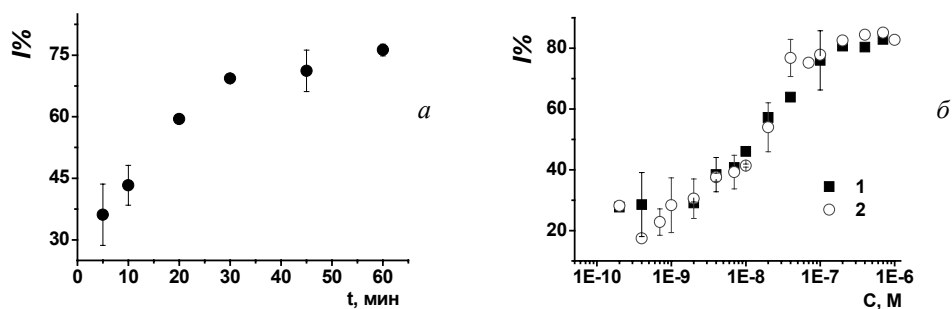


Рис. 5. Определение малаоксона: *a* – зависимость степени ингибирования I% от времени инкубирования в растворе 10 нМ малаоксона, *б* – зависимость степени ингибирования от концентрации малаоксона, концентрация АХЭ 0.125 и 0.004 Е (аликвота 2 мкл на электрод). Приведены средние значения для 6 измерений в 0.05М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl (рН 7.8) при 150 мВ, концентрация АТХ 0.5 мМ

инкубируя холинэстеразный сенсор в растворе малаоксона в отсутствие субстрата, чтобы исключить его защитное действие на активный центр АХЭ. Результаты определения степени ингибирования представлены на рис. 5.

Увеличение продолжительности контакта холинэстеразного биосенсора с ингибитором закономерно повышает степень ингибирования до предельного значения 75–80%. По-видимому, сохранение отклика связано с неферментативными путями гидролиза субстрата. Область определяемых концентраций составляет 0.4 нМ – 40 мкМ, предел обнаружения, оцениваемый как концентрация пестицида, вызывающая 15%-ное уменьшение регистрируемого тока окисления тиохолина, в изученных условиях составила 0.4 нМ. Это существенно ниже, чем аналитические характеристики аналогичных биосенсоров, описанных в литературе. Так, при использовании биосенсора с тетрацианохинодиметаном в качестве модификатора и рекомбинатными АХЭ из различных источников, включенными в матрицу полистиролпиридиний бромид, пределы обнаружения малаоксона составили 2–4 нМ [20]. Использование печатных графитовых электродов, модифицированных фталоцианином кобальта и углеродными нанотрубками с АХЭ, иммобилизованной карбодиимидным связыванием аналогично протоколу, использованному в данной работе, позволило проводить определение до 6 нМ малаоксона [16]. Таким образом, включение наночастиц серебра улучшило чувствительность определения необратимых ингибиторов АХЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-03-31725) и Минобрнауки РФ (госконтракты 16.740.11.0496 и 16.740.11.0597).

### Литература

1. Sullivan J.B., Blose J. Organophosphate and carbamate insecticides // Hazardous materials toxicology / Eds. J.B. Sullivan, G.R. Krieger. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1992. – P. 1015–1026.
2. Evtugyn G.A., Budnikov H.C., Nikolskaya E.B. Biosensors for the determination of environmental inhibitors of enzymes // Russ. Chem. Rev. – 1999. – V. 68, No 12. – P. 1041–1064.
3. Евтюгин Г.А. Ферментативные методы определения ингибиторов // Биохимические методы анализа / Под ред. Б.Б. Дзантиева. – М.: Наука, 2010. – С. 48–90.



