

УДК 602.1:53.082.9:543.393
DOI: 10.15587/2313-8416.2015.36751

ВИКОРИСТАННЯ СЕНСОРА ППР ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ЗВ'ЯЗУВАННЯ ДЕЯКИХ ІНСЕКТИЦИДІВ З ТЕТРААЛКІЛКАЛІКС[4]РЕЗОРЦИНОЛАРЕНАМИ

© О. С. Гойстер

Методом поверхневого плазмонного резонансу досліджено субстрат-рецепторні взаємодії інсектицидів діазінону, хлорпіріфосу, дельтаметрину та біфентрину з впорядкованими молекулярними шарами калікс[4]резорциноларенів, нанесених на поверхню золота, модифікованого додекантіолом. Межа виявлення діазінону становить 0,1 мкг/мл, хлорпіріфосу – 1 мкг/мл, біфентрину – 10 мкг/мл та дельтаметрину – 20 мкг/мл

Ключові слова: діазінон, хлорпіріфос, дельтаметрин, біфентрин, біосенсор, додекантіол, калікс[4]резорциноларени, поверхневий плазмонний резонанс, модифікація

Substrate-receptor interaction between insecticides (diazinon, chlorpyrifos, bifenthrin, deltamethrin) and well-ordered molecular layers of tetraalkylcalix[4]resorcinolarenes deposited on the dodecanethiol coated gold surface were studied by surface plasmon resonance method. The detection limit for diazinon, chlorpyrifos, bifenthrin and deltamethrin is 0,1 mg/ml; 1 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml correspondingly

Keywords: diazinon, chlorpyrifos, bifenthrin, deltamethrin, biosensor, dodecanethiol, tetraalkylcalix[4]resorcinolarenes, surface plasmon resonance, modification

1. Вступ та літературний огляд

В структурі інсектицидів, які застосовують в Україні, важливе місце займають представники фосфорорганічних сполук (ФОП) та синтетичних піретроїдів (СП) [1].

Фосфорорганічні пестициди (ФОП) широко використовуються у сільському господарстві. ФОП володіють генотоксичною дією, результатом якої є численні мутації геному досліджуваних організмів [2]. Крім того, ФОП спричиняють імунодепресивну реакцію у людей: при гострому отруєнні спостерігається зниження рівня IgG, IgA, кількості Т- та В-лімфоцитів [3].

Піретроїди (або синтетичні піретроїди, СП) – використовуються у медицині, сільському та лісовому господарстві для боротьби з кліщами, сараною, комарами тощо.

Основний прояв токсичної дії СП полягає у розладах діяльності ЦНС, викликаній порушеннями процесів генерації та розповсюдження нервового збудження, що проявляється у блокуванні нервово-м'язової передачі [4, 5].

Висока токсичність ФОС та резистентність шкідників до СП зумовлюють необхідність посилення контролю за їх вмістом в об'єктах навколишнього середовища.

Хроматографічні методи традиційно використовують для аналізу інсектицидів в аналітичних лабораторіях [6]. Широкого розповсюдження також набув імуноферментний аналіз (ІФА) [7].

Біосенсори з ефектом поверхневого плазмонного резонансу, як пристрої для швидкого виявлення пестицидів, є активною областю досліджень на протязі останніх десяти років. Одна половина біосенсорів, які використовують для виявлення пестицидів, оснований на каталітичній діяльності декількох ферментів в присутності пестицидів [8]. Однак багато пестицидів мають подібний спосіб дії, характерний для діяльності того ж самого фермента. Таким чином, біодатчики не забезпечують отримання інформації про специфічний пестицид. Друга половина біосенсорів – імуносенсори, які використовують антитіла та антигени як елементи розпізнавання на чутливій поверхні датчика. Вони, здається в змозі забезпечити відповідні умови для ідентифікації окремого пестицида. Сприяє цьому також і розвиток гібридних технологій отримання антитіл [9, 10].

Однак, слід не забувати про те, що отримання антитіл є складним та вартісним процесом, а біологічні молекули є нестабільними за умов їх зберігання, як у вільному, так і в імобілізованому стані.

