

БІОСЕНСОРНИЙ АНАЛІЗ ГЛІКОАЛКАЛОЇДІВ У КАРТОПЛІ

В. М. Архипова^{1, 2}

М. К. Шелякіна^{1, 3}

О. Л. Кукла²

О. А. Назаренко¹

А. А. Осипчук⁴

Г. В. Єльська¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України, Київ

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

⁴ Інститут картоплярства ААН України, смт Немішаєве Бородянського р-ну Київської обл.

E-mail: avalka@yahoo.com

Для проведення лабораторних досліджень та масового скринінгу складу глікоалкалоїдів у картоплі запропоновано 2 протоколи проведення аналізу за допомогою потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів й ензиму бутирилхолінестерази. Підібрано оптимальну процедуру підготовки проб картоплі, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту глікоалкалоїдів, вивчено вплив умов зберігання досліджуваних проб на величину відгуку сенсора. Проведено кількісний аналіз складу глікоалкалоїдів у 24 сортах картоплі врожаю 2007 р. та 30 сортів врожаю 2008 р., вирощених на експериментальній базі Інституту картоплярства Академії аграрних наук України.

Ключові слова: глікоалкалоїди, біосенсор, бутирилхолінестераза, рН-чутливий польовий транзистор, картопля.

Культивована картопля є однією з основних сільськогосподарських культур, яку щодня споживають мільйони людей різних верств населення. Картоплю вирощують майже у 80% усіх країн, і її світове виробництво щорічно сягає 350 млн. т, поступаючись за цим показником тільки зерновим, кукурудзі та рису [1]. Використання картоплі як сировини для отримання крохмалю розширюється завдяки успіхам у селекціонуванні сортів, стійких до хвороб і дії комах. Утім, якщо йдеться про картоплю як продукт харчування, можливо, важливішим є виведення сортів зі зниженням вмістом токсичних натуральних стероїдних речовин у бульбах — глікоалкалоїдів, через які картопля набуває гіркої присмаку.

Уперше глікоалкалоїди було ідентифіковано в картоплі ще в XIX ст. М. Баупом [2], інформація ж про їхні властивості з точки зору хімії, біохімії, фізіології, токсикології і фармакокінетики стала відома пізніше [3, 4]. Початковий рівень загального вмісту алкалоїдів у картоплі є генетично зумовленим і суттєво відрізняється залежно від сортів картоплі та місцевості, де її вирощують. Є підстави вважати, що глікоалкалоїди причетні до деяких механізмів опірності картоплі до хвороб і дії комах. Комерційні сорти картоплі, які споживають в Європі і США,

містять від 20 до 150 мг глікоалкалоїдів на 1 кг неочищених бульб. Різноманітні чинники — такі як річні й регіональні кліматичні варіації, дія світла (зелена картопля) або механічні пошкодження під час збирання і зберігання — можуть спричиняти суттєве підвищення первинної концентрації глікоалкалоїдів [3, 5].

Розроблені на сьогодні методи для визначення загального вмісту глікоалкалоїдів базуються на використанні колориметрії [6], високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [7–9], тонкошарової хроматографії [10], газової хроматографії — мас-спектрометрії [11–13], радіоімунологічного аналізу [14] та твердофазового імуноензимного аналізу (ELISA) [8, 15–19]. Кожен метод має свої переваги та обмеження. Основні недоліки більшості методів — довготривалість та складна методика підготовки проб, яка може призвести до суттєвого заниження результатів аналізу. Крім того, усі ці методи відносно дорогі.

Зараз докладають багато зусиль щодо оптимізації та модифікації існуючих методів аналізу глікоалкалоїдів. Однак і досі не створено простого, дешевого методу, який би мав високу чутливість, а отримана інформація легко б розшифровувалася. Тому швидкий, простий і точний аналіз глікоалкалоїдів за допомогою біосенсорних при-

ладів, які дедалі активніше використовують в аналітичній практиці, у недалекому майбутньому може скласти конкуренцію традиційним методам аналізу.

Для визначення загального складу глікоалкалоїдів раніше нами було розроблено лабораторний прототип біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) [20, 21]. Метою цієї роботи було розроблення методики підготовки проб та вимірювальних протоколів для аналізу глікоалкалоїдів у реальних зразках картоплі за допомогою створених портативних приладів на основі рН-ПТ біосенсорів.

Матеріали і методи

Матеріали. У роботі використовували бутирилхолінестеразу (БуХЕ) із сироватки крові коня з активністю 20 од. акт./мг протеїну фірми Sigma-Aldrich (Німеччина); сироватковий альбумін бика (БСА) — Boehringer Mannheim (Франція); 25%-й розчин глутарового альдегіду (ГА) — Merck (Німеччина); бутирилхолін хлорид (БуХ), α -чаконін (95% -ї чистоти) та α -соланін (95% -ї чистоти) з паростків картоплі — Sigma-Aldrich (Німеччина). Усі інші реактиви, як вітчизняного, так й імпортного виробництва, були кваліфікації «ос. ч.» і «х. ч.».

Конструкція потенціометричних перетворювачів та приладів.

