

УДК 543.866

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МИКОТОКСИНОВ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМИ БИОСЕНСОРАМИ

Э.П. Медянцева, Х. Май Тхи Тхань, Р.М. Варламова,
Е.Ю. Тарасова, Г.Р. Сахапова, Г.К. Будников

Аннотация

Амперометрические биосенсоры на основе планарных платиновых электродов и иммобилизованной холинэстеразы использованы для определения микотоксинов – охратоксина А, зеараленона, афлатоксина В1 в области рабочих концентраций $1 \cdot 10^{-5(-6)}$ – $1 \cdot 10^{-10(-11)}$ моль/л. Холинэстеразный биосенсор, модифицированный углеродными нанотрубками, позволяет сместить интервал определяемых концентраций микотоксинов в сторону более низких концентраций, наблюдать более выраженный эффект ингибирования. Показана возможность определения микотоксинов в продуктах питания на примере образцов арахиса и гречневой крупы при концентрациях на уровне и ниже ПДК.

Ключевые слова: микотоксины, амперометрический биосенсор, холинэстераза, афлатоксин В1, охратоксин А, зеараленон, пищевые продукты.

Введение

В настоящее время микотоксины относятся к одной из наиболее опасных групп токсичных соединений, представляющих угрозу здоровью населения. Поскольку эти соединения могут находиться во многих продуктах питания, поэтому вполне обоснован интерес исследователей к разработке современных способов их определения. Важность контроля за их содержанием обусловлена высоким уровнем загрязнения, обнаружением новых представителей этого класса токсинов, расширением групп продуктов питания и кормов, загрязненных микотоксинами.

Охратоксин А (ОТА) принадлежит к токсичным микотоксинам, образующимся в результате жизнедеятельности плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Он является загрязнителем зерна и продуктов на его основе, а также кофейных зерен и какао, сушеных фруктов, вина и виноградного сока, пива, специй [1]. Наряду с выраженной нефротоксичностью, ОТА обладает гепатотоксичностью, тератогенными, канцерогенными и иммунодепрессивными свойствами. С продуктами растительного и животного происхождения ОТА может попадать также и в организм человека.

Зеараленон (ЗЕА) продуцируется преимущественно плесенями *Fusarium graminearum* и *Fusarium culmorum*. Наиболее часто ЗЕА обнаруживается в кукурузе, хотя может присутствовать и в других важных зерновых культурах, таких как пшеница, ячмень, сорго, рожь. Наиболее важный эффект, который вызывает

ЗЕА, – это эстрогенный, и действует он прежде всего на урогенитальную систему. Наиболее чувствительны к ЗЕА свиньи, хотя крупный рогатый скот, птица и лабораторные животные также чувствительны к нему.

Самым опасным и распространенным афлатоксином является афлатоксин В1 (АФВ1). По своим свойствам он относится к группе фурукумаринов, содержит в молекуле лактоновую, карбонильную, метоксильную группы, бензольное кольцо и изолированную двойную связь [2]. АФВ1 опасен своими канцерогенными свойствами. Он может накапливаться в печени и способствовать возникновению опухолей, провоцировать мутации в клетках. Отмечено иммуно-депрессивное действие АФВ1, то есть снижение общих защитных сил организма. Обширные исследования свидетельствуют о том, что АФВ1 способен стимулировать развитие рака печени. Кроме того, большинство эпидемиологических данных выявляет корреляцию между подверженностью действиям АФВ1 и увеличением сферы действия рака печени.

Для определения микотоксинов в кормах и продуктах питания параллельно развиваются две основные группы методов: достаточно трудоемкие высокочувствительные методы лабораторного определения микотоксинов и экономичные скрининговые методы [1]. Первая группа методов представлена наиболее традиционно распространенными методами с использованием тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии [3], их сочетаниями в комбинации с масс-спектрометрической детекцией [4] или с помощью электронного носа [5]. В частности, основным методом определения ЗЕА является жидкостная хроматография в сочетании с флуориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием [1, 6].