Дизайн дослідів на ППР-сенсорі включає в себе також забезпечення умов оптимальної імобілізації досліджуваних аналітів. Щоб зосередити молекули на твердій поверхні запропоновано використання самоасоційованого моношару (САМ) з алкантіолу. А формування проміжного лінкерного шару з таких штучних рецепторів, як калікс[4]резорциноларени, допомагає досягти

необхідної безпосередньої близькості між біоматеріалом і перетворювачем та зберегти природні властивості кожної молекули на поверхні. Раніше нами було розроблено один з варіантів оптичного біосенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу (ППР), що дозволяє в модельних розчинах визначати невеликі молекули паутуліну, зеараленону та Т-2 токсину з межею виявлення 0,1, 0,2 та 1,2 нг/мл, відповідно [11].

2. Мета роботи

Метою даної роботи було вивчення селективності калікс [4] резорциноларенових рецепторів до виявлення хімічних сполук іншого походження, відмінного від мікотоксинів а саме, – діазінону, хлорпіріфосу, дельтаметрину та біфентрину за допомогою оптичного сенсора ППР.

3. Методика експериментів

Дослідження проводили на спектрометрі поверхневого плазмонного резонансу „Плазмон SPR-4М”, розробленому та виготовленому в Інституті фізики напівпровідників НАН України. При інтерпретації даних, вважали, що зміна величини кута ППР (відгук ППР) прямо пропорційна поверхневій

концентрації речовини, нанесеної на поверхню трансдуктора.

У випадку модифікації поверхні перетворювача ППР сенсора скляну пластинку, покриту шаром золота, експонували у 98 %-ий розчин додекантіолу на 18 год. Далі поверхню сенсорної пластинки відмивали 50 % етиловим спиртом.

Шар каліксарену на поверхні сенсорної пластинки формували безпосередньо в кюветі ППР-приладу шляхом прокачування через кювету зростаючих концентрацій його розчину в 50 % спирті до припинення адсорбції, яку контролювали за відгуком ППР. Для видалення надлишку каліксарену, що не сорбувався на поверхні, кювету промивали 50 % розчином спирту та реєстрували зсув резонансного кута (відгук ППР).

Після цього комірку наповнювали розчином досліджуваного інсектициду в послідовно зростаючих концентраціях: 10 нг/мл–1000 мкг/мл, час інкубації – 10 хв; комірку щоразу промивали 50 % розчином спирту для видалення елементів, що не зв’язалися, реєстрували відгук сенсора.

Для досліджень було обрано два фосфорорганічних пестициди (діазінон, хлорпіріфос) та два піретроїдних (дельтаметрин, біфентрин) (Sigma).

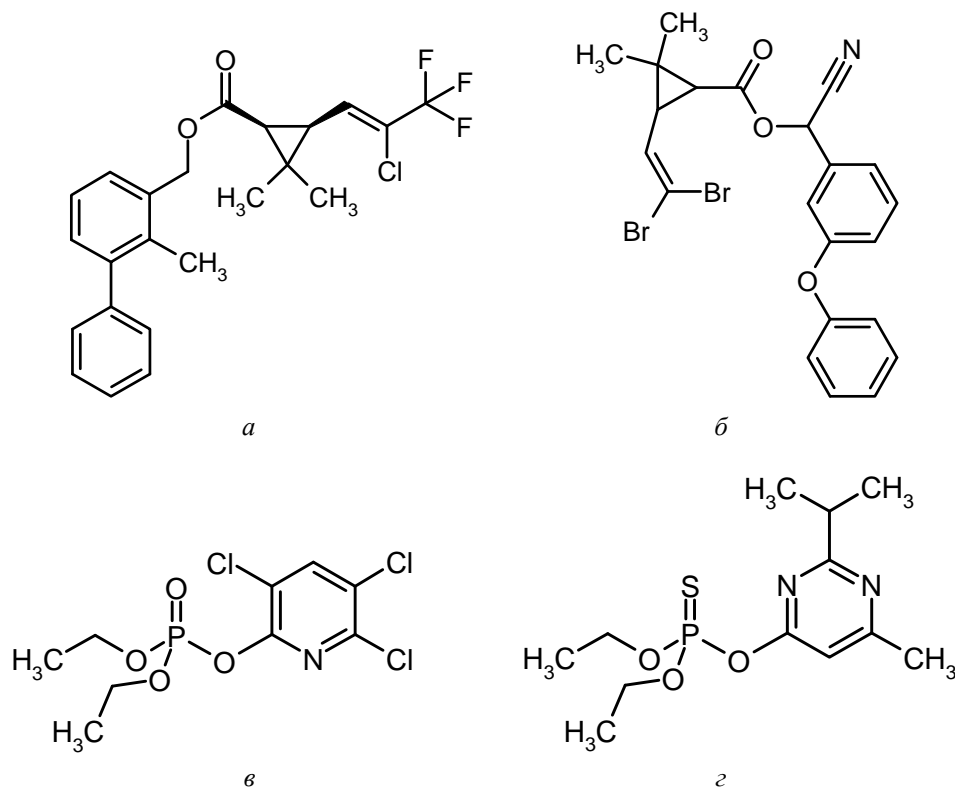


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних пестицидів: а – біфентрин; б – дельтаметрин; в – хлорпіріфос; г – діазінон

