

УДК 543.866

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТУЛИНА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ ТИРОЗИНАЗНЫМИ БИОСЕНСОРАМИ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ И НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА

*Р.М. Варламова, Э.П. Медянцева, Р.Р. Хамидуллина, Г.К. Будников
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

Аннотация

Разработаны новые амперометрические биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками, наночастицами золота и иммобилизованного фермента – тирозиназы для определения микотоксина патулина в области концентраций $1 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-12}$ моль/л с погрешностью не более 0.063. Подобраны наилучшие условия для получения наночастиц золота в растворах. Найдены условия иммобилизации многостенных углеродных нанотрубок и наночастиц золота на поверхность планарных электродов. Выявлены условия функционирования предлагаемых биосенсоров. Полученные результаты использовали для контроля содержания патулина в пищевых продуктах на уровне и ниже ПДК.

Ключевые слова: микотоксины, амперометрический биосенсор, тирозиназа, патулин, углеродные нанотрубки, наночастицы золота, пищевые продукты

Введение

В настоящее время микотоксины (продукты жизнедеятельности микроскопических плесневых грибов) составляют одну из наиболее опасных групп токсичных соединений, представляющих угрозу здоровью населения. Многие из них обладают мутагенными (в том числе канцерогенными) свойствами. Микотоксины содержатся во многих пищевых продуктах и кормах, где их содержание может достигать сотен мкг/кг. Для основных микотоксинов в ряде стран установлены ПДК [1]

Патулин – микотоксин, вырабатываемый различными плесневыми грибами из родов *Penicillium* и *Aspergillus* и обладающий выраженными токсическими и мутагенными свойствами. В высоких концентрациях патулин обнаруживается в продуктах переработки фруктов и овощей.

Установлено, что патулин обладает свойствами антибиотика широкого спектра действия, и его действие проверено на эффективность при простудных заболеваниях. Однако патулин никогда в этом плане не использовался на практике в медицинских целях по причине его раздражающего действия на желудок и способности вызывать тошноту и рвоту [2].

В последнее время достаточно активно разрабатываются различные биохимические, в том числе иммунохимические, методы [3–7] определения микотоксинов.

Такие методы анализа являются удобным инструментом для первичного скрининга больших партий продукции благодаря своей простоте, экспрессности и относительно невысокой стоимости. Среди них следует отметить работы по использованию различных биосенсоров [8–11] для решения данной аналитической задачи. Однако примеры работ по применению биосенсоров для определения микотоксинов пока немногочисленны.

В настоящее время идет активный поиск путей повышения чувствительности определений микотоксинов, упрощения процедуры и сокращения времени анализа, снижения матричного эффекта анализируемых объектов.

Разработка новых аналитических устройств на основе биосенсоров, позволяющих с высокой чувствительностью и избирательностью определять микотоксины, обладающие определенной универсальностью действия, представляет интерес для пищевой промышленности, сельскохозяйственной деятельности, охраны здоровья населения.

Современный подход к совершенствованию и разработке новых амперометрических биосенсоров связан с различными способами модификации поверхности первичных преобразователей с целью придания им заданных свойств.

В качестве модификаторов используют различные наноматериалы. В частности, углеродные нанотрубки (УНТ), в том числе и многостенные УНТ (МУНТ), благодаря своим уникальным электронным и оптоэлектронным свойствам весьма перспективны для использования в качестве основы для создания миниатюрных биосенсорных устройств. Применение наночастицы золота (НЧ Au) обуславливает новые физические и электрохимические свойства [12]. Использование УНТ и наночастиц дает возможность создать необходимую плотность заряда, что позволяет напрямую влиять на чувствительность сенсора и поддерживать его высокую электроактивность, что открывает новые возможности в плане разработки биосенсоров, предназначенных для определения различных микотоксинов [13].

Разработка новых амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованного фермента – тирозиназы – и планарных электродов, модифицированных МУНТ и НЧ Au для определения микотоксина патулина, оценка их аналитических возможностей, сопоставление результатов анализа, полученных на модифицированных углеродными нанотрубками и наночастицами золота и немодифицированных сенсорах, а также использование полученных результатов для контроля содержания патулина в пищевых продуктах являются целью настоящей работы.

1. Экспериментальная часть

1.1. Аппаратура. Основой тирозиназного биосенсора служила одноканальная система, состоящая из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения (фирма BVT Technologies, г. Брно, Чехия). Материалом поверхности рабочего электрода, на который иммобилизуется фермент, является платиносодержащая паста. В роли вспомогательного электрода выступал платиновый электрод, в роли электрода сравнения – электрод 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.

Для приготовления суспензии УНТ использовали ультразвуковую ванну (WiseClean модель WUC-A03H, DAIHAN Scientific Co.Ltd, Корея) с частотой ультразвука 40 КГц.

1.2. Реактивы. В качестве субстрата использовали фенол марки «х.ч.», растворы которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более 3 ч. Применяли тирозиназу из ткани грибов (шампиньонов).

Применяли 1%-ный раствор глутарового альдегида (ГА) фирмы ICN и бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы Reanal (Венгрия).

Для получения наночастиц золота использовали цитрат натрия («х.ч.»), HCl («х.ч.»), $\text{HAuCl}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ («х.ч.»), SnCl_2 («ч.»), полиэтиленгликоль (PEG-3000) (Sigma)

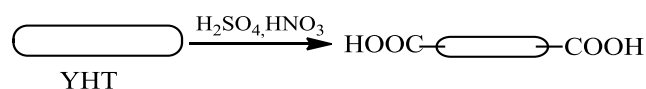
В работе использовали УНТ с геометрическими параметрами: длина 0.1–10 мкм, внутренний диаметр 2–6 нм, внешний диаметр 10–15 нм, производство Sigma-Aldrich.

Использовали хроматографически чистый препарат микотоксина – патулина (раствор патулина в бензоле) из государственного стандартного образца (изготовитель: ГНУ ВНИИВСГЭ, г. Москва).