В настоящее время для определения ОТА, АФВ1, ЗЕА в скрининговой группе методов главное место занимают иммунохимические методы [7–9], биосенсоры [10–13], в том числе и методы, основанные на использовании иммуносенсоров [14], и биосенсоры с модифицированными углеродными нанотрубками [15, 16]. Углеродные нанотрубки (УНТ) благодаря своим уникальным электронным и оптоэлектронным свойствам являются наиболее перспективными материалами для огромного множества приложений в композитных материалах, химических источниках тока, в электронике и т. д. Перспективы использования УНТ в качестве основы для создания миниатюрных биосенсорных устройств связаны с их размерными эффектами, а также с аналитическими характеристиками, главной из которых является высокая чувствительность к присутствию на модифицированной поверхности молекул различного типа.

Анализ литературы показывает, что использование биосенсорных технологий имеет определенные преимущества по сравнению с другими методами определения широкого круга биологически активных веществ. Использование биосенсоров для определения отдельных микотоксинов обусловлено еще тем, что они являются удобным инструментом для выполнения таких анализов благодаря своей чувствительности, селективности, относительной простоте и экспрессности выполнения, в том числе и для первичного скрининга больших партий образцов.

В рамках настоящей работы для определения некоторых микотоксинов предложены амперометрические холинэстеразные биосенсоры на основе планарных

(печатных) платиновых электродов, в том числе и модифицированных УНТ. Предпосылкой для проведения исследований послужили единичные литературные данные о влиянии АФВ1 на каталитическую активность холинэстеразы [17]. В указанной работе впервые было отмечено ингибирующее действие АФВ1 на этот фермент. Авторы [18] использовали это свойство микотоксина для разработки соответствующего биосенсора. Отметим, что рассматриваемые холинэстеразные биосенсоры разработаны на основе другого первичного преобразователя (транздьюсера) и другого способа иммобилизации фермента [19, 20].

Цель работы – оценка аналитических возможностей определения микотоксинов (охратоксина А, зеараленона и афлатоксина В1) с помощью амперометрических биосенсоров на основе планарных платиновых электродов, в том числе модифицированных УНТ, и иммобилизованной холинэстеразы.

1. Экспериментальная часть

1.1. Аппаратура и оборудование. Основой холинэстеразных биосенсоров служила система планарных электродов, состоящая из рабочего и вспомогательного электродов, а также электрода сравнения (фирма BVT Technologies, Брно, Чехия). Материалом поверхности рабочего электрода, на который иммобилизовали фермент, являлась платиносодержащая паста. Из платины изготовлен и вспомогательный электрод, электрод сравнения – из серебра. Объем рабочей ячейки системы составлял 200 мкл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора МЕВ с компьютеризированным управлением.

1.2. Реактивы. В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин хлорид (БТХХ) (ICN Biomedicals Inc., США), раствор которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более 3 ч. Применяли бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади (активность 30 АЕ/мг), изготовленную НПО «Биомед» (Россия, г. Пермь). Применяли 1%-ный раствор глутарового альдегида фирмы ICN и бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы Reanal (Венгрия).

Использовали хроматографически чистые препараты микотоксинов из государственных стандартных образцов (изготовитель: ГНУ ВНИИВСГЭ, г. Москва): охратоксин А (раствор ОТА в смеси бензола и уксусной кислоты в соотношении 99 : 1), зеараленон (раствор ЗЕА в бензоле) и афлатоксин В1 (раствор АФВ1 в смеси бензола и ацетонитрила в соотношении 98 : 2).

Для получения рабочих растворов из стандартных образцов микотоксинов проводили вакуумную отгонку бензола, ацетонитрила и уксусной кислоты при комнатной температуре. Полученные препараты ОТА, ЗЕА и АФВ1 взвешивали и использовали для приготовления рабочих растворов путем их растворения в 1 мл ацетонитрила, а затем в бидистиллированной воде.

1.3. Подготовка углеродных нанотрубок. Для модификации рабочей поверхности биосенсоров использовали многослойные УНТ (МУНТ) (Sigma-Aldrich, диаметр от 2–6 до 10–15 нм), которые предварительно очищали от остаточных

количеств оксидов переходных металлов, а также аморфного углерода, обработкой растворами кислот (1 М HNO₃ : 3 М H₂SO₄), а затем ультразвуком, используя ультразвуковую ванну (WiseClean модель WUC-A03H, DAIHAN Scientific Co. Ltd, Korea) с частотой 40 КГц в течение 1–2 ч до получения гомогенного раствора. Затем отделяли МУНТ от маточного раствора с помощью центрифуги, многократно (5–6 раз) обрабатывали водой до нейтральной реакции (до pH 7.0) [21]. Обработанные МУНТ высушивали до постоянной массы и взвешивали. Затем солибилизировали МУНТ в N,N-диметилформамиде с помощью ультразвука до получения гомогенного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Полученные растворы МУНТ использовали для модификации поверхности электродов.