4. *Van Dyk J.S., Pletschke B.* Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment // *Chemosphere.* – 2011. – V. 82, No 3. – P. 291–307. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.033.
5. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.* Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) // *Microchim. Acta.* – 2010. – V. 170, No 3–4. – P. 193–214. – doi: 10.1007/s00604-010-0317-1.
6. *Sassolas A., Prieto-Simón B., Marty J.-L.* Biosensors for pesticide detection: new trends // *Am. J. Anal. Chem.* – 2012. – V. 3, No 3. – P. 210–232. – doi: 10.4236/ajac.2012.33030.
7. *Orbulescu J., Constantine C.A., Rastogi V.K., Shah S.S., DeFrank J.J., Leblanc R.M.* Detection of organophosphorus compounds by covalently immobilized organophosphorus hydrolase // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78, No 19. – P. 7016–7021.
8. *Hart J.P., Hartley I.C.* Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor // *Analyst.* – 1994. – V. 119, No 2. – P. 259–263. – doi: 10.1039/an9941900259.
9. *Jubete E., Želechowska K., Loaiza O.A., Lamas P.J., Ochoteco E., Farmer K.D., Roberts K.P., Biernat J.F.* Derivatization of SWCNTs with cobalt phthalocyanine residues and applications in screen printed electrodes for electrochemical detection of thiocholine // *Electrochim. Acta.* – 2011. – V. 56, No 11. – P. 3988–3995. – doi: 10.1016/j.electacta.2011.01.123.
10. *Zhang S.-P., Zheng Y., Shan L.-G., Shi L., Leng K.* Complex and new modification techniques of thiocholine detection electrodes with carbon nanotubes // *Appl. Surface Sci.* – 2008. – V. 255, No 2. – P. 439–441. – doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.075.
11. *Ion I., Ion A.C.* Determination of chlorpyrifos in broccoli using a voltammetric acetylcholinesterase sensor based on carbon nanostructure–chitosan composite material // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2012. – V. 32. – P. 1001–1004. – doi: 10.1016/j.msec.2012.01.009.
12. *Chauhan N., Pundir C.S.* An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 701, No 1. – P. 66–74. – doi: 10.1016/j.aca.2011.06.014.
13. *Dontsova E.A., Zeifman Y.S., Budashov I.A., Eremenko A.V., Kalnov S.L., Kurochkin I.N.* Screen-printed carbon electrode for choline based on MnO<sub>2</sub> nanoparticles and choline oxidase/polyelectrolyte layers // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2011. – V. 159, No 1. – P. 261–270. – doi: 10.1016/j.snb.2011.07.001.
14. *Arduini F., Cassisi A., Amine A., Ricci F., Moscone D., Palleschi G.* Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes // *J. Electroanal. Chem.* – 2009. – V. 626, No 1–2. – P. 66–74.
15. *Song Y., Zhang M., Wang L., Wan L., Xiao X., Ye S., Wang J.* A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussian blue – chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides // *Electrochim. Acta.* – 2011. – V. 56, No 21. – P. 7267–7271. – doi: 10.1016/j.electacta.2011.06.054.
16. *Ivanov A.N., Youmusov R.R., Evtugyn G.A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G.* Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes – Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection // *Talanta.* – 2011. – V. 85, No 1. – P. 216–221. – doi: 10.1016/j.talanta.2011.03.045.
17. *Sun J., Guo L., Bao Y., Xie J.* A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 28, No 1. – P. 152–157. – doi: 10.1016/j.bios.2011.07.012.

18. *Norouzi P., Pirali-Hamedani M., Ganjali M.R., Faridbod F.* A novel acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-gold nanoparticles film for determination of monocrotophos using FFT continuous cyclic voltammetry // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2010. – V. 5. – P. 1434–1446.
19. *Evtugyn G.A., Shamagsumova R.V., Sitdikov R.R., Stoikov I.I., Antipin I.S., Ageeva M.V., Hianik T.* Dopamine sensor based on a composite of silver nanoparticles implemented in the electroactive matrix of calixarenes // *Electroanalysis.* – 2009. – V. 23, No 10. – P. 2281–2289. – doi: 10.1002/elan.201100197.
20. *Bachmann T.T., Leca B., Vilatte F., Marty J.-L., Fournier D., Schmid R.D.* Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – V. 15, No 3–4. – P. 193–201.