Діазінон (304,35) – рідина без кольору, розкладається при температурах >120 °С, розчинна у петролейному етері, спиртах, циклогексані, бензолі та подібних вуглеводнях. Розчинність у воді – 40 мг/л при 20 °С.

Хлорпіріфос (350,59) – біла кристалічна речовина, без запаху, добре розчинна у більшості органічних розчинників (бензолі, ацетоні, хло-роформі,

діетиловому етері, етанолі, дисульфіді карбону, тощо) та обмежено розчинна у воді (1.39 мг/л при 25 °С). Стабільна при рН<6, в лужних середовищах гідролізується.

Біфентрин (422,9) – біла тверда речовина з легким солодкуватим запахом, розчинна у метилхлориді, ацетоні, хлороформі, толуолі, обмежно

розчинна у гептані та метанолі, а також у воді (0.1 мг/л при 25 °С).

Дельтаметрин (505,21) – біла кристалічна речовина, погано розчинна у воді, натомість добре розчинна у ароматичних розчинниках, ацетоні, етанолі, діоксані.

Досліджувані калікс[4]резорциноларени були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України

і представлені нам чл.-кор. НАН України проф. В. І. Кальченко. Ці каліксарени представляють собою макроциклічні сполуки чашоподібної форми, що отримуються кислотнокаталізованою конденсацією резорцинола з різноманітними альдегідами [12] і характеризуються різною довжиною алкільних радикалів на вузькому вінці макроциклу та різною кількістю гідроксильних груп на широкому вінці (рис. 2).

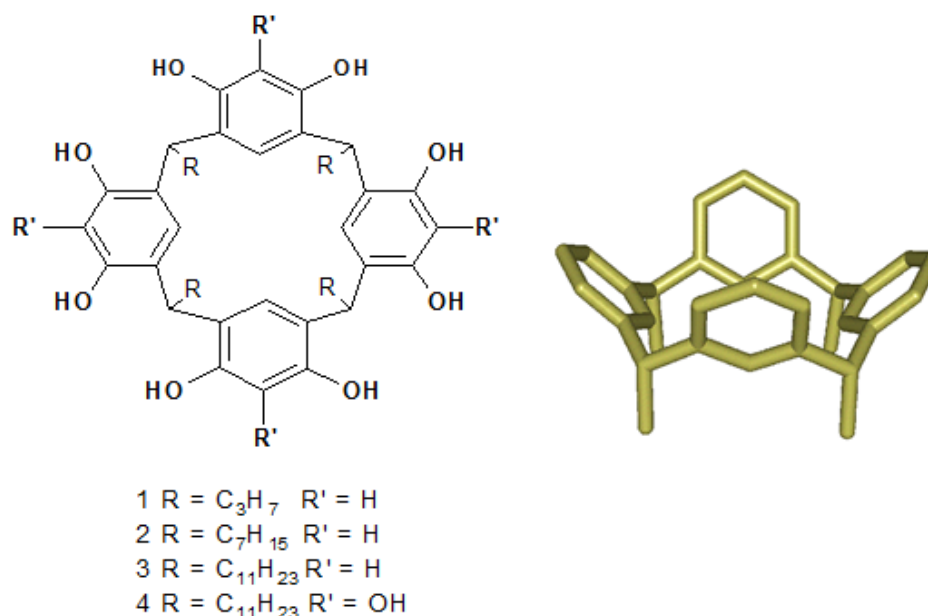


Рис. 2. Хімічна будова та просторова структура тетраалкілкалікс[4]резорциноларенів 1-4

4. Обговорення результатів

Пестициди було проаналізовано на чутливій поверхні біосенсора з чотирма гомологічними калікс[4]резорциноларенами 1-4 (рис. 2), які попередньо використовували у дослідженнях з мікотоксинами.