Для получения рабочих растворов из стандартного образца патулина проводили вакуумную отгонку органического растворителя (бензола) при комнатной температуре. Полученный препарат патулина использовали для приготовления рабочих растворов путем их растворения в бидистиллированной воде. Применяли фосфатный (рН 7.0 ± 0.05). Значения рН водных растворов определяли рН-метром рН-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

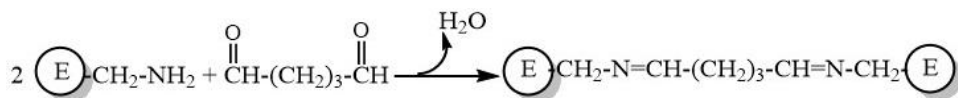
1.3. Получение гомогената из грибов. В качестве источников тирозиназы использовали гомогенат из грибов (шампиньоны – *Agaricus bisporus*). Для этого навеску растительного материала нарезали, измельчали и растирали в вымороженной ступке до пастообразной текстуры. Затем добавляли фосфатный буферный раствор с рН 7.0 и получившуюся смесь перемешивали на магнитной мешалке. После этого смесь отфильтровывали через двойной марлевый слой и использовали как непосредственный источник тирозиназы [14].

1.4. Подготовка УНТ для модификации электродов. Для подготовки УНТ к использованию в качестве модификатора электродной поверхности, для очистки их от остаточных количеств оксидов переходных металлов, а также от аморфного углерода была проведена обработка их растворами кислот с последующей обработкой ультразвуком, используя ультразвуковую ванну. В общем плане схему процесса можно представить в следующем виде:



Для этого навеску МУНТ помещали в эпиндорфик, добавляли раствор смеси азотной и серной кислот в объемном соотношении 1 : 3. Эпиндорфик помещали в ультразвуковую ванну, предварительно герметизировав его тефлоновой нитью. Обработывали УНТ в течение 2–4 ч при температуре 30–50 °С. Затем отделяли УНТ от маточного раствора с помощью центрифуги и многократно (5–6 раз) обрабатывали водой до нейтральной реакции с последующим промыванием этанолом. Контроль рН среды проводили с помощью универсальной индикаторной тест-полоски [15].

1.5. Изготовление амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной тирозиназы. Для иммобилизации фермента на поверхности электродов нами использована методика кросс-сшивки. Принцип действия основан на образовании нерастворимых продуктов с большим размером за счет реакции разных молекул фермента с двумя карбонильными группами глутарового альдегида. Кросс-сшивка ферментного слоя глутаровым альдегидом повышает стабильность биочувствительной части. Для стабилизации ферментов использовали бычий сывороточный альбумин (матричный материал).



При получении биочувствительной части ферментных сенсоров использовали разный порядок нанесения реагентов на рабочую поверхность электродов:

1) наносили готовую смесь фермента – тирозиназы, БСА и ГА, который добавляли в последнюю очередь;

2) наносили сначала ГА, затем фермент тирозиназу в буферном растворе.

Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при $t = 4$ °С. На следующий день биосенсоры промывали водой, оставляли для высушивания на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

1.6. Получение биочувствительной части амперометрического тирозиназного биосенсора на основе печатного платинового электрода, модифицированного МУНТ и МУНТ/НЧ Au. Для получения биочувствительной части биосенсора на поверхность рабочего электрода наносили гомогенат, полученный из грибов как источника тирозиназы. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента, раствор БСА (50 мг/мл), фосфатный буферный раствор (50 мМ, рН 7.5), дистиллированную воду и 1%-ного раствора глутарового альдегида. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь, и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при температуре 4 °С. На следующий день биосенсоры промывали водой, оставляли для высушивания на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике при 4 °С.

По полученным нами спектрофотометрическим данным каталитическая активность тирозиназы составила (165 ± 10) U/ml.

1.7. Расчет кинетических параметров реакций ферментативных превращений. Для определения кинетических параметров реакции ферментативного процесса в присутствии или в отсутствие микотоксинов проводили интегральный анализ полной кинетической кривой зависимости тока от времени.

Зависимость тока от времени находили экспериментально и по полученным данным строили кинетическую кривую, из которой находили характеристические параметры ферментативной реакции: K_m^0 – кажущаяся константа Михаэлиса, V_{\max} – максимальная скорость реакции, которые использовали для оценки типа ингибирования ферментативной реакции [16].

Согласно литературным данным [17], расчет константы ингибирования (K_i) происходит в зависимости от типа ингибирования. Поскольку в исследуемых нами условиях наблюдалось двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное) ингибирование, расчет константы ингибирования проводили по следующей формуле:

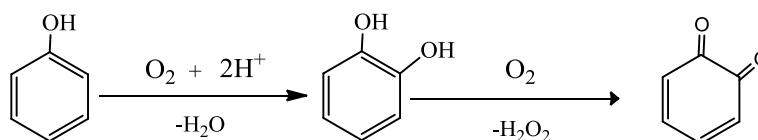
$$K_i = \frac{C_i}{\left(\frac{K_m^0 \cdot V_{\max}^0}{K'_m \cdot V'_{\max}} - 1 \right)},$$

где K_m^0 и K'_m – константа Михаэлиса в отсутствие эффектора и в присутствии определенной концентрации эффектора соответственно; V_{\max}^0 и V'_{\max} – максимальная скорость реакции в отсутствие эффектора и в присутствии определенной концентрации эффектора соответственно.

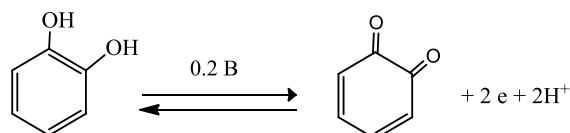
2. Результаты и их обсуждение

2.1. Природа формирования аналитического сигнала тирозиназного биосенсора. Из литературных данных известно, что под действием тирозиназы фенол подвергается биокаталитическому гидролизу с образованием хинона по следующей схеме.

Ферментативная реакция [18]:



Электрохимическая реакция:



Пики при потенциалах 0.2 В относятся, вероятнее всего, к электрохимическому окислению фенола до соответствующего хинона (рис. 1). Поскольку разность потенциалов в пиках составляет около 300 мВ, что значительно больше, чем для обратимых процессов, хотя высота катодного и анодного пиков практически одинакова, наблюдаемый процесс электроокисления можно отнести к квазиобратимым электрохимическим реакциям [19].