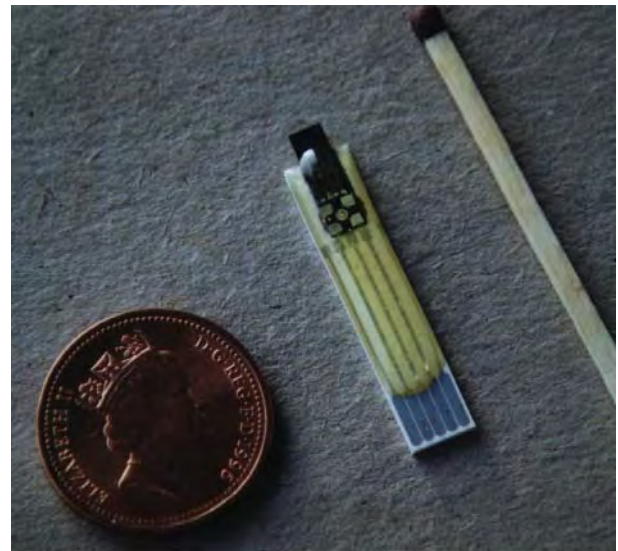
У роботі використовували потенціометричні датчики на основі рН-чутливих польових транзисторів двох типів.

1. Сенсорні чипи з диференційною парою *n*-каналних транзисторів на одному кристалі розміром 3 мм × 10 мм на основі рН-чутливих польових транзисторів виготовили за стандартною кремнієвою технологією в Інституті «Мікроприлад» (Київ, Україна) [22] (рис. 1, А). Іон-селективні властивості транзистора були зумовлені шаром Si₃N₄, нанесеного на його підзатворну ділянку. рН-чутливість приладу становила близько 50 мВ/рН, що забезпечувало достатню чутливість перетворювача для реєстрації змін рН у мембрані, які відбуваються у процесі ензиматичної реакції.

Вимірювання проводили за допомогою портативного приладу, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України (рис. 1, Б). Прилад працює за принципом вимірювання поверхневого потенціалу затвору транзисторів за схемою стеження з від'ємним зворотним зв'язком, що підтримує струм каналу польового транзистора

постійним на рівні 0,3 мА за постійної напруги сток-виток близько 2 В. Вихідний сигнал при цьому відповідає потенціалу на затворі. Прилад забезпечує можливість роботи як у диференційному режимі (з підсиленням різницевого сигналу в 10 чи 100 разів), так і в режимі моніторингу відгуків кожного з окремих двох каналів. Поточна інформація відображується на цифровому індикаторі та може бути зчитана на комп'ютер. На випадок використання транзисторів з різними електричними параметрами в приладі передбачена можливість роботи за різної напруги сток-виток (від 0,5 до 3,0 В) та різної сили струму в каналі (від 20 до 500 мкА). Для цього прилад забезпечено засобами внутрішнього контролю та налаштування цих параметрів.

2. Сенсорні чипи з диференційною парою *p*-каналних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8 × 8 мм (рис. 2, А).



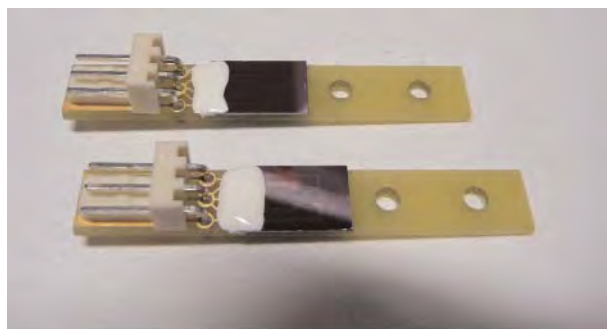
А



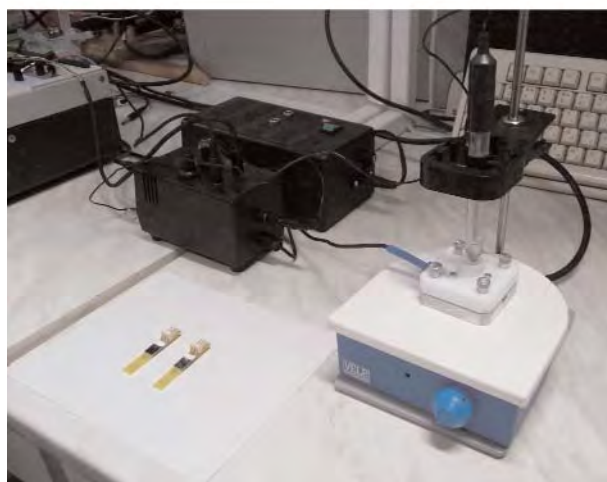
Б

Рис. 1. Загальний вигляд рН-чутливих польових транзисторів, виготовлених в Інституті «Мікроприлад» (А) та портативного приладу для проведення вимірювань, виготовленого в Інституті напівпровідників (Б)

Кристал включав два ідентичних транзистори, розділених захисною n^+ -ділянкою завширшки 50 мкм з контактом до підкладки, p^+ -дифузійні шини, виведені на край чипа з контактами до стоку і витоків, вивід до вбудованого мікроелектроду порівняння, а також два тестових МДН-транзистори з металевим затвором, що призначені для перевірки електричних параметрів виготовлених кристалів. Іон-селективні властивості транзистора зумовлені підзатворним діелектричним шаром, що складається з термічно окисненої плівки SiO_2 завтовшки 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 завтовшки 70 нм. Вимірювання проводили за допомогою портативного приладу, що працює за схемою прямого вимірювання струму в каналі ПТ з активним навантаженням. Чутливість приладу становила близько 25 мкА/рН, що відповідало умовній рН-чутливості близько 80 мВ/рН. Прилад та сенсорні кристали було розроблено в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України (рис. 2, Б) [23].