Поступила в редакцию  
20.03.13

---

**Шамагсумова Резеда Вакифовна** – кандидат химических наук, научный сотрудник отдела аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [rezeda84190@mail.ru](mailto:rezeda84190@mail.ru)

**Пивень Елена Сергеевна** – студент Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [md-elena@mail.ru](mailto:md-elena@mail.ru)

**Ситдиков Рузаль Рустамович** – аспирант кафедры органической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [Rusal.Sitdikov@mail.ru](mailto:Rusal.Sitdikov@mail.ru)

**Стойков Иван Иванович** – доктор химических наук, профессор кафедры органической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [Ivan.Stoikov@mail.ru](mailto:Ivan.Stoikov@mail.ru)

**Евтюгин Геннадий Артурович** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [Gennady.Evtugyn@ksu.ru](mailto:Gennady.Evtugyn@ksu.ru)

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [Herman.Budnikov@ksu.ru](mailto:Herman.Budnikov@ksu.ru)

\* \* \*

## CHOLINESTERASE SENSOR BASED ON ELECTRODE MODIFIED WITH SILVER NANOPARTICLES

*R.V. Shamagsumova, E.S. Piven, R.R. Sitdikov, I.I. Stoikov, G.A. Evtugyn, H.K. Budnikov*

### Abstract

A cholinesterase sensor has been developed on the basis of a glassy carbon electrode modified with carbon black and silver nanoparticles and applied for the determination of enzyme substrate and inhibitor. Silver nanoparticles were synthesized by chemical reduction of silver nitrate with macrocyclic ligand containing catechol fragments. The working conditions for the measurement of the signal toward

acetylthiocholine and malaoxon were established. Introduction of the silver nanoparticles made it possible to decrease the potential down to 150 mV and improve the sensitivity of the response toward malaoxon in comparison with the analogous biosensors without any modification of the transducer. The developed biosensor makes it possible to determine  $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$  M acetylthiocholine and  $4 \cdot 10^{-10} - 4 \cdot 10^{-8}$  M malaoxon (detection limit is 0.4 nM).

**Keywords:** cholinesterase sensor, biosensor, chemically modified electrodes, inhibition, thiol detection.

### References

1. Sullivan J.B., Blose J. Organophosphate and carbamate insecticides. *Hazardous materials toxicology* (Eds. J.B. Sullivan, G.R. Krieger). Baltimore, Williams and Wilkins, 1992, pp. 1015–1026.
2. Evtugyn G.A., Budnikov H.C., Nikolskaya E.B. Biosensors for the determination of environmental inhibitors of enzymes. *Russ. Chem. Rev.*, 1999, vol. 68, pp. 1041–1064.
3. Evtugyn G.A. Enzymatic methods for determination of inhibitors. *Biokhimicheskie metody analiza* (pod red. B.B. Dzantieva) [Biochemical Methods of Analysis (ed. by B.B. Dzantiev)]. Moscow, Nauka, 2010. pp. 48–90. (In Russian)
4. Van Dyk J.S., Pletschke B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 2011, vol. 82, no. 3, pp. 291–307. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.033.
5. Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchim. Acta*, 2010, vol. 170, no. 3–4, pp. 193–214. doi: 10.1007/s00604-010-0317-1.
6. Sassolas A., Prieto-Simón B., Marty J.-L. Biosensors for pesticide detection: new trends. *Am. J. Anal. Chem.*, 2012, vol. 3, no. 3, pp. 210–232. doi: 10.4236/ajac.2012.33030.
7. Orbulescu J., Constantine C.A., Rastogi V.K., Shah S.S., DeFrank J.J., Leblanc R.M. Detection of organophosphorus compounds by covalently immobilized organophosphorus hydrolase. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, no. 19, pp. 7016–7021.
8. Hart J.P., Hartley I.C. Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor. *Analyst.*, 1994, vol. 119, no. 2, pp. 259–263. doi: 10.1039/an9941900259.
9. Jubete E., Żelechowska K., Loaiza O.A., Lamas P.J., Ochoteco E., Farmer K.D., Roberts K.P., Biernat J.F. Derivatization of SWCNTs with cobalt phthalocyanine residues and applications in screen printed electrodes for electrochemical detection of thiocholine. *Electrochim. Acta*, 2011, vol. 56, no. 11, pp. 3988–3995. doi: 10.1016/j.electacta.2011.01.123.
10. Zhang S.-P., Zheng Y., Shan L.-G., Shi L., Leng K. Complex and new modification techniques of thiocholine detection electrodes with carbon nanotubes. *Appl. Surface Sci.*, 2008, vol. 255, no. 2, pp. 439–441. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.075.
11. Ion I., Ion A.C. Determination of chlorpyrifos in broccoli using a voltammetric acetylcholinesterase sensor based on carbon nanostructure–chitosan composite material. *Mater. Sci. Eng. C*, 2012, vol. 32, pp. 1001–1004. doi: 10.1016/j.msec.2012.01.009.
12. Chauhan N., Pundir C.S. An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 2011, vol. 701, no. 1, pp. 66–74. doi: 10.1016/j.aca.2011.06.014.
13. Dontsova E.A., Zeifman Y.S., Budashov I.A., Eremenko A.V., Kalnov S.L., Kurochkin I.N. Screen-printed carbon electrode for choline based on MnO<sub>2</sub> nanoparticles and choline oxidase/polyelectrolyte layers. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2011, vol. 159, no. 1, pp. 261–270. doi: 10.1016/j.snb.2011.07.001.
14. Arduini F., Cassisi A., Amine A., Ricci F., Moscone D., Palleschi G. Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 2009, vol. 626, no. 1–2, pp. 66–74.