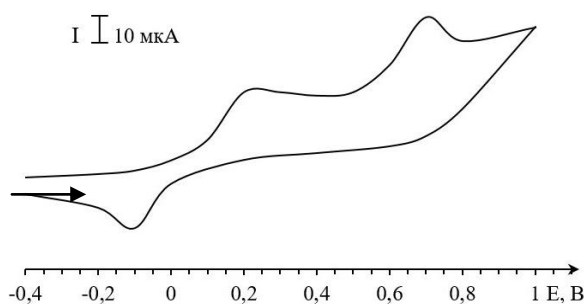
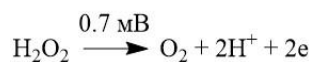


Рис. 1. Циклическая вольтамперограмма продуктов реакции ферментативного превращения субстрата тирозиназы – фенола – в присутствии тирозиназного биосенсора. Концентрация фенола $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с рН 7.0

Еще одним продуктом, образующимся на второй стадии ферментативной реакции, является пероксид водорода. Дополнительный пик, который наблюдается на тирозиназном биосенсоре в области потенциалов 0.65–0.70 В, можно отнести к процессу окисления пероксида водорода (рис. 1). Согласно литературным данным электрохимическое окисление пероксида водорода протекает по схеме [20]:



Наибольший каталитический эффект для этого фермента наблюдается в среде фосфатного буферного раствора с рН 7.0 ± 0.05 [21], поэтому этот фоновый электролит использовали для проведения измерений с использованием тирозиназного биосенсора. Используемая концентрация субстрата тирозиназы – фенола – составляет $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

2.2. Изучение действия патулина на каталитическую активность иммобилизованной тирозиназы. Изучение действия патулина на иммобилизованную тирозиназу, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора на основе печатных электродов, показало, что в его присутствии наблюдается уменьшение величины аналитического сигнала в области концентраций от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л (рис. 2).

Максимальная степень (процент) ингибирования при действии патулина на фермент-субстратную систему фенол – тирозиназа составляет $(70.0 \pm 1.0)\%$ в изученной области концентраций.

Эффект ингибирования, возможно, связан с взаимодействием молекул патулина с гидрофобными участками, расположенными вблизи активного центра фермента, но уже в периферийной части молекулы фермента. Как следствие, это препятствует входу субстрата внутрь в активную часть щели, создавая стерические препятствия для подхода его молекул к каталитическим сайтам фермента. Это приводит к уменьшению процессов взаимодействия фенола с активными участками тирозиназы. Через 10 мин инкубации тирозиназного биосенсора в растворе, в котором присутствует патулин, величина тока практически не меняется, что указывает на обратимый характер ингибирования. Градуировочная зависимость между током и концентрацией патулина для тирозиназного биосенсора и значения c_n приведены в табл. 1.

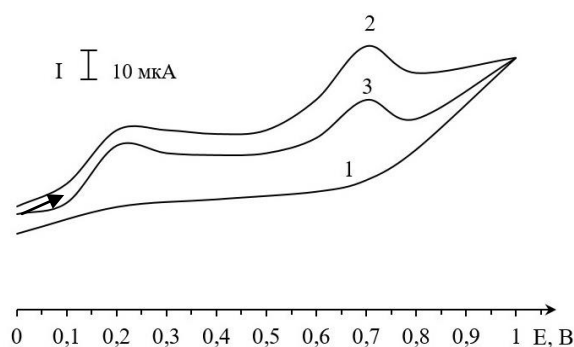


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления фенола и пероксида водорода на тирозиназном биосенсоре в отсутствие (2) и в присутствии (1) патулина, $c_n = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л (3), фосфатный буферный раствор с pH 7.0

Табл. 1

Аналитические характеристики определения патулина с помощью тирозиназного биосенсора ($n = 5$, $P = 0.95$)

Область рабочих концентраций моль/л	Уравнение градуировочной зависимости*			c_n , моль/л
	$I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$			
	$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	r	
Тирозиназный биосенсор				
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-10}$	95 ± 1	-3.4 ± 0.3	0.9870	$8 \cdot 10^{-11}$
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ в хитозане				
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-11}$	73 ± 3	-5.8 ± 0.4	0.9901	$8 \cdot 10^{-12}$
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ и НЧ Au в хитозане				
$1 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-12}$	99.6 ± 2.9	-4.3 ± 0.4	0.9932	$3 \cdot 10^{-12}$

* $I = I_p/I_o \cdot 100$, $I_p = I_o - I_s$, где I_s – ток в присутствии ингибитора, I_o – ток в отсутствие ингибитора.

Табл. 2

Результаты определения патулина с помощью тирозиназного биосенсора ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r	Процент открытия, %
Тирозиназный биосенсор			
$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$	0.020	92–108
$3 \cdot 10^{-9}$	$(2.8 \pm 0.1) \cdot 10^{-9}$	0.036	96–103
$7 \cdot 10^{-10}$	$(6.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$	0.045	97–103
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ в хитозане			
$4 \cdot 10^{-8}$	$(3.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$	0.025	94–106
$5 \cdot 10^{-9}$	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$	0.038	97–103
$7 \cdot 10^{-10}$	$(7.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$	0.041	97–103
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ и НЧ Au в хитозане			
$8 \cdot 10^{-8}$	$(8.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$	0.037	94–106
$5 \cdot 10^{-9}$	$(5.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$	0.039	97–103
$3 \cdot 10^{-10}$	$(3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-10}$	0.063	98–102

Правильность определения патулина в указанных диапазонах концентраций биосенсором на основе иммобилизованной тирозиназы оценена способом «введено – найдено» (табл. 2).

2.3. Влияние наноструктурированных материалов на аналитические характеристики разрабатываемых биосенсоров.

2.3.1. Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ, для определения патулина. Подготовленные для применения в качестве модификатора поверхности электродов МУНТ (способ описан в разд. 1.4.) высушивали при 60 °С до постоянной массы. После этого к навеске УНТ (1 мг) добавляли 1 мл хитозана 0.5 мас. %, растворенного в уксусной кислоте (0.05 М, рН 4.2), смесь солибилизировали с помощью ультразвука при комнатной температуре до получения гомогенного раствора. Однородность используемых для модификации поверхности электрода растворов УНТ поддерживали периодической (не менее раза в месяц) обработкой ультразвуком.

Конечная концентрация УНТ составляла 1 мг/мл.

Полученные УНТ наносили на поверхность электродов, используя прием капельного испарения.

Изучение действия патулина на тирозиназу, иммобилизованную на модифицированные МУНТ в хитозане электроды, показало, что характер действия этого соединения существенно не изменился: он по-прежнему оказывает обратимое ингибирующее действие на тирозиназу.