А



Б

Рис. 2. Загальний вигляд рН-чутливих польових транзисторів (А) та портативного приладу для проведення вимірювань з ними (Б), виготовлених в Інституті напівпровідників

Виготовлення біоселективних мембран.

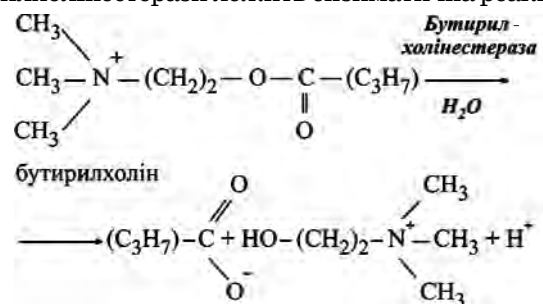
Для виготовлення біоматриць за основу було взято метод іммобілізації ензимів за допомогою глутарового альдегіду [20, 21]. Для створення сенсорів готували розчини БуХЕ та БСА у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, з кінцевою концентрацією 50 мг/мл, і змішували їх у співвідношенні 1:1. До суміші ензим — БСА додавали гліцерол до кінцевої концентрації 10% для стабілізації ензиму під час іммобілізації та передчасного висихання розчину, нанесеного на поверхню перетворювачів. Краплю суміші ензим-БСА (ензимна мембрана) наносили на одну частину поверхні перетворювача, на іншу — розчин БСА (100 мг/мл) без ензиму (референтна мембрана). Для полімеризації мембран датчики вміщували в атмосферу насичених парів глутарового альдегіду в ексикаторі на 20–30 хв. Після полімеризації датчики висушували на повітрі та відмивали від залишків глутарового альдегіду в буферному розчині протягом 10–15 хв.

Аналіз складу глікоалкалоїдів. Картоплю *Solanum tuberosum L.* різних сортів було вирощено на експериментальній базі Інституту картоплярства Академії аграрних наук України. Для аналізу використовували 24 сорти картоплі врожаю 2007 р. та 30 сортів врожаю 2008 р. Зібрані бульби (по 3–5 штук) мили вручну в проточній воді, гомогенізували для отримання соку, потім додавали оцтову кислоту до кінцевої концентрації 5 мМ для кращої екстракції глікоалкалоїдів із бульб.

Для визначення рівня інгібування ензиму використовували таку процедуру вимірювань: в експериментальну комірку спочатку вносили субстрат та вимірювали сигнал, який приймали за умовну одиницю ензиматичної активності. Після стабілізації рівня сигналу вносили певну кількість картопляного соку та оцінювали ефект інгібування. Співвідношення сигналу сенсора на додавання субстрату до та після внесення в комірку досліджуваного зразка характеризувало рівень інгібування біоселективного елемента.

Результати та обговорення

В основі роботи біосенсорів за участю бутирилхолінестерази лежить ензиматична реакція:



У процесі цієї реакції генеруються протони, що призводить до зміни рН усередині ензимної мембрани, що можна зареєструвати за допомогою потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів. Після додавання в розчин зразка з глікоалкалоїдами відбувається зворотне інгібування ензиму і кількість протонів, що генерується в ході ензиматичної реакції, зменшується.

Для проведення аналізу складу глікоалкалоїдів у картоплі було запропоновано два протоколи проведення вимірювань. У першому варіанті ступінь інактивації ензиму (і, відповідно, концентрації глікоалкалоїду в пробі) визначали таким чином (рис. 3).

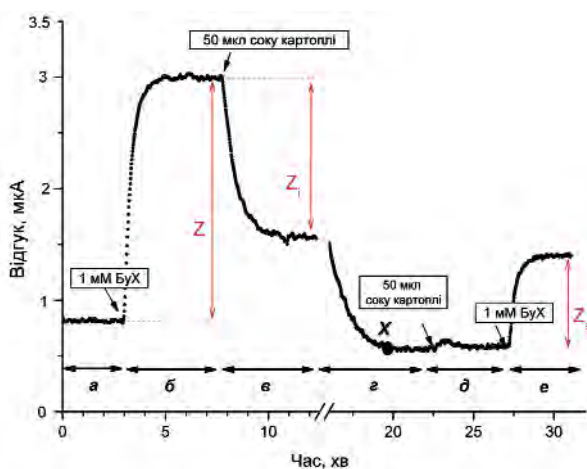


Рис. 3. Сигнал біосенсора та його відгук на внесення в комірку БуХ та зразка соку картоплі. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5

1. Сенсор занурювали в 5 мМ калій-фосфатний буферний розчин, рН 7,5, та реєстрували вихідний сигнал (базова лінія, ділянка а).