1.4. Получение холинэстеразных биосенсоров. А) Для получения биочувствительной части соответствующего биосенсора на поверхность рабочего электрода наносили бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента с концентрацией 20 нкат/мкл, раствор БСА (50 мг/мл), фосфатный буфер (50 мМ, pH 7.0), 1%-ный раствор глутарового альдегида и дистиллированную воду. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь, и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси.

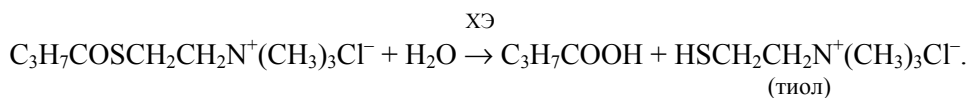
Б) Для получения нового варианта биосенсоров использовали электроды с модифицированной МУНТ поверхностью рабочего электрода. Для этого наносили по 0.5 мкл 1 мг/мл раствора МУНТ на поверхность электродов. Затем электроды высушивали в течение 1–2 ч при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером (pH 7.0) 5 мин. После этого на поверхность рабочего электрода наносили 1 мкл смеси, содержащей фермент и остальные компоненты, то есть приготовленной аналогично варианту А.

Полученные таким образом биосенсоры оставлялись на ночь в закрытой чашке Петри при +4 °С. На следующий день биосенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

Биосенсоры, хранящиеся в холодильнике, сохраняют каталитическую активность фермента в течение месяца с погрешностью не более 5–6%.

2. Результаты и их обсуждение

Известно, что ХЭ катализирует гидролиз тиохолиновых эфиров. Один из ее специфичных субстратов (БТХХ) подвергается гидролизу по следующему уравнению [22]:



Продукт реакции тиол электрохимически активен. На печатном платиносо-держателем электроде тиол подвергается окислению:

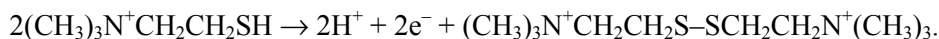


Табл. 1

Аналитические возможности амперометрических холинэстеразных биосенсоров в определении микотоксинов ($n = 5$, $P = 0.95$)

Объект анализа	Интервал рабочих концентраций (моль/л)	Уравнение градуировочного графика $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C), r$			c_n , моль/л
		$A \pm \delta$	$(B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$	r	
Холинэстеразный биосенсор					
АФВ1	$1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-8}$	-30 ± 3	6.8 ± 0.4	0.9979	$1 \cdot 10^{-8}$
ОТА	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-8}$	154 ± 5	-17.9 ± 0.8	0.9973	$1 \cdot 10^{-8}$
ЗЕА	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-10}$	24 ± 4	-6.6 ± 0.5	0.9875	$7 \cdot 10^{-10}$
Холинэстеразный биосенсор, модифицированный МУНТ					
ОТА	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-10}$	29.1 ± 1.6	-2.7 ± 0.2	0.9874	$7 \cdot 10^{-11}$
ЗЕА	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-11}$	26.9 ± 0.5	-2.05 ± 0.06	0.9973	$8 \cdot 10^{-12}$

Наибольшее значение тока наблюдается при потенциале +0.55 В и рН 7.6. Ток окисления, регистрируемый в потенциостатическом режиме, достигает постоянного значения через 10 мин. Величину этого стабилизировавшегося отклика биосенсора использовали в качестве аналитического сигнала.

2.1. Оценка аналитических возможностей холинэстеразных биосенсоров в определении микотоксинов. Изучение действия АФВ1, ОТА и ЗЕА на иммобилизованную ХЭ, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора, показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение величины тока окисления продукта ферментативного гидролиза БТХХ по сравнению с контрольными опытами, проведенными в отсутствие в растворе микотоксинов. Таким образом, все перечисленные микотоксины оказывают ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ в составе биосенсора.