Биосенсор на основе электродов, модифицированных МУНТ в хитозане, позволяет расширить диапазон определяемых концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-11}$ моль/л, снизить c_n для патулина до $8 \cdot 10^{-12}$ моль/л (см. табл. 1), улучшить коэффициент корреляции. Максимальная степень ингибирования при действии на фермент-субстратную систему фенол – тирозиназа в этих условиях увеличилась и составила для патулина $(78.0 \pm 0.9)\%$ в изученной области концентраций.

Правильность определения патулина в указанных диапазонах концентраций с помощью тирозиназных биосенсоров оценена способом «введено – найдено» (табл. 3).

2.3.2. Наночастицы золота как модификаторы поверхности планарных электродов.

2.3.2.1. Получение наночастиц золота. Одним из современных приемов изменения свойств биосенсоров и их аналитических характеристик является модификация поверхности электродов, служащих основой биосенсоров, УНТ и нанокомпозитами на их основе, например МУНТ/НЧ металлов (МУНТ/НЧ Au). На сегодняшний день известно достаточно много способов получения НЧ Au. Мы остановились на одном из них [21], поскольку этот способ достаточно прост и позволяет проводить синтез наночастиц золота из доступных реагентов и не занимает много времени, его можно проводить в мягких условиях. Синтез наночастиц золота осуществляли восстановлением золотохлористоводородной кислоты хлоридом олова(II). Применение хлорида олова как в щелочной, так и сильноокислой средах ограничивается образованием α -оловяной кислоты, что вызывает коагуляцию и оседание частиц из-за образования $m\text{SnO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [21, 22]:

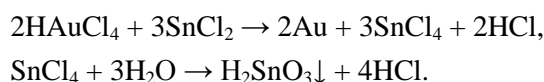


Табл. 3

Условия получения наночастиц золота

Компоненты		HAuCl ₄ × 4 H ₂ O, мг/л	SnCl ₂ , мг/л	Цитратный буферный раствор, рН	PEG, мг/л	Хи- тозан	Цвет полученного раствора
Количе- ство веще- ства	11	25	950	4.3 ± 0.1	10	0.5	розовый
	22	1·10 ⁴	9500	4.3 ± 0.1	10	0.75	бордовый

Синтез наночастиц осуществляли при рН 4.3 ± 0.1, применение анионогенных и неанионогенных ПАВ повышает устойчивость коллоидных частиц при добавлении их на стадии синтеза. Эффективность стабилизации системы, включающей цитратный буферный раствор (рН 4.3), золотохлористоводородную кислоту и хлорид олова(II), зависит от гидрофильности и заряда добавляемого ПАВ, способности адсорбироваться на поверхности золота и степени заполнения этой поверхности.

Синтез наносфер золота в присутствии водных растворов полиэтиленгликоля (PEG) способствует повышению устойчивости монодисперсного коллоидного золота, препятствуя их слипанию в более крупные агрегаты [23]. Восстановление золотохлористоводородной кислоты протекает через ряд основных стадий: получение высокопересыщенного раствора золота, нуклеации и формирования двойного электрического слоя на поверхности мицеллы. Показано, что, используя хлорид олова, PEG и изменяя их концентрацию и рН среды, можно синтезировать НЧ Au со средним диаметром 5, 30, 50, 80 нм.

Для получения НЧ Au в эпиндорфик наливали растворы HAuCl₄, SnCl₂, полиэтиленгликоля в цитратном буфере в различных соотношениях концентраций: 1 : 4 : 0.04 и 1 : 1 : 0.001. В качестве стабилизатора наночастиц золота использовали хитозан. Для получения суспензии наночастиц золота использовали ультразвук с частотой 37 КГц. Диспергировали наночастицы золота в течение 1 ч до получения гомогенного раствора. Такой нанокompозит с НЧ Au наносили на поверхность платинового планарного электрода, модифицированного МУНТ, сушили в течение суток.

Наилучшие условия получения НЧ Au представлены в табл. 3. Для доказательства присутствия в растворах конкретной формы НЧ Au были использованы данные спектрофотометрии.

Показано, что в оптических спектрах растворов наночастиц (рис. 3) наблюдаются плазмонные полосы поглощения с максимумами, характерными для поглощения сферических НЧ Au в присутствии хитозана при λ 545 нм (розовый цвет раствора, размер частиц около 50 нм) и НЧ Au в присутствии раствора хитозана при λ 540 нм (бордовый цвет раствора, размер частиц около 25 нм). Исходя из формы спектров поглощения, НЧ Au размером 50 нм являются более однородными по размеру, чем наночастицы размером 25 нм.

Как показывают предварительные исследования, модификация поверхности электродов суспензиями УНТ и НЧ Au приводит к изменению аналитических возможностей биосенсоров. Поэтому представляло интерес рассмотреть морфологию (изменение) поверхности электродов при модификации УНТ и НЧ Au.

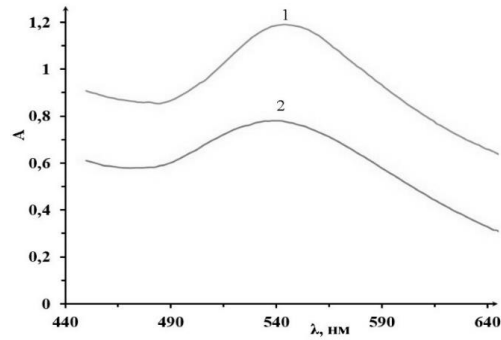


Рис. 3. Спектры поглощения НЧ Au в растворе хитозана: 1) для размера НЧ 50 нм, 2) для размера НЧ 25 нм