2. Отримували відгук на 1 мМ субстрату бутирилхолінхлорид, умовно позначений рівнем Z (ділянка б).

3. Після стабілізації відгуку на субстрат додавали 50 мкл соку картоплі та отримували зменшення сигналу, що відповідає складу глікоалкалоїдів у зразку, — рівень Z_i (ділянка в).

4. Співвідношення величини сигналу на додавання досліджуваної проби та сигналу на додавання субстрату — Z_i/Z — відповідає рівню інгібування селективного елемента картопляним соком.

5. Сенсор відмивали у буферному розчині від залишків субстрату та інгібітора до рівня базової лінії (ділянка г).

Наступні вимірювання проводили починаючи з п. 2, змінюючи об'єм чи номер досліджуваного зразка.

У другому варіанті порядок вимірювань був дещо іншим.

1. Сенсор занурювали в 5 мМ буферний розчин та реєстрували вихідний сигнал (базова лінія, ділянка а).

2. Отримували відгук на 1 мМ субстрату бутирилхолінхлорид — Z (ділянка б).

3. Відмивали сенсор у буферному розчині від залишків субстрату до рівня базової лінії (ділянка г).

4. Додавали 50 мкл соку картоплі та витримували в комірці 1–2 хв (ділянка д).

5. Після стабілізації базової лінії додавали 1 мМ субстрату і отримували відгук, що відповідає залишковій активності робочого ензиму — Z_s (ділянка е).

Рівень інгібування визначали за співвідношенням відгуків на субстрат у присутності зразка і без нього $(Z-Z_s)/Z$.

Сенсор відмивали у буферному розчині від залишків субстрату та інгібітора до рівня базової лінії.

Наступні вимірювання проводили починаючи з п. 4, змінюючи об'єм чи номер досліджуваного зразка.

Кінцевий результат інгібування збігається для обох випадків, але в разі використання другого методу час аналізу зменшується практично вдвічі, оскільки інактивація бутирилхолінестерази глікоалкалоїдами не залежить від часу інгібування, що було показано раніше [20].

Перша процедура передбачає довший, але ретельніший аналіз, адже щоразу з отриманням відгуку на субстрат відбувається контроль функціонування ензиматичної мембрани та біосенсора в цілому, а також його підкалібрування. Друга схема вимірювань дозволяє провести моніторинг низки зразків підряд, періодично виконуючи контрольні вимірювання, що значно прискорює аналіз за необхідності масового скринінгу. Для лабораторних цілей використовували перший протокол вимірювань, тому що він дає більш точний результат за рахунок постійного підкалібрування сенсора.

Стандартна процедура аналізу глікоалкалоїдів за допомогою традиційних методів складається з трьох етапів: (1) екстракція всіх компонентів, що становлять інтерес; (2) вилучення в разі потреби речовин, що заважають аналізу; (3) визначення концентрації глікоалкалоїдів.

У літературі описано понад 20 різних типів розчинників, які використовують для екстракції глікоалкалоїдів, наприклад, етанол [24], 5%-на оцтова кислота [25], суміш метанолу з оцтовою кислотою та водою

(94:1:6) [26], суміш метанолу з хлороформом (2:1) [27] тощо. Зразок з глікоалкалоїдами очищують осадженням за допомогою гідроксиду амонію [28], екстракцією за допомогою водних розчинів Na_2SO_4 [27] або водонасиченого бутанолу [29], чи з використанням хроматографічного C_{18} -іонообмінного картриджа [30]. Можливе також комбінування цих методів. Після такої складної підготовки зразків, яка триває майже добу, пробу можна аналізувати стандартними методами, а саме високоефективною рідинною хроматографією чи тонкошаровою хроматографією [4].

Було проведено серію експериментів із застосуванням різних варіантів попередньої підготовки зразків картоплі для наступного її аналізу за допомогою біосенсора. Досліджували рівень інгібування БуХЕ соком картоплі сорту Промінь, додаючи його у вимірювальну комірку без додаткових маніпуляцій та вдаючись до центрифугування зразка на різних швидкостях упродовж різного часу. Також досліджували вплив оцтової кислоти на величину відгуку, тому що вона є часто вживаним розчинником для глікоалкалоїдів та у великих кількостях використовується для їх екстракції з бульб картоплі у процесі підготовки проб для аналізу традиційними методами. Під час проведених експериментів було підібрано концентрацію оцтової кислоти, яка не впливає на відгук сенсора, але може сприяти кращій екстракції глікоалкалоїдів. Відсутність такого впливу було доведено експериментальним шляхом. З додаванням у робочу комірку різних аліквот розчину 5 мМ оцтової кислоти не спостерігалось жодних змін як у базовому сигналі, так й у відгуках сенсора. Центрифугування дещо зменшує інгібіторний ефект соку картоплі, оскільки частина неконтрольованої кількості глікоалкалоїдів залишається в осаді (рис. 4). Додавання оцтової кислоти стабілізує відгуки сенсора на додавання досліджуваної проби за рахунок кращої екстракції глікоалкалоїдів, при цьому центрифугування дозволяє уникнути можливого впливу на мембрану великих механічних частин картоплі, крохмалю тощо. У подальших вимірюваннях під час підготовки соку до аналізу ми додавали в пробу оцтову кислоту до кінцевої концентрації 5 мМ та центрифугували її при 10 000 об/хв. протягом 10 хв (на діаграмі відповідає стовпчику 2, Б). Однак у разі запровадження біосенсорів для масового скринінгу глікоалкалоїдів у картоплі жодної потреби у попередній обробці зразків немає.