Для того, щоб збільшити кількість іммобілізованих пестицидів здійснено хемосорбцію молекул калікс[4]резорциноларенів на золоту поверхню, на якій попередньо сформували самоасоційований шар додекантіолу. Довголанцюговий n-алкантіол, зв'язуючись із золотою плівкою через тіольні групи забезпечує більш високий контроль над густиною та однорідністю охоплення поверхні перетворювача біосенсора, а також появу менш випадково орієнтованих бімолекулярних поверхонь [13]. Оброблена додекантіолом поверхня перетворювача зв'язує калікс[4]резорциноларени за рахунок гідрофобних взаємодій їх алкільних груп з додецильними групами на поверхні сенсора. Таким чином вдається запобігти небажаним конформаційним змінам у структурі калікс[4]резорциноларенів, що виникають внаслідок

їх взаємодії з твердою поверхнею, а також забезпечити направлене експонування ОН-зв'язуючих центрів у розчин пестициду (рис. 3).

Після того, як поверхня сенсора насичується молекулами калікс[4]резорциноларенів у вимірнувальну комірку накачували поступово зростаючі концентрації пестициду. Кожна наступна концентрація була введена тільки після того, коли попереднє розведення приводило до насичення зв'язування кривої. Між додаваннями певних кількостей різних концентрацій незв'язані елементи були виміті. Невелике зменшення в сигналі після відмивання було зумовлене видаленням вільно зв'язаних молекул пестицидів. Така картина спостерігається в процесі обстеження невеликого діапазону досліджуваних концентрацій пестицидів. Так тетрапропілкалікс[4]резорциноларен 1, який забезпечує найкраще зв'язування з усіма досліджуваними пестицидами, дозволяє визначати діазінон з межею виявлення 0,1 мкг/мл (рис. 4), хлорпіріфос – 1 мкг/мл (рис. 5), біфентрин 10 мкг/мл (рис. 6) та дельтаметрин – 20 мкг/мл (рис. 7).

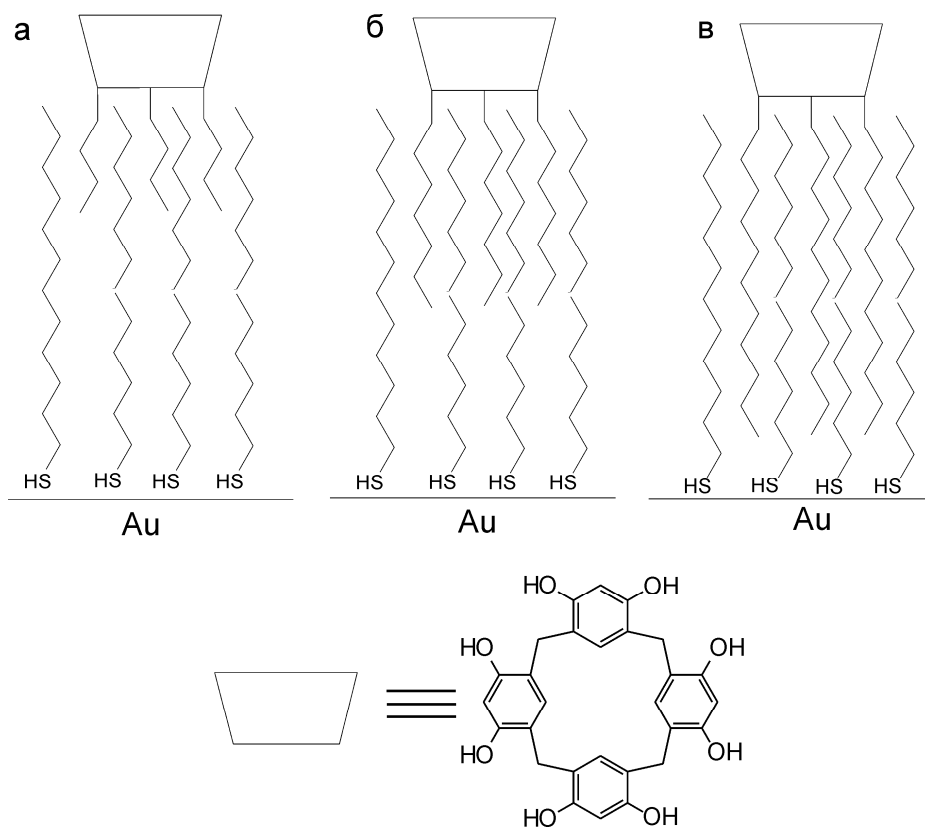


Рис. 3. Вірогідний тип зв'язування молекул тетраалкілкалік[4]резорциноларенів з різною довжиною алкільних груп (а, б, в) на поверхні золота, модифікованій додекантіолом