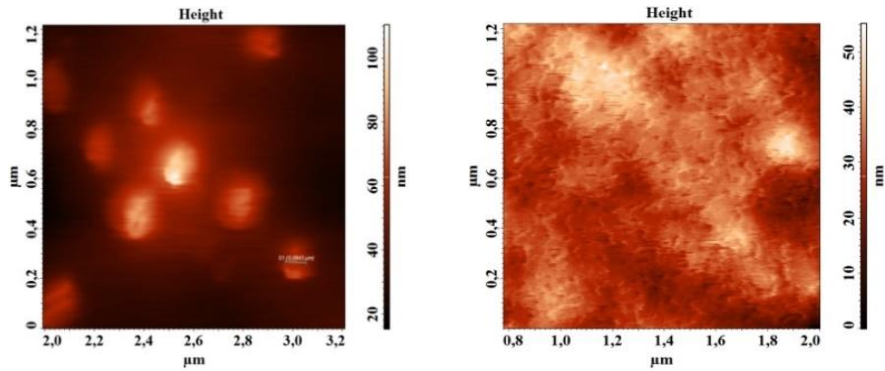


Рис. 4. Изображения в режиме топографии в 2D-проекциях поверхности электрода, модифицированного: а) НЧ Au в K_3Cit , б) НЧ Au в хитозане, размер 1.2×1.2 мкм

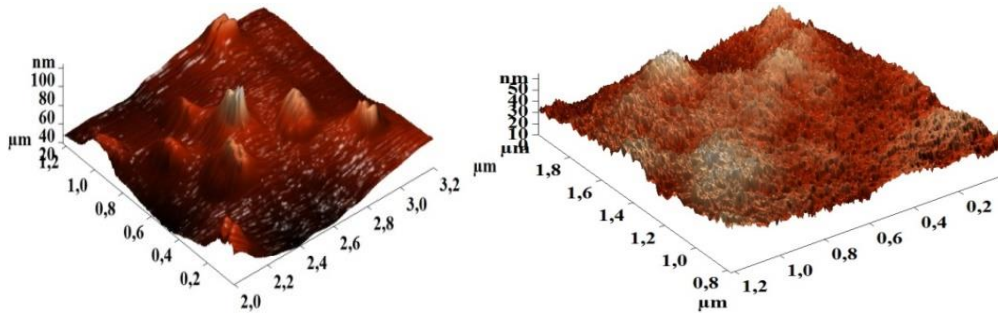


Рис. 5. Изображения в режиме топографии в 3D-проекциях поверхности электрода с модификатором: а) НЧ Au в K_3Cit , б) НЧ Au в хитозане, размер 1.2×1.2 мкм

Удобным методом визуального анализа является атомно-силовая микроскопия (АСМ), которая дает хорошую обзорную информацию. Использование АСМ позволяет получить изображение поверхности электродов на разных стадиях получения биочувствительной части сенсоров в разных условиях (рис. 4, 5). Судя по полученным нами АСМ-изображениям поверхности электрода, при нанесении наночастиц Au второго типа поверхность становится более развитой, наночастицы более однородные и более равномерно распределены по поверхности электрода.

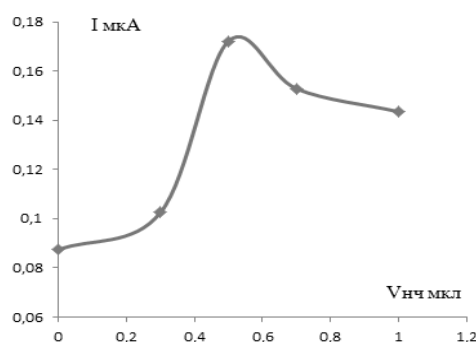


Рис. 6. Зависимость величины аналитического сигнала (тока) от количества НЧ Au, наносимого на рабочую поверхность электрода

При модификации поверхности рабочего электрода варьировали количество раствора НЧ Au в хитозане (то есть количество НЧ Au 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 НЧ Au (рис. 6).

2.3.2.2. Влияние модификации поверхности электродов МУНТ и НЧ Au на аналитические возможности тирозиназного биосенсора. Изучение действия патулина на модифицированный МУНТ и НЧ Au тирозиназный сенсор показало, что патулин оказывает ингибирующее действие на такой сенсор в области концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $8 \cdot 10^{-12}$ М. Максимальная степень (процент) ингибирования при действии на фермент-субстратную систему тирозиназа – фенол составляет для патулина (85.3 ± 0.7)% в изученной области концентраций. Нижняя граница определяемых содержаний, градуировочная зависимость между током и концентрацией для патулина представлены в табл. 1.

Использование модифицированного МУНТ/НЧ Au тирозиназного биосенсора позволило расширить диапазон определяемых концентраций и снизить c_H по сравнению с немодифицированным и модифицированным МУНТ аналогами (см. табл. 1).

2.4. Кинетические параметры реакции ферментативного превращения фенола в присутствии патулина. Выяснение закономерностей действия определяемого эффектора на иммобилизованную тирозиназу невозможно без изучения кинетики действия этого соединения на каталитическую активность изучаемого фермента, входящего в состав биосенсора. Кроме того, знание характеристических кинетических параметров (константы Михаэлиса, максимальной скорости ферментативной реакции) и типа ингибирования может быть использовано для подбора условий, обеспечивающих получение максимального аналитического сигнала при определении микроколичеств эффекторов.

Для определения кинетических параметров, таких как кажущаяся константа Михаэлиса K_m , максимальная скорость V_{max} и константы ингибирования K_i ,

Табл. 4

Кинетические параметры реакции тирозиназного превращения фенола в присутствии патулина, $c_n = 1 \cdot 10^{-3}$, pH 7.0, $n = 3$

Концентрация патулина, моль/л	$K_m \times 10^5$, моль/л	$V_{\max} \times 10^7$, моль/л·с	Соотношение параметров K_m и V_{\max}	Тип ингибирования	K_{in} , моль ⁻¹
Тирозиназный биосенсор					
0	9.7 ± 1.3	8.9 ± 0.8	$K'_m < K_m$ $V'_{\max} < V_{\max}$	Двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное)	$(3.2 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$ $(5.2 \pm 0.8) \cdot 10^{-9}$
10^{-7}	5.3 ± 0.8	4.4 ± 0.4			
10^{-8}	6.5 ± 0.9	5.0 ± 0.2			
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ и НЧ Au в хитозане					
0	7.2 ± 0.9	8.2 ± 0.5	$K'_m < K_m$ $V'_{\max} < V_{\max}$	Двухпараметрически рассогласованное	$(7.6 \pm 0.9) \cdot 10^{-8}$ $(2.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$
10^{-7}	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3			
10^{-9}	4.5 ± 0.6	2.4 ± 0.4			

использовали интегральный анализ полной кинетической кривой действия иммобилизованной тирозиназы на фенол в отсутствие и в присутствии эффекторов. Для определения скоростей реакции использовали начальный участок этой кривой (методика построения кинетической кривой приведена в разд. 1.7).