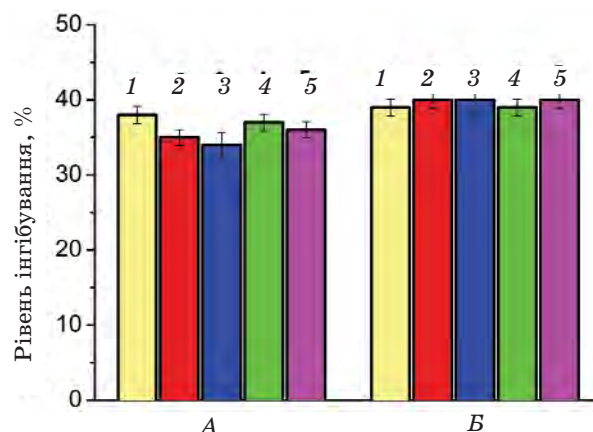


Рис. 4. Інгібування БуХЕ зразками соку картоплі без (А) та з додаванням (Б) оцтової кислоти до кінцевої концентрації 5 мМ.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ. Свіжий сік (1), сік після центрифугування: 10 хв при 10 000 об/хв (2), 20 хв при 10 000 об/хв (3), 10 хв при 5 000 об/хв (4), 10 хв при 2 000 об/хв (5)

Відомо, що генетично зумовлений склад глікоалкалоїдів може збільшуватись під час зберігання, транспортування та в разі механічних пошкоджень зібраного врожаю. З огляду на це відпрацювання методики аналізу було важливо дослідити, чи впливають ці чинники на весь врожай у цілому, чи по-різному на окремі бульби. Досліджували рівень інгібування БуХЕ соком, отриманим з різних бульб одного сорту картоплі (рис. 5). Було встановлено, що в середньому вміст глікоалкалоїдів у бульбах одного сорту збігається, але інколи буває випадіння, коли концентрація алкалоїдів збільшується в 1,5–2 рази, що зумовлено, найімовірніше, зовнішніми факторами. Тому з метою мінімізації спричиненого ними експериментального розкиду відгуків, у подальшому отримуючи сік для аналізу використовували мінімум 5 різних бульб картоплі одного сорту.

Також було досліджено вплив на величину відгуку процедури очищення бульб картоплі від шкірки під час підготовки її до аналізу (рис. 6). Встановлено, що очищення картоплі призводить до практично двократного зменшення рівня інгібування БуХЕ, що добре корелює з даними літератури [4] і свідчить про те, що вживаючи картоплю у їжу потрібно добре очищати її від шкірки. Окрім того, було також показано різницю впливу чищення бульб на величину інгібування для різних сортів картоплі. У сортах картоплі з високим вмістом глікоалкалоїдів вплив очищення бульб дещо менший порівняно із сортами з малим вмістом гліко-

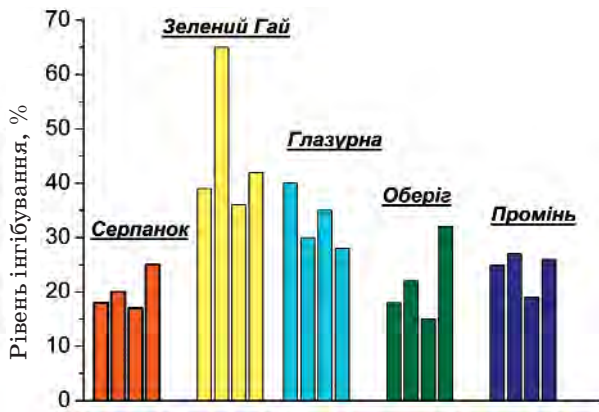


Рис. 5. Рівень інгібування БуХЕ соком, що отриманий з окремих бульб різних сортів картоплі.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ

алкалоїдів. Однак для масового скринінгу зручніше проводити аналіз без додаткових маніпуляцій очищення бульб, враховуючи, однак, те, що результат буде завищено приблизно вдвічі.



Рис. 6. Рівень інгібування БуХЕ соком картоплі різних сортів у разі використання бульб після очищення (1) та зі шкіркою (2).

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ

Наступним етапом роботи було дослідження зміни відгуку сенсора в умовах зберігання підготовлених для аналізу зразків соків. Порівнювали ступінь інгібування БуХЕ та його зміну протягом певного часу за різних умов зберігання соків для трьох різних сортів картоплі. Підготовлені проби зберігали щільно закритими при кімнатній температурі, у холодильнику (+4° С) та із заморожуванням проби до -18° С.