При модификации поверхности рабочего электрода варьировали количество раствора МУНТ (то есть количество УНТ на единицу поверхности электрода от 1 до 0.2 мкл), наносимого на поверхность печатного электрода. Было установлено, что 0.5 мкл раствора позволяет получить более воспроизводимую однородную поверхность, обеспечивающую получение достаточного по величине аналитического сигнала, поэтому в дальнейшем использовали именно такое количество раствора МУНТ.

В общем случае линейная зависимость между величиной тока при потенциале 0.55 В и концентрацией микотоксинов наблюдается в достаточно широком интервале концентраций: $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-11}$ моль/л. Следует отметить, что ингибирующее действие ОТА и ЗЕА обнаружено впервые.

Аналитические характеристики предлагаемых биосенсоров приведены в табл. 1.

Полученные результаты показывают, что использование углеродных нанотрубок в качестве модификатора позволяет расширить диапазон определяемых концентраций и снизить нижнюю границу определяемых содержаний.

В то же время определение АФВ1 с помощью предлагаемого холинэстеразного биосенсора возможно в гораздо более широкой области концентраций и с более низким значением нижней границы определяемых концентраций c_n на уровне $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л по сравнению с литературными данными [18].

Степень (процент) ингибирования при действии на фермент – субстратную систему БТХХ – ХЭ (процент ингибирования равен $[(I_0 - I_p)/I_0] \cdot 100$, где I_0 , I_p – значения тока в отсутствие и в присутствии ингибитора) микотоксинов изменяется для ОТА от $(89 \pm 1)\%$ до $(60.0 \pm 0.8)\%$, для АФВ1 – от $(72 \pm 1)\%$ до $(50.0 \pm 0.6)\%$, а для ЗЕА – от $(72 \pm 1)\%$ до $(50.0 \pm 0.6)\%$ в рассматриваемой области концентраций.

Изучение действия зеараленона и охратоксина А на холинэстеразный биосенсор, модифицированный МУНТ, показало, что в присутствии этих микотоксинов также наблюдается уменьшение величины аналитического сигнала, то есть зеараленон и охратоксин А оказывают ингибирующее действие. Причем ингибирующий эффект проявляется в более низкой области концентраций на уровне $n \cdot 10^{-10(-11)}$ моль/л. Степень ингибирования при действии на фермент – субстратную систему БТХХ – ХЭ микотоксинов для этого типа биосенсора для ОТА составляет от $(96.0 \pm 1.2)\%$ до $(64.0 \pm 0.8)\%$, для ЗЕА – от $(91.0 \pm 1.0)\%$ до $(72.0 \pm 0.6)\%$ в изученной области концентраций, т.е. ингибирующее действие микотоксинов в этом случае выражено сильнее. По-видимому, более развитая поверхность электрода в результате модификации МУНТ обеспечивает участие в электрохимическом процессе большего числа молекул субстрата, с одной стороны, и лучшему закреплению большего количества фермента на поверхности электрода, с другой.

Эффект ингибирования, вероятно, связан с взаимодействием молекул АФВ1, ЗЕА и ОТА с гидрофобными участками, расположенными вблизи активного центра фермента, но уже в периферийной части молекулы фермента. Как следствие, это препятствует проходу субстрата внутрь в активную часть щели, создавая стерические препятствия для подхода его молекул к каталитическим сайтам фермента. Это приводит к уменьшению процессов взаимодействия бутирилтиохолина с активными участками ХЭ. На обратимый характер ингибирования микотоксинами указывает постоянная величина аналитического сигнала (тока при потенциале 0.55 В), которая устанавливается уже через 10 мин после начала ферментативной реакции, что совпадает с литературными данными [19, 23].

Правильность определения микотоксинов в области линейной зависимости аналитического сигнала от их концентрации с помощью холинэстеразных биосенсоров оценена способом «введено-найдено» (табл. 2).

2.2. Определение микотоксинов в пищевых продуктах. Полученные результаты показывают, что предлагаемые холинэстеразные биосенсоры могут быть использованы для определения содержания микотоксинов в пищевых продуктах.