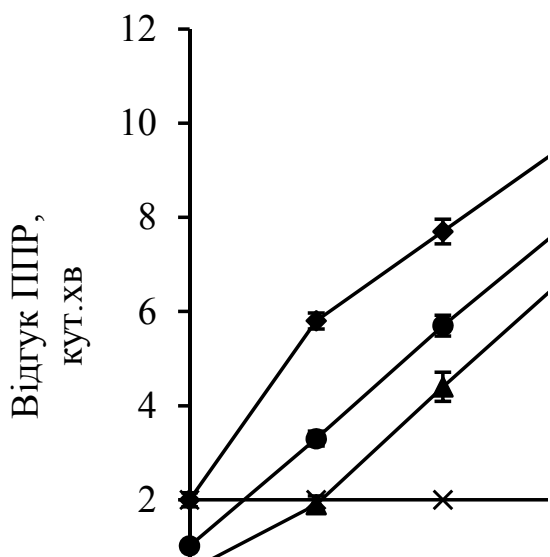


Рис. 4. Сенсограми зв'язування діазінону на поверхні золота покритій каліксаренами 1-3: 1 – R=C₃H₇; 2 – R=C₇H₁₅; 3 – R=C₁₁H₂₃

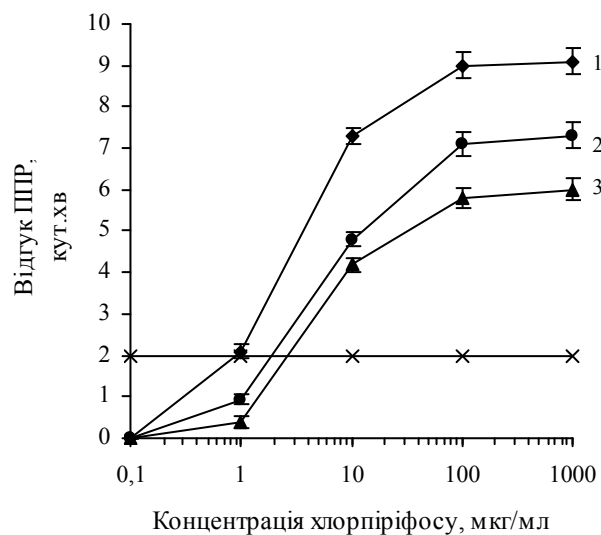


Рис. 5. Сенсограми зв'язування хлорпіріфосу на поверхні золота покритій каліксаренами 1-3: 1 – R=C₃H₇; 2 – R=C₇H₁₅; 3 – R=C₁₁H₂₃.

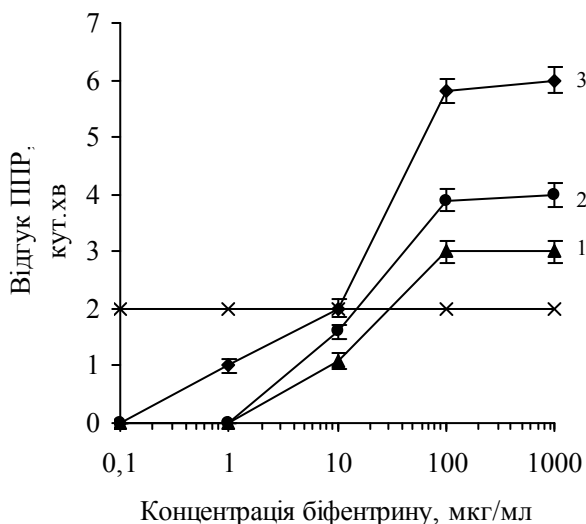


Рис. 6. Сенсограми зв'язування біфентрину на поверхні золота покритій каліксаренами 1–3: 1 – $R=C_3H_7$; 2 – $R=C_7H_{15}$; 3 – $R=C_{11}H_{23}$