На 2-3-й день зберігання проби при кімнатній температурі відбувається суттєве

збільшення ступеня інгібування сенсора (рис. 7). Зберігання в холодильнику та заморожування соків таким зростанням токсичного ефекту не супроводжується. Це дозволяє зробити висновок про те, що підсилення інгібування відбувається за рахунок утворення в зразку соку додаткових токсичних речовин у результаті процесів бродіння та гноїння, які відбуваються при кімнатній температурі. У разі зберігання проб при температурі +4° С деяке збільшення ступеня інгібування відбувається через 5-7 днів. Заморожування соків уможливує довготривале зберігання їх без суттєвих змін токсичності зразків. Водночас при проведенні аналізу упродовж доби суттєвих змін у токсичності соків картоплі не спостерігалось незалежно як від сорту картоплі, так й умов його зберігання (рис. 8).

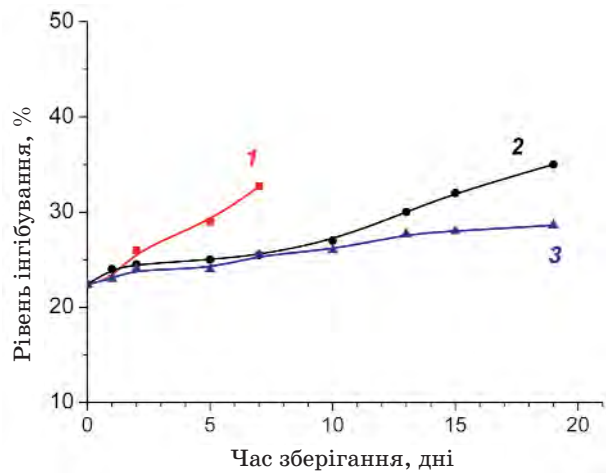


Рис. 7. Залежність рівня інгібування БуХЕ соком картоплі під час зберігання його при кімнатній температурі (1), температурі +4° С (2) та -18° С (3) на прикладі сорту Явір

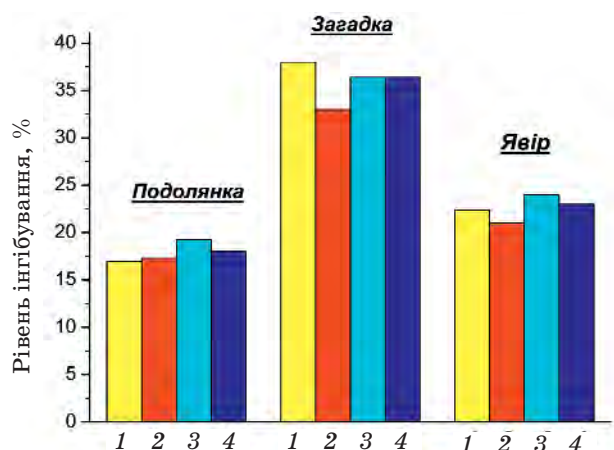


Рис. 8. Рівень інгібування БуХЕ соком картоплі під час зберігання його в різних умовах упродовж доби:

1 — свіжий сік; 2 — зберігання при кімнатній температурі; 3 — зберігання при t = +4° С; 4 — зберігання при t = -18° С

На рис. 9 зображено калібрувальні криві для визначення глікоалкалоїдів за різних співвідношень α -соланіну та α -чаконіну. Як відомо, α -соланін і α -чаконін становлять 95% загального вмісту глікоалкалоїдів у картоплі, інші види глікоалкалоїдів наявні лише в слідових концентраціях. З другого боку, недоцільно розглядати токсичність окремих глікоалкалоїдів, оскільки в реальній картоплі вони існують у комбінації. Організм людини піддається спільній дії всіх глікоалкалоїдів, тому необхідною є оцінка їх загальної концентрації у зразках картоплі. Найчастіше співвідношення між α -соланіном і α -чаконіном у картоплі 6:4, хоча можливі також й інші варіанти (5:5 та 7:3). Оскільки наведені на рисунку криві відрізняються неістотно, співвідношення 6:4, що здебільшого трапляється в природі, використовували у подальших експериментах для калібрування сенсора та визначення загальної концентрації глікоалкалоїдів у картопляному соку.

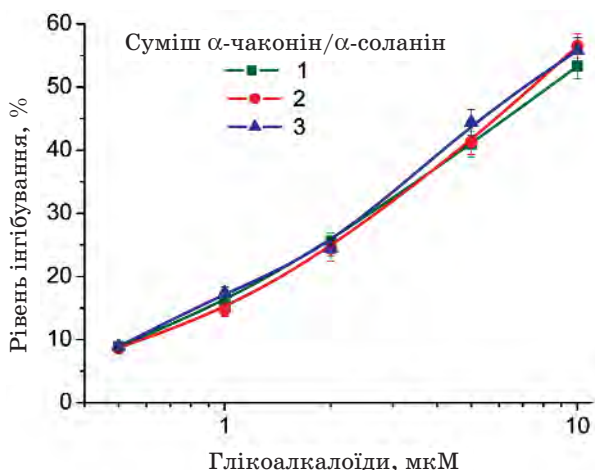


Рис. 9. Калібрувальні криві для визначення глікоалкалоїдів за різних співвідношень α -соланіну та α -чаконіну: 6:4 (1), 5:5 (2), 7:3 (3).