15. Song Y., Zhang M., Wang L., Wan L., Xiao X., Ye S., Wang J. A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussian blue – chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. *Electrochim. Acta*, 2011, vol. 56, no. 21, pp. 7267–7271. doi:10.1016/j.electacta.2011.06.054.
16. Ivanov A.N., Younusov R.R., Evtugyn G.A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G. Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes – Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection. *Talanta*, 2011, vol. 85, no. 1, pp. 216–221. doi: 10.1016/j.talanta.2011.03.045.
17. Sun J., Guo L., Bao Y., Xie J. A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, vol. 28, no. 1, pp. 152–157. doi: 10.1016/j.bios.2011.07.012.
18. Norouzi P., Pirali-Hamedani M., Ganjali M.R., Faridbod F. A novel acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-gold nanoparticles film for determination of monocrotophos using FFT continuous cyclic voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2010, vol. 5, pp. 1434–1446.
19. Evtugyn G.A., Shamagsumova R.V., Sitdikov R.R., Stoikov I.I., Antipin I.S., Ageeva M.V., Hianik T. Dopamine sensor based on a composite of silver nanoparticles implemented in the electroactive matrix of calixarenes. *Electroanalysis*, 2009, vol. 23, no. 10, pp. 2281–2289. doi: 10.1002/elan.201100197.
20. Bachmann T.T., Leca B., Vilatte F., Marty J.-L., Fournier D., Schmid R.D. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, vol. 15, no. 3–4, pp. 193–201.

Received  
March 20, 2013

---

**Shamagsumova Rezeda Vakifovna** – PhD in Chemistry, Research Fellow, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [rezeda84190@mail.ru](mailto:rezeda84190@mail.ru)

**Piven Elena Sergeevna** – Student, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [md-elena@mail.ru](mailto:md-elena@mail.ru)

**Sitdikov Rusal Rustamovich** – PhD Student, Department of Organic Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Rusal.Sitdikov@mail.ru](mailto:Rusal.Sitdikov@mail.ru)

**Stoikov Ivan Ivanovich** – Doctor of Chemistry, Professor, Department of Organic Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Ivan.Stoikov@mail.ru](mailto:Ivan.Stoikov@mail.ru)

**Evtugin Gennadii Arturovich** – Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Gennady.Evtugyn@ksu.ru](mailto:Gennady.Evtugyn@ksu.ru)

**Budnikov Herman Konstantinovich** – Doctor of Chemistry, Professor, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Herman.Budnikov@ksu.ru](mailto:Herman.Budnikov@ksu.ru)