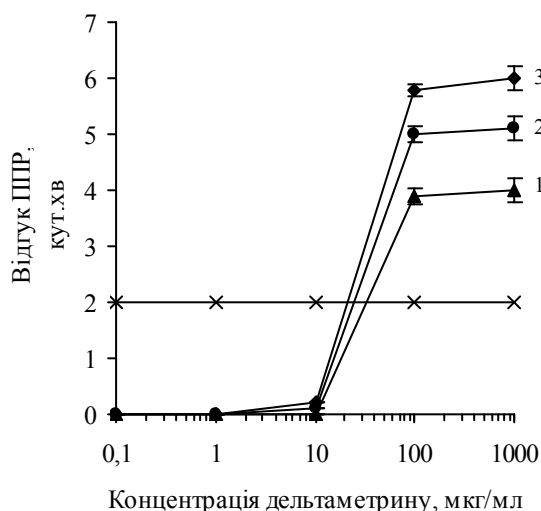


Рис. 7. Сенсограми зв'язування дельтаметрину на поверхні золота покритій каліксаренами 1–3: 1 – $R=C_3H_7$; 2 – $R=C_7H_{15}$; 3 – $R=C_{11}H_{23}$

Межа виявлення визначалася тією концентрацією токсину, при якій величина відгуку в 3 рази перевищувала рівень шумів нашої системи. Таким чином для нашого випадку вірогідний результат отримували тоді, коли величина відгуку була не меншою 2 кут.хв.

На рис. 8 показано відгуки біосенсора, вкритого калікс[4]резорцинолареном 1 при іммобілізації на чутливій поверхні трансдуктора пестицидів у концентрації 100 мкг/мл.

Збільшення концентрації пестицидів вище 100–500 мкг/мл не приводить до значного зростання отриманого сигналу, оскільки відбувається насичен-

ня сенсора, яке зумовлює майже 100 %-не відмивання молекул з поверхні перетворювача. Ми припускаємо, що вільні сайти на адсорбованих молекулах каліксаренів вже відсутні, так як молекули досліджуваних пестицидів мають багатогранну структуру, що обмежує доступність площі на поверхні рецепторів для наступного зв'язування. Крім того, невигідна позиція раніше адсорбованих на поверхні перетворювача молекул пестицидів не дає можливості для упакування їх з вищою густиною і регулярністю.

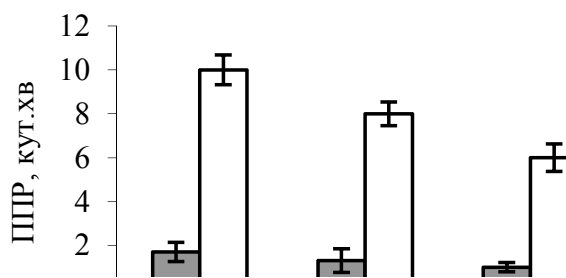


Рис. 8. Відгуки сенсорів, вкритих каліксареном 1 на діазінон (1), хлорпіріфос (2), біфентрин (3) та дельтаметрин (4) при концентрації пестицидів 100 мкг/мл. Високі (світлі) стовпчики – модифікована додекантіолом поверхня; низькі (темні) стовпчики – немодифікована поверхня

Низька молекулярна вага пестицидів і складна молекулярна будова дозволяють визначати їх у дуже вузькому діапазоні концентрацій та з меншою чутливістю порівняно з мікотоксинами. Це свідчить про вибіркочку селективність калікс[4]ре-зорциноларенів до молекул мікотоксинів та пестицидів.

З рис. 8 можна побачити також, що обробка поверхні додекантіолом для всіх досліджуваних пестицидів дає значне збільшення відгуку сенсора. Відсутність алкантіолу на чутливій поверхні зумовлює відгук менший, ніж межа визначення (2 кут. хв), тому застосування додекантіолу є обов'язковим.

Відмінності у зв'язуванні СП та ФОС можна пояснити також різною компліментарністю розмірів та архітектури аналіту до молекулярної порожнини каліксарену, а також різною силою фізичних взаємодій між ними.

Слабке зв'язування пестицидів, з використанням в досліді каліксаренами, може бути зумовлене тим, що структура самого каліксарену не утворює необхідної молекулярної порожнини для утримання цих молекул за типом „гість-господар”; утворення комплексів обмежене невідповідністю функціональних груп каліксаренів, необхідних для зв'язування з цими пестицидами.

Наступні дослідження проведені із застосуванням калікс[4]резорциноларену 4, на верхньому вінці якого є чотири додаткових гідроксильних групи.