Из литературы известно, что афлатоксины и ОТА особенно широко распространены в пищевых продуктах, произведенных в тропиках и субтропиках. Наиболее часто в этом плане упоминаются различные съедобные орехи, в том числе арахис. Высокие концентрации афлатоксинов обнаружены и в продуктах переработки арахиса. Поэтому была сделана попытка определить именно данный токсин в ядрах арахиса [24, 25]. Результаты последующих исследований показали, что ОТА обнаруживается в продукции из зерновых культур, и в первую очередь в кукурузной, гречневой и ячменной крупах.

Табл. 2

Результаты определения микотоксинов с помощью амперометрических холинэстеразных биосенсоров ($n = 5$, $P = 0.95$)

Исследуемый микотоксин	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Холинэстеразный биосенсор			
АФВ1	$5 \cdot 10^{-6}$	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$	0.038
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.042
	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.6 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$	0.057
ОТА	$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$	0.038
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.042
	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$	0.107
ЗЕА	$5 \cdot 10^{-6}$	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$	0.038
	$8 \cdot 10^{-7}$	$(7.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	0.039
	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.6 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$	0.057
Холинэстеразный биосенсор, модифицированный УНТ			
ОТА	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$	0.039
	$5 \cdot 10^{-9}$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$	0.041
	$5 \cdot 10^{-10}$	$(5.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$	0.053
ЗЕА	$5 \cdot 10^{-6}$	$(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$	0.038
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.038
	$7 \cdot 10^{-8}$	$(6.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$	0.044

Методика определения содержания микотоксинов в образцах зерновых культур. Навеску гречневой крупы и арахиса (1 г) растирали в порошок, который суспензировали в смеси этанола и воды (4 : 1) для определения ОТА или смеси ацетонитрила и воды (6 : 4) для определения АФВ1. Согласно литературным данным [26], в этом случае достигается достаточно полное извлечение определяемых компонентов в результате однократной экстракции. После центрифугирования в течение 10 мин при скорости 10 тыс. об./мин, надосадочную жидкость использовали для приготовления рабочих водных растворов путем последовательного разбавления. Далее эти растворы использовали для определения ОТА, АФВ1 с помощью как модифицированного, так и немодифицированного холинэстеразных биосенсоров.

В ячейку на 200 мкл вносили 20 мкл субстрата БТХХ с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, 160 мкл рабочего буферного раствора, 20 мкл раствора образца и холинэстеразный биосенсор. Измеряли значение тока при потенциале +0.55 В. Содержание ОТА, АФВ1 в образцах определяли по соответствующему градуировочному графику (табл. 1). Предварительными опытами было установлено, что раствор, оставшийся после экстрагирования микотоксинов, не вызывал изменения аналитического сигнала, то есть уже не содержал компонентов, оказывающих ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ.

Результаты определения содержания ОТА и АФВ1 в ядрах арахиса в отдельных образцах и ОТА в образцах гречневой крупы представлены в табл. 3.

Полученные результаты показывают, что амперометрические холинэстеразные биосенсоры позволяют оценивать содержание микотоксинов в пищевых продуктах на уровне и ниже ПДК (в частности, ПДК АФВ1 и ОТА для России 0.005 мг/кг [27]).

Табл. 3

Определение микотоксинов в ядрах арахиса и образцах гречневой крупы с помощью холинэстеразных биосенсоров ($n = 5, P = 0.95$)

Объект анализа	Образцы	Содержание микотоксина, моль/л (мг/кг)	S_r
Холинэстеразный биосенсор			
ОТА	Гречневая крупа «Золотой казан», г. Казань	$(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-7}$ (0.929)	0.043
	Гречневая крупа «Мистраль», г. Москва	Не обнаружено*	–
АФВ1	Ядра арахиса	$(1.24 \pm 0.5) \cdot 10^{-6}$ (1.934)	0.043
Холинэстеразный биосенсор модифицированный УНТ			
ОТА	Ядра арахиса	$(3.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-9}$ (0.014)	0.114

* Содержание меньше s_n .

Заключение

Полученные результаты показывают, что биосенсор (ферментный сенсор) на основе иммобилизованной ХЭ с модифицированной МУНТ и немодифицированной поверхностями позволяет определять некоторые микотоксины на уровне $1 \cdot 10^{-5(-6)} - 1 \cdot 10^{-10(-11)}$ моль/л, что обеспечивает их эффективность в контроле качества пищевых продуктов. Модифицированный МУНТ холинэстеразный биосенсор позволяет сместить интервал определяемых концентраций ОТА и ЗЕА в сторону более низких концентраций, измерить более сильно выраженный эффект ингибирования и повысить коэффициент корреляции.