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ

Заключним етапом роботи було визначення складу глікоалкалоїдів у картоплі 24 сортів урожаю 2007 р. та 30 сортів — 2008 р., вирощених в Інституті картоплярства ААН України. Результати біосенсорного визначення концентрації глікоалкалоїдів у зазначених зразках подано в табл. 1. Окрім того, раніше було показано достовірну кореляцію результатів, одержаних за допомогою біосенсора та традиційних методик [21]. Також аналізували інші властивості картоплі, а саме: врожайність, крохмальність, час визрівання.

Таким чином, у результаті виконання роботи за допомогою біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та ензиму бутирилхолінестерази здійснено кількісний аналіз глікоалкалоїдів у бульбах понад 30 різних сортів картоплі. Підібрано оптимальну процедуру підготовки проб картоплі, відпрацьовано методики та протоколи вимірювання вмісту глікоалкалоїдів. Вивчено вплив умов зберігання досліджуваних проб. Показано, що незважаючи на всі зовнішні та внутрішні чинники, головним фактором впливу на вміст глікоалкалоїдів у картоплі є генетично визначена кількість їх у кожному сорті.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб» і проекту УНТЦ 4591.



Таблиця 1. Значення вивчених показників, отримані за допомогою біосенсора, для різних сортів картоплі

	Сорт	Концентрація глікоалкалоїдів, мг/кг картоплі		Визрівання	Крохмальність, %	Врожайність, ц/га
		Врожай 2007 р.	Врожай 2008 р.			
1	Завія	–	120	II	–	–
2	Тирас	–	126	I	0	–
3	Забава	230	150	II	15	430
4	Звіздаль	–	150	III	–	–
5	Подольнка	220	160	I	14,5	430
6	Водограй	–	175	II	–	–
7	Оберіг	230	180	II	14	480
8	Калинівська	–	180	III	–	–
9	Дорогінь	–	200	IV	–	–
10	Поліська Ювілейна	–	206	IV	–	–
11	Дніпрянка	200	215	I	14,5	430
12	Левада	280	230	II	17,5	440
13	Луговська	–	230	III	–	–
14	Явір	180	238	III	17,5	475
15	Загадка	315	270	I	13,5	410
16	Серпанок	275	290	I	13,5	460
17	Слов'янка	265	300	III	13,5	500
18	Поліське джерело	350	300	IV	16,5	450
19	Червона Рута	370	330	IV	19,5	455
20	Промінь	280	335	IV	15,5	465
21	Скарбниця	440	400	I	14	455
22	Глазурна	465	430	I	14,5	465
23	Довіра	370	450	III	17	440
24	Повінь	410	450	I	15,5	455
25	Щедрик	–	450	I	–	–
26	Ракурс	–	480	IV	–	–
27	Зелений гай	530	500	II	14	460
28	Світанок київський	510	650	II	19	420
29	Мандрівниця	715	670	III	17	440
30	Билина	1 400	1 000	III	15,5	445
31	Святкова	270	–	I	14,5	465
32	Вернісаж	225	–	III	15	450

Примітка: I — ранній; II — середньоранній; III — середньозрілий; IV — середньопізній сорти.