Из результатов кинетических исследований при изучении изменения каталитической активности иммобилизованных ферментов в составе немодифицированных и модифицированных МУНТ и НЧ Au биосенсоров в присутствии различных концентраций микотоксинов следует, что наблюдается двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное) ингибирование (табл. 4), то есть при одинаковом воздействии, ведущем к снижению сродства субстрата и фермента, ингибитор в присутствии этой концентрации фенола уменьшает скорость его ферментативного превращения

3. Определение патулина в пищевых продуктах

Полученные результаты показывают, что предлагаемые биосенсоры могут быть использованы для определения содержания патулина в пищевых продуктах.

Патулин поражает большей частью овощи и фрукты, вызывая их гниение (томаты, айва, облепиха, брусника, бананы, виноград, персики, вишня). Более всего заражению подвержены яблоки, концентрация токсина в них может достигать 17–18 мг/кг. При этом токсин наиболее сконцентрирован в подгнившей части яблока, а, например, в заражённом томате он располагается равномерно по всей ткани. Поэтому была сделана попытка определить именно данный токсин в соках (томатный, яблочно-виноградный). При пробоподготовке образцов использовали рекомендации, предложенные в работах [24, 25].

Методика извлечения (выделения) патулина из соков (яблочно-виноградный и томатный).

Для удобства последующей обработки томатный сок разбавляли водой в соотношении 1 : 1.

Табл. 5

Результаты определения патулина в образцах пищевых продуктов с помощью тирозиназного биосенсора (модификация МУНТ и НЧ Au в хитозане) ($n = 5$, $P = 0.95$). ПДК = 0.05 мг/кг

Образцы	Содержание патулина, мг/кг	S_r
Нектар осветленный яблочно-виноградный «Каждый день» (ООО «ИНТЕРАГРОСИСТЕМ», РФ, Краснодарский край)	$(2.8 \pm 0.5) \cdot 10^{-6}$	0.054
Сок осветленный яблоко-виноград «Сады Придонья» для детского питания (ОАО «Сады Придонья» РФ)	$(7.8 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$	0.040
Томатный сок «Каждый день» (ООО «ИНТЕРАГРОСИСТЕМ» РФ, Краснодарский край)	$(1.8 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$	0.069

Пробу сока (томатный, виноградные) объемом 5.0 мл экстрагировали этилацетатом в течение не менее 1 мин. Экстракцию повторяли еще два раза новыми порциями этилацетата. Этилацетатные фазы объединяли и дальнейшую экстракцию проводили раствором карбоната натрия. К экстракту добавляли уксусную кислоту, смесь перемешивали и проводили вакуумную отгонку этилацетата. Остаток растворяли в 1 мл воды [24, 25].

Методика определения содержания патулина в образцах соков.

В ячейку на 200 мкл вносили раствор образца, фенол ($1 \cdot 10^{-3}$ М), фосфатный буферный раствор (рН 7) и тирозиназный биосенсор. Растворы инкубировали в течение 10 мин. Затем измеряли значение тока при потенциале 0.7 В.

Содержание патулина в образцах определяли по градуировочному графику (см. разд. 2.2). Полученные результаты представлены в табл. 5. Следует отметить, что ПДК патулина, предъявляемое к фруктовым и овощным сокам, пюре, составляет не более 0.05 мг/кг; в продуктах детского и диетического питания присутствие следов патулина не допускается.

Разработанные биосенсоры позволили определять патулин в пищевых продуктах на уровне ПДК и ниже. Во всех анализируемых продуктах патулин был обнаружен на уровне ниже ПДК.

Выводы

1. Предложены новые амперометрические биосенсоры для определения патулина на основе модифицированных УНТ и НЧ Au в хитозане планарных платиновых электродов и иммобилизованной тирозиназы, позволяющие в ряде случаев расширить диапазон определяемых концентраций, снизить s_n , улучшить коэффициент корреляции, получить более воспроизводимый аналитический отклик. Погрешность определения не превышает 0.063.

2. Найдены условия получения наночастиц золота размером от 25 до 50 нм.

3. Установлено впервые, что патулин проявляет свойства обратимых ингибиторов тирозиназы, что позволяет проводить его определение с помощью

биосенсоров, модифицированных УНТ и НЧ Au в следующих рабочих концентрационных интервалах:

– тирозиназный биосенсор – от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л, c_n $8 \cdot 10^{-11}$ моль/л;
– тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ, – $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-11}$ моль/л, c_n $8 \cdot 10^{-12}$ моль/л.

– тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ и НЧ Au, – $1 \cdot 10^{-6}$ до $8 \cdot 10^{-12}$ моль/л, c_n $3 \cdot 10^{-12}$ моль/л.

4. Кинетические параметры реакции ферментативного превращения фенола в присутствии тирозиназного биосенсора (УНТ, НЧ Au) и патулина в определенных концентрационных интервалах соответствуют процессам двухпараметрически рассогласованного ингибирования.

5. Разработаны методики определения патулина с помощью предлагаемых ферментных электродов на основе тирозиназы в пищевых продуктах (яблочно-виноградные и томатный соки) разных производителей и стран, позволяющие определять микотоксин на уровне и ниже ПДК с S_r не более 0.069.