Збільшення кількості гідроксильних груп на молекулярній платформі калікс[4]резорциноларену від 8 (сполука 3) до 12 (сполука 4) дозволяє ефективніше зв'язувати молекули пестицидів у стійкі комплекси типу “гість-господар”. Значення зміни

відгуків, отриманих для всіх досліджуваних токсичних речовин при використанні каліксарену **4** незначно відрізняються від таких каліксарену **1** (рисунок не представлено).

Отриманий результат свідчить, що функціоналізація верхнього вінця макроциклу тетраалкілкіалікс[4]резорциноларенів додатковими гідроксильними групами є перспективним підходом для підвищення чутливості визначення пестицидів методом поверхневого плазмонного резонансу.

5. Висновки

Біосенсор ППР для визначення і пестицидів в змозі сьогодні забезпечити суттєву і корисну інформацію про потенційно небезпечні аналіти в різному форматі аналізу. Це і використання відповідних ферментів, специфічних антитіл і застосованих нами штучних рецепторів. Здатність каліксаренових сполук до селективного зв'язування окремих хімікалій може бути використана для перевірки їхньої потенційної екологічної токсичності. Перевага каліксаренових рецепторів полягає в тому, що вони є достатньо простими для виконання досліджень, та дозволяють ідентифікувати різні мікотоксини і пестициди з індивідуальною чутливістю при функціоналізації верхнього вінця макроциклу відповідними рецепторними групами, здатними забезпечити тісний і тривалий контакт у взаємовідносинах „господар – гість”.

В роботі показано принципову можливість детектування діазінону, хлорпірофосу, біфентрину та дельтаметрину методом поверхневого плазмонного резонансу за умов використання каліксаренових модифікаторів поверхні перетворювача. Такий метод є експресним (тривалість 10 хв) та дає можливість селективного виявлення окремих інсектицидів в розчинах.

Література

1. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. Офіційне видання [Текст] / К. : Юнівест Медіа, 2010. – 544 с.
2. Жминько, П. Г. Нарушение функции системы иммунитета под воздействием пестицидов и некоторые задачи иммунотоксикологии на современном этапе [Текст] / П. Г. Жминько // Современные проблемы токсикологии. – 1998. – Вып. 2. – С. 28–32.
3. Wolansky, M. J. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review [Text] / M. J. Wolansky, J. A. Harrill // Neurotoxicology and Teratology. – 2008. – Vol. 30, Issue 2. – P. 55–78. doi: 10.1016/j.ntt.2007.10.005
4. Ray David, E. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides / E. Ray David, R. Fry Jeffrey // Pharmacology & Therapeutics. – 2006. – Vol. 111, № 1. – P. 174–193.
5. Heudorf, U. Metabolites of Pyrethroid Insecticides in Urine Specimens: Current Exposure in an Urban Population in Germany [Text] / U. Heudorf, J. Angerer // Environ Health Perspectives. – 2001. – Vol. 109, Issue 3. – P. 213–217. doi: 10.1289/ehp.01109213
6. Mohamed, R. The pivotal role of mass spectrometry in determining the presence of chemical contaminants in food raw materials [Text] / R. Mohamed, P. A. Guy // Mass Spectrometry Reviews. – 2011. – Vol. 30, Issue 6. – P. 1073–1095. doi: 10.1002/mas.20314

7. Chang, A. K. Immunoassays and Biosensors for Monitoring Environmental and Human Exposure to Pyrethroid Insecticides [Text] / A. K. Chang, H.-J. Kim, R. Mark, S. J. Gee, B. D. Hammock // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 59, Issue 7. – P. 2792–2802. doi: 10.1021/jf1033569

8. Gamal, A. E. Electrochemical Biosensors for the detection of pesticides [Text] / A. E. Gamal, A. Mostafa // The Open Electrochemistry Journal. – 2010. – Vol. 2, Issue 1. – P. 22–42. doi: 10.2174/1876505x01002010022

9. Гойстер, О. С. Застосування сучасних біосенсорних технологій в екоотоксикологічному моніторингу деяких токсикантів природного (мікотоксини) та антропогенного (пестициди) походження. Частина II. Пестициди (Огляд) [Текст] / О. С. Гойстер, С. В. Дзядевич, О. Г. Мінченко // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2013. – Т. 10, № 4. – С. 40–59.