За счет специфического взаимодействия между иммобилизованным ферментом и микотоксинами, а также концентрирования продуктов ферментативного гидролиза тиосубстрата биочувствительной частью биосенсоров возможно их определение до концентраций $n \cdot 10^{-8(-11)}$ моль/л практически без специальных операций по пробоподготовке. Такие аналитические возможности позволяют определять микотоксины, в частности АФВ1 и ОТА, на уровне ПДК и ниже.

Для увеличения селективности определений необходимо привлечение других методов, в частности иммунохимических. Причем в этом случае появляется возможность варьирования селективности определений, используя антитела против микотоксинов с групповой или индивидуальной специфичностью [23, 28]. В то же время высокая чувствительность определения с помощью предлагаемых холинэстеразных биосенсоров позволяет с успехом использовать такие аналитические устройства на заключительной стадии анализа в качестве детектирующих устройств. Результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы, послужат основой для подобных дальнейших исследований.

Summary

E.P. Medyantseva, H. Mai Thi Thanh, R.M. Varlamova, E.Yu. Tarasova, G.R. Sakhapova, H.C. Budnikov. Amperometric Cholinesterase Biosensors for Determination of Some Mycotoxins.

Amperometric biosensors based on platinum printed electrodes and immobilized cholinesterase have been used for determination of some mycotoxins (ochratoxin A, zearalenone,

aflatoxin B1) in the working concentration range of $1 \cdot 10^{-5(-6)} - 1 \cdot 10^{-10(-11)}$ mol/l. A cholinesterase biosensor modified with carbon nanotubes allows for shifting of the mycotoxin concentration interval toward lower concentrations and for an observation of a more pronounced effect of inhibition. The possibility of detection of mycotoxins in peanut and buckwheat at and lower than the level of maximum permissible concentration is shown.

Key words: mycotoxins, amperometric biosensor, cholinesterase, aflatoxin B1, ochratoxin A, zearalenone, food products.

Литература

1. Горячева И.Ю., Русанова Т.Ю., Бурмистрова Н.А., Де Саегер С. Иммунохимические методы определения микотоксинов // Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64, № 8. – С. 788–806.
2. Комаров А.А., Осокин Д.М. Новый метод количественного определения афлатоксина В1 в кормах для мелких домашних животных // 7-я Междунар. конф. по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных: Тез. докл. (М., 3–5 марта 1999 г.). – URL: http://vets.al.ru/doc/vet/vet_doc/3-99/3-99026.html, свободный.
3. Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review // Anal. Chim. Acta. – 2009. – V. 632, No 2. – P. 168–180.
4. Demyttenaere J.C.R., Morina R.M., Sandra P. Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites // J. Chromatogr. A. – 2003. – V. 985, No 1. – P. 127–135.
5. Presicce D.S., Forleo A., Taurino A.M., Zuppa M., Siciliano P., Laddomada B., Logrieco A., Visconti A. Response evaluation of an E-nose towards contaminated wheat by *Fusarium poae* fungi // Sens. Actuat. B: Chem. – 2006. – V. 118, No 1–2. – P. 433–438.
6. Rios A., Andres F.D., Zougagh M., Castaneda G. Determination of zearalenone and its metabolites in urine samples by liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon nanotube-modified electrode // J. Chromatogr. A. – 2008. – V. 1212, No 1–2. – P. 54–60.
7. Zhang C., Zhang Y., Wang S. Development of Multianalyte Flow-through and Lateral-Flow Assays Using Gold Particles and Horseradish Peroxidase as Tracers for the Rapid Determination of Carbaryl and Endosulfan in Agricultural Products // J. Agric. Food Chem. – 2006. – V. 54, No 7. – P. 2502–2507.
8. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review) // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – V. 46, No 3. – P. 253–266.
9. Abouzied M.M., Azcona J.I., Braselton W.E., Pestka J.J. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – V. 57, No 3. – P. 672–677.
10. Vidal J.C., Bonel L., Duato P., Castillo J.R. An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer // Biosens. Bioelectron. – 2011. – V. 26, No 7. – P. 3254–3259.
11. Carlson M.A., Barger C.B., Benson R.C., Fraser A.B., Phillips T.E., Velky J.T., Groopman J.D., Strickland P.T., Ko H.W. An automated, handheld biosensor for aflatoxin // Biosens. Bioelectron. – 2000. – V. 14, No 10–11. – P. 841–848.
12. Välimaa A.L., Kivistö T., Piia I., Matti T. A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk // J. Microbiolog. Methods. – 2010. – V. 80, No 1. – P. 44–48.
13. Van Der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., Van Osenbruggen T., Koopal K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis // Food Control. – 2003. – V. 14, No 4. – P. 251–254.