Литература

1. European Mycotoxin Awareness Network. – URL: <http://www.mycotoxins.org>.
2. Mycotoxin Management. – <http://www.knowmycotoxins.com/ru/mycotoxins/introduction>.
3. Гогин А.Е. Микотоксины: эффективный контроль – эффективное производство // Комбикорма. – 2005. – № 2. – С. 68–69.
4. Bondarenko A.P., Eremin S.A. Determination of zearalenone and ochratoxin a mycotoxins in grain by fluorescence polarization immunoassay // Anal. Chem. – 2012. – V. 67, No 9. – P. 790–794. – doi: 10.1134/S1061934812090031.
5. Урусов А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохимические методы анализа микотоксинов // Журн. прикл. биохимии и микробиол. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 276–290.
6. Zamfir L.-G., Geana I., Bourigua S., Rotariu L., Bala C., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection // Sens. Actuators, B. – 2011. – V. 159, No 1. – P. 178–184. – doi: 10.1016/j.snb.2011.06.069.
7. Pennacchio A., Ruggiero G., Staiano M., Piccialli G., Oliviero G., Lewkowicz A., Synak A., Bojarski P., D'Auria S. A surface plasmon resonance based biochip for the detection of patulin toxin // Opt. Mater. – 2014. – V. 36, No 10. – P. 1670–1675. – doi: 10.1016/j.optmat.2013.12.045.
8. Cheng Y., Liu Y., Huang J., Yuezhong K., Li X., Wen Z., Litong J. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-coated carbon nanotubes nanocomposite for rapid detection of coliforms // Electrochim. Acta. – 2009. – V. 54, No 9. – P. 2588–2594. – doi: 10.1016/j.electacta.2008.10.072.
9. Vicentini F.C., Janegitz B.C., Brett C.M.A., Fatibello-Filho O. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within adihexadecylphosphate film // Sens. Actuators, B. – 2013. – V. 188. – P. 1101–1108. – doi: 10.1016/j.snb.2013.07.109.
10. Wang N., Zhao H.-Y., Ji X.-P., Li X.-R., Wang B.-B. Gold nanoparticles-enhanced bisphenol A electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized onto self-assembled monolayers-modified gold electrode // Chin. Chem. Lett. – 2014. – V. 25, No 5. – P. 720–722. – doi: 10.1016/j.ccllet.2014.01.008.

11. *Singha S., Jain D.V.S., Singla M.L.* Sol-gel based composite of gold nanoparticles as matrix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor // *Sens. Actuators, B.* – 2013. – V. 182. – P. 161–169. – doi: 10.1016/j.snb.2013.02.111.
12. *Шаповалова Е.Н., Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Гринева Л.А., Мажуга А.Г., Шнигун О.А.* Разделение азотсодержащих соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на силикогеле, модифицированного наночастицами золота, стабилизированных хитозаном // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2012 – Т. 53, № 2. – С. 108–114.
13. *Feng W., Ji P.* Enzymes immobilized on carbon nanotubes // *Biotechnol. Adv.* – 2011. – V. 29, No 6. – P. 889–895. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.007.
14. *Amjad A., Suhail A., Qayyum H.* Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support // *Process Biochem.* – 2005. – V. 40, No 7. – P. 2379–2386. – doi: 10.1016/j.procbio.2004.09.020.
15. *Li J., Wu R., Hu Q., Wang J.* Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate // *Food Control.* – 2007. – V. 18, No 5. – P. 530–534. – doi: 10.1016/j.foodcont.2005.12.014.
16. *Березин И.В.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Наука, 1976. – 320 с.
17. *Крупяно В.И.* Векторный метод представления ферментативных реакций. – М.: Наука, 1990. – 141 с.
18. *Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Стойкова Е.Е.* Основы биосенсорики. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2007. – 82 с.
19. *Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н.* Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. – М.: Бином. Лаборатория знания, 2009. – 416 с.
20. *Кулис Ю.Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. – Вильнюс: Мокслас, 1981. – 200 с.
21. *Zhao Q., Zhuang Q.K.* Determination of phenolic compounds based on the tyrosinase-single walled carbon nanotubes sensor // *Electroanalysis.* – 2005. – V. 17, No 1. – P. 85–88. – doi: 10.1002/elan.200403123.
22. *Шапканова О.Ю., Ермолаева Т.Н.* Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 5. – С. 677–693.
23. *Tarozaitq R., Juskinas R., Kurtinaitienū M., Jagminienū A., Vaskelis A.* Gold colloids obtained by Au(III) reduction with Sn (II): preparation and characterization // *Chemija.* – 2006. – V. 17, No 2–3. – P. 1–6.
24. *Стародуб Н.Ф., Пилипенко Л.Н., Егорова А.В., Пилипенко И.В.* Микотоксин патулин: продуценты, биологическое действие, индикация в пищевых продуктах // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – № 3. – С. 50–57.
25. ГОСТ Р51435-99. Сок яблочный, сок яблочный консервированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. – М.: Госстандарт России, 2002. – 4 с.

Поступила в редакцию
14.06.16

Варламова Регина Марковна, кандидат химических наук, заведующий лабораторией кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Regina.Varlamova@kpfu.ru*

Медянцева Эльвина Павловна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Elvina.Medyantseva@kpfu.ru*

Хамидуллина Резеда Ринатовна, студент кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

Будников Герман Константинович, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Herman.Budnikov@kpfu.ru*

ISSN 1815-6169 (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 3, pp. 351–368

Determination of Patulin Using Amperometric Tyrosinase Biosensors Based on Electrodes Modified with Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles

R.M. Varlamova^{*}, *E.P. Medyantseva*^{**}, *R.R. Hamidullina*, *H.C. Budnikov*^{***}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}*Regina.Varlamova@kpfu.ru*, ^{**}*Elvina.Medyantseva@kpfu.ru*, ^{***}*Herman.Budnikov@kpfu.ru*

Received June 14, 2016

Abstract

New amperometric biosensors based on platinum screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes, gold nanoparticles, and immobilized enzyme – tyrosinase have been developed for determination of patulin in the concentrations of $1 \cdot 10^{-6}$ – $8 \cdot 10^{-12}$ mol/L with an error of no more than 0.063. The best conditions for obtaining gold nanoparticles have been chosen. The conditions for immobilization of multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles on the surface of the planar electrode have been revealed. The conditions for functioning of the proposed biosensors have been identified. The results have been used to control the content of patulin in food products within and lower than the maximum allowable levels.

Keywords: mycotoxins, amperometric biosensor, tyrosinase, patulin, multi-walled carbon nanotubes, gold nanoparticles, food products

Figure Captions

Fig. 1. The cyclic voltamperogram of the products of fermentation of the tyrosinase substrate – phenol in the presence of the tyrosinase biosensor. Phenol concentration $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, background electrolyte – phosphate buffer saline with pH 7.0.

- Fig. 2. Voltamperograms showing the oxidization of phenol and hydrogen peroxide on the tyrosinase biosensor in the absence (2) and in the presence (1) of patulin, $c_H = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L (3), phosphate buffer saline with pH 7.0.
- Fig. 3. Absorption spectra of Au NP in the chitosan solution: 1) λ 545 nm – pink, 2) λ 540 nm – claret.
- Fig. 4. Images in the topography regime in 2D projections of the modified electrode surface: a) Au NP in K_3Cit , b) Au NP in chitosan, $1.2 \times 1.2 \mu m$.
- Fig. 5. Images in the regime of 3D projections of the modified electrode surface: a) Au NP in K_3Cit , b) Au NP in chitosan, $1.2 \times 1.2 \mu m$.
- Fig. 6. The dependence of the analytical signal (current) on the number of Au NP applied to the working surface of the electrode.