10. He, J. Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid [Text] / J. He, Y. Liu, M. Fan, X. Liu. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 59, Issue 5. – P. 1582–1586. doi: 10.1021/jf104189g

11. Гойстер, О. С. Вивчення взаємодії мікотоксинів з тетраалкілкіалікс[4]резорциноларенами методом поверхневого плазмонного резонансу [Текст] / О. С. Гойстер, Р. В. Родік, В. І. Кальченко, С. В. Дзядевич, В. І. Назаренко, О. Г. Мінченко // Совр. пробл. токсикологии. – 2009. – № 1. – С. 61–67.

12. Tunstsd, L. M. Host-guest complexation. 48. Octol building blocks for cavitands and carcerands [Text] / L. M. Tunstsd, J. A. Tucker, E. Dalcanale // The Journal of Organic Chemistry. – 1989. – Vol. 54, Issue 6. – P. 1305–1312. doi: 10.1021/jo00267a015

13. Chen, H. Comparative of Protein immobilisation properties on calixarene monolayers [Text] / H. Chen, M. Lee, S. Choi // Sensors. – 2007. – Vol. 7, Issue 7. – P. 1091–1107. doi: 10.3390/s7071091

References

1. The list of pesticides and the agrochemicals allowed using in Ukraine. The official publication (2010). Kiev: Yniwest Media, 544.
2. Gminko, P. G. (1998). Narushenie of function of system of immunity under the influence of pesticides and some problems immunotoxicologii at the present stage. Modern problems of toxicology, 2, 28–32.
3. Wolansky, M. J., Harrill, J. A. (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. Neurotoxicology and Teratology, 30 (2), 55–78. doi: 10.1016/j.ntt.2007.10.005
4. Ray David, E., Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. Pharmacology & Therapeutics, 111 (1), 174–193.
5. Heudorf, U. Angerer, J. (2001). Metabolites of Pyrethroid Insecticides in Urine Specimens: Current Exposure in an Urban Population in Germany. Environ Health Perspectives, 109 (3), 213–217. doi: 10.1289/ehp.01109213
6. Mohamed, R., Guy, P. A. (2011). The pivotal role of mass spectrometry in determining the presence of chemical contaminants in food raw materials. Mass Spectrometry Reviews, 30 (6), 1073–1095. doi: 10.1002/mas.20314
7. Ahn, K. C., Kim, H.-J., McCoy, M. R., Gee, S. J., Hammock, B. D. (2011). Immunoassays and Biosensors for Monitoring Environmental and Human Exposure to Pyrethroid Insecticides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (7), 2792–2802. doi:10.1021/jf1033569
8. Gamal, A. E. Mustafa, A. (2010). Electrochemical Biosensors for the detection of pesticides. The

Open Electrochemistry Journal, 2 (1), 22–42. doi: 10.2174/1876505x01002010022

9. Gojster, O. S., Dzyadevych, S. V., Minchenko, O. H. (2013). Application of modern biosensors methods in ecotoxicological monitoring of some toxins of natural (mycotoxins) and antropogenic (Pesticides) origin. Part II. Pesticides. Sensor Electronics and Microsystem Technologies, 10 (4), 40–59.

10. He, J., Liu, Y., Fan, M., Liu, X. (2011). Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (5), 1582–1586. doi: 10.1021/jf104189g

11. Gojster, O. S., Rodik, R.V., Kalchenko, V. I., Dzyadevich, S. V., Nasarenko W. I., Minchenko, A. G. (2009). Investigation of interaction between mycotoxins and tetraalkylcalix[4]resorcinolarenes by surface plasmon resonance Modern problems of toxicology, 1, 61–67.

12. Tunstsd, L. M., Tucker, J. A., Dalcanale, E. (1989). Host-guest complexation. 48. Octol building blocks for cavitands and carcerands. The Journal of Organic Chemistry, 54 (6), 1305–1312. doi: 10.1021/jo00267a015

13. Chen, H., Lee, M., Choi, S. (2007). Comparative of Protein immobilisation properties on calixarene monolayers. Sensors, 7 (7), 1091–1107. doi: 10.3390/s7071091

*Рекомендовано до публікації д-р біол наук Дзядевичем С. В.
Дата надходження рукопису 25.12.2014*

Гойстер Оксана Станіславівна, кандидат біологічних наук, провідний інженер, відділ молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В.Палладіна, вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Україна, 01601
E-mail: gojsterO@ukr.net