14. *Abd-Elgawad R., Munoz-Berbel X., Cortina-Puig M., Jean-Louis M.* An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode // *Electrochim. Acta.* – 2009. – V. 54, No 8. – P. 2180–2184.
15. *Maragos C.M.* Biosensors for mycotoxin analysis: recent developments and future prospects // *World Mycotoxin J.* – 2009. – V. 2, No 2. – P. 221–238.
16. *Liu D.L., Li S.C., Chen J.H., Cao H., Yao D.S.* Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes // *Food Control.* – 2011. – V. 22, No 1. – P. 43–49.
17. *Cometa M.F., Lorenzini P., Fortuna S., Volpe M.T., Meneguz A., Palmery M.* In vitro inhibitory effect of aflatoxin B1 on acetylcholinesterase activity in mouse brain // *Toxicology.* – 2005. – V. 206, No 1. – P. 125–135.
18. *Pohanka M., Kuca K., Jun D.* Aflatoxin assay using an amperometric sensor strip and acetylcholinesterase as recognition element // *Sens. Lett.* – 2008. – V. 6, No 3. – P. 450–453.
19. *Ильичева Н.Ю., Бейлинсон Р.М., Медянцева Э.П., Будников Г.К., Ванягина О.Н.* Холинэстеразные биосенсоры для определения гербицида пропанила // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2002. – Т. 43, № 6. – С. 409–412.
20. *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.
21. *Yao D.S., Cao H., Wen S., Liu D.L., Bai Y., Zheng W.J.* A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin-detoxifying enzyme (ADTZ) // *Bioelectrochemistry.* – 2006. – V. 68, No 2. – P. 126–133.
22. *Медянцева Э.П., Будников Г.К., Бабкина С.С.* Ферментный электрод на основе иммобилизованной холинэстеразы для определения потенциальных загрязнителей окружающей среды // *Журн. аналит. химии.* – 1990. – Т. 45, № 7. – С. 1386–1389.
23. *Медянцева Э.П., Кутырева М.П., Фахреева Э.Р., Ильичева Н.Ю., Еремин С.А., Будников Г.К.* Иммунохимический анализ гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора // *Агрохимия.* – 2000. – № 3. – С. 72–80.
24. *Prieto-Simon B., Noguer T., Campas M.* Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade // *Trends Anal. Chem.* – 2007. – V. 26, No 7. – P. 689–702.
25. *Тутельян В.А., Кравченко Л.В.* Микотоксины. – М.: Медицина, 1985. – 321 с.
26. *Стародуб Н.Ф., Пилипенко Л.Н., Егорова А.В., Пилипенко И.В., Гойстер О.С., Хмельницкий Г.А.* Анализ микотоксинов: подготовка проб // *Биотехнология.* – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 106–115.
27. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – URL: http://www.naturprof.ru/normativnye_dokumenty/sanitarnye_pravila_i_normy/sanpin_2321078-01/, свободный.
28. *Медянцева Э.П., Варламова Р.М., Биккенина Д.Р., Будников Г.К.* Возможности группового и индивидуального иммуноэкстракционного определения триазиновых гербицидов с амперометрическим детектированием // *Аналит. и контроль.* – 2006. – Т. 10, № 2. – С. 159–167.

Поступила в редакцию
10.01.12

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Май Тхи Тхань Хуен – аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *maihuyen_dhv@yahoo.com.vn*

Варламова Регина Марковна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Regina.Varlamova@ksu.ru*

Тарасова Екатерина Юрьевна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Сахапова Гулина Ришатовна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*