References

1. European Mycotoxin Awareness Network. Available at: <http://www.mycotoxins.org>.
2. Mycotoxin Management. Available at: <http://www.knowmycotoxins.com/ru/mycotoxins/introduction>.
3. Gogin A.E. Mycotoxins: effective control – effective production. *Kombikorma*, 2005, no. 2, pp. 68–69. (In Russian)
4. Bondarenko A.P., Eremin S.A. Determination of zearalenone and ochratoxin A mycotoxins in grain by fluorescence polarization immunoassay. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 67, no. 9, pp. 790–794. doi: 10.1134/S1061934812090031.
5. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 253–266.
6. Zamfir L.-G., Geana I., Bourigua S., Rotariu L., Bala C., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection. *Sens. Actuators, B*, 2011, vol. 159, no. 1, pp. 178–184. doi: 10.1016/j.snb.2011.06.069.
7. Pennacchio A., Ruggiero G., Staiano M., Piccialli G., Oliviero G., Lewkowicz A., Synak A., Bojarski P., D'Auria S. A surface plasmon resonance based biochip for the detection of patulin toxin. *Opt. Mater.*, 2014, vol. 36, no. 10, pp. 1670–1675. doi: 10.1016/j.optmat.2013.12.045.
8. Cheng Y., Liu Y., Huang J., Yuezhong K., Li X., Wen Z., Litong J. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe_3O_4 nanoparticles-coated carbon nanotubes nanocomposite for rapid detection of coliforms. *Electrochim. Acta*, 2009, vol. 54, no. 9, pp. 2588–2594. doi: 10.1016/j.electacta.2008.10.072.
9. Vicentini F.C., Janegitz B.C., Brett C.M.A., Fatibello-Filho O. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within adihexadecylphosphate film. *Sens. Actuators, B*, 2013, vol. 188, pp. 1101–1108. doi: 10.1016/j.snb.2013.07.109.
10. Wang N., Zhao H.-Y., Ji X.-P., Li X.-R., Wang B.-B. Gold nanoparticles-enhanced bisphenol A electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized onto self-assembled monolayers-modified gold electrode. *Chin. Chem. Lett.*, 2014, vol. 25, no. 5, pp. 720–722. doi: 10.1016/j.ccl.2014.01.008.
11. Singha S., Jain D.V.S., Singla M.L. Sol-gel based composite of gold nanoparticles as matrix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor. *Sens. Actuators, B*, 2013, vol. 182, pp. 161–169. doi: 10.1016/j.snb.2013.02.111.
12. Shapovalova E.N., Anan'eva I.A., Elfimova Ya.A., Grineva L.A., Mazhuga A.G., Shpigun O.A. Separation of nitrogen-containing compounds on silica gel modified with gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Vestn. Mosk. Univ., Ser. 2: Khim.*, 2012, vol. 53, no. 2, p. 108–114. (In Russian)
13. Feng W., Ji P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnol. Adv.*, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 889–895. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.007.
14. Amjad A., Suhail A., Qayyum H. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support. *Process Biochem.*, 2005, vol. 40, no. 7, pp. 2379–2386. doi: 10.1016/j.procbio.2004.09.020.
15. Li J., Wu R., Hu Q., Wang J. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control*, 2007, vol. 18, no. 5, pp. 530–534. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.12.014.

16. Berezin I.V. Practical Course of Chemical Enzyme Kinetics. Moscow, Nauka, 1976. 320 p. (In Russian)
17. Krupyanko V.I. A Vector Method of Representation of Enzymatic Reactions. Moscow, Nauka, 1990. 141 p. (In Russian)
18. Evtugin G.A., Budnikov H.C., Stoikova E.E., Fundamentals of Biosensors. Kazan, Kazan. Gos. Univ., 2007. 82 p. (In Russian)
19. Budnikov H.C., Evtugin H.C., Evtugin G.A., Maistrenko V.N. Modified Electrodes for Voltammetry in Chemistry, Biology, and Medicine. Moscow, Binom. Lab. Znaniya, 2009. 416 p. (In Russian)
20. Kulis Yu.Yu. Analytical Systems Based on Immobilized Enzymes. Vilnius, Mokslas, 1981. 200 p. (In Russian)
21. Zhao Q., Zhuang Q.K. Determination of phenolic compounds based on the tyrosinase-single walled carbon nanotubes sensor. *Electroanalysis*, 2005, vol. 17, no. 1, pp. 85–88. doi: 10.1002/elan.200403123.
22. Shashkanova O.Yu., Ermolaeva T.N. A new method for diagnosis of autoimmune diseases based on the affine reaction on the surface of piezoquartz sensor. *Sorbtsionnye Khromatogr. Protessy*, 2009, vol. 9, no. 5, pp. 677–693. (In Russian)
23. Tarozaitq R., Juskiņas R., Kurtinaitienė M., Jagminienė A., Vaskelis A. Gold colloids obtained by Au(III) reduction with Sn (II): preparation and characterization. *Chemija*, 2006, vol. 17, nos. 2–3, pp. 1–6.
24. Starodub N.F., Pilipenko L.N., Egorova A.V., Pilipenko I.V. Patulin mycotoxin: producers, biological effects, indication in food stuffs. *Sovrem. Probl. Toksikol.*, 2008, no. 3, pp. 50–57. (In Russian)
25. State Standard R51435-99. Apple juice, apple juice concentrates, and drinks containing apple juice. Method for determination of patulin content using high performance liquid chromatography. Moscow, Gosstand. Ross., 2002. 4 p. (In Russian)

Для цитирования: Варламова Р.М., Медянцева Э.П., Хамидуллина Р.Р., Будников Г.К. Определение патулина амперометрическими тирозиназными биосенсорами на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и наночастицами золота // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 3. – С. 351–368.

For citation: Varlamova R.M., Medyantseva E.P., Hamidullina R.R., Budnikov H.C. Determination of patulin using amperometric tyrosinase biosensors based on electrodes modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 3, pp. 351–368. (In Russian)