ЛІТЕРАТУРА

1. *FAO Production Yearbook*, V. 46, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1992.
2. *Baup M.* Extrait d'une lettre sur plusieurs nouvelles substances // *Ann. Chim. Phys.* — 1826. — V. 31. — P. 108–109.
3. *Jadhav J. S., Sharma R. D., Salunkhe D. K.* Naturally occurring toxic alkaloids in food // *Crit. Rev. Toxicol.* — 1981. — V. 9. — P. 21–104.
4. *Friedman M., McDonald G.* Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1997. — V. 16. — P. 55–132.
5. *Johnson H., Hellenas K.-E.* Glycoalkaloids in Swedish potatoes // *Var Foda.* — 1983. — V. 12. — P. 299–314.
6. *Clement E., Verbist J. F.* Determination of solanine in L. tubers: comparative study of 9 colorimetric methods // *Lebensm-Wissen U. Technol.* — 1980. — V. 13, N 6. — P. 202–206.
7. *Jonker H. H., Koops A. J., HoogenDoorn J. C.* A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC // *Amer. J. Potato Res.* — 1992. — V. 35, N 6. — P. 451–455.
8. *Crabbe P. G., Fryer C.* Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and solasodin by high-pressure liquid chromatography // *J. Chromatogr.* — 1980. — V. 187, N 2. — P. 87–100.
9. *Houben R. J., Brunt K.* Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reverse-phase high-performance liquid chromatography // *Ibid.* — 1994. — V. 661, N 1. — P.169–174.
10. *Ferreira F., Moyna P., Soule S., Vazquez A.* Rapid determination of Solanum alkaloids by thin-layer chromatographic scanning // *Ibid.* — 1993. — V. 653, N6. — P. 380–384.
11. *Chen S., Derrick P. J., Mellon F. A., Price K. R.* Analysis of glycoalkaloids from potato shoots and tomatoes by four-sector tandem mass spectrometry with scanning-array detection: comparison of positive ion and negative ion methods // *Anal. Biochem.* — 1994. — V. 218, N1. — P. 157–169.
12. *Evans S., Buchanan R., Hoffman A. et al.* Structural characterization of a glycoalkaloid at the femtomole level by means of four-sector tandem mass spectrometry and scanning-array detection // *Org. Mass Spectr.* — 1993. — V. 28, N 1. — P. 289–290.
13. *Osman S. F., Johns T. A., Price K. R.* Sisunine, a glycoalkaloid found in hybrids between *Solanum acaule* and *Solanum ajanhuiri* // *Phytochemistry.* — 1986. — V. 25, N 1. — P. 967–968.
14. *Harvey M. H., Morris B. A., McMillan M., Marks V.* Measurement of potato steroidal alkaloids in human serum and saliva by radioimmunoassay // *Human Toxicol.* — 1985. — N 4. — P. 503–512.
15. *Hunter I. R., Walden M. K., Wagner J. R., Heftmann E.* High-pressure liquid chromatography of steroidal alkaloids // *J. Agr. Food Chem.* — 1976. — V. 119, N2. — P. 223–226.
16. *Bushway R. J., Barden E. S., Bushway A. W., Bushway A. A.* High-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids // *J. Chromatogr.* — 1979. — V. 178, N 5. — P. 533–541.
17. *Morris S. C., Lee T. H.* The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*) // *Food Technol. Aust.* — 1984. — V. 36, N 2. — P. 118–124.
18. *Pihak L., Sporns P.* Enzyme Immunoassay for Potato Glycoalkaloids // *J. Agr. and Food Chem.* — 1992. — V. 40, N 2. — P. 2533–2540.
19. *Friedman M.* Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds // *J. Chromatogr. A.* — 2004. — V. 1054, N 1–2. — P. 143–155.
20. *Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. et al.* Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // *Biosens. Bioelectron.* — 2003. — V. 18. — P. 1047–1053.
21. *Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. et al.* Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes // *Sensors Actuators B.* — 2004. — V. 103. — P. 416–422.
22. *Пацковський С. В., Фролов О. В., Шульга О. А. та ін.* Розробка та дослідження рН-чутливих польових транзисторів // *Сенс. мікроелектрон. мікросист. технол.* — 2005. — № 3. — С. 66–73.
23. *Кукла А. Л., Павлюченко А. С., Голтвянський Ю. В., Шишов Ю. М.* Многоэлементные сенсорные массивы на основе интегральных кремниевых ионоселективных полевых транзисторов для систем химического мониторинга // *Оптоэлектр. полупроводн. техн.* — 2007. — Вып.42. — С. 72–79.
24. *D. H. Dabbs, Hilton R. J.* Methods for analysis for solanine in tubers of *Solanum tuberosum* // *Can. J. Technol.* — 1953. — V. 31. — P. 213–220.

25. *Speroni J. J., Pell E. J.* Modified method for tuber glycoalkaloid and leaf glycoalkaloid analysis // *Am. Potato J.* — 1980. — V. 57. — P. 537–542.
26. *Jonker H. H., Koops A. J., HoogenDoorn J. C.* A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC // *Potato Res.* — 1992. — V. 35. — P. 451–455.
27. *Wang S. L., Bedford C. L., Thompson N. R.* Determination of glycoalkaloids in potatoes (*S. tuberosum*) with a bisolvent extraction method // *Am. Potato J.* — 1972. — V. 49. — P. 302–308.
28. *Friedman M., Dao L.* Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products // *J. Agric. Food Chem.* — 1992. — V. 40. — P. 419–423.
29. *Crabbe P. G., Fryer C.* Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and solasodiene by high-pressure liquid chromatography // *J. Chromatogr.* — 1980. — V. 187. — P. 87–100.
30. *Houben R. J., Brunt K.* Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *Ibid.* — 1994. — V. 661. — P. 169–174.

БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛИКОАЛКАЛОИДОВ В КАРТОФЕЛЕ

В. Н. Архипова^{1,2}
М. К. Шелякина^{1,3}
*А. Л. Кукла*²
*Е. А. Назаренко*¹
*А. А. Осипчук*⁴
*А. В. Ельская*¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

² Институт физики полупроводников
им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Киев

³ Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Киев

⁴ Институт картофелеводства ААН Украины,
пгт Немешаево Бородянского р-на
Киевской обл.

E-mail: avalka@yahoo.com

Для проведения массового скрининга содержания гликоалкалоидов в картофеле и лабораторных исследований предложены 2 протокола проведения анализа с помощью потенциометрического энзимного биосенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и энзима бутирилхолинэстеразы. Подобрана оптимальная процедура подготовки проб картофеля, отработаны методики и протоколы измерений состава гликоалкалоидов, исследовано влияние условий хранения исследуемых проб на величину отклика сенсора. Проведен количественный анализ содержания гликоалкалоидов в 24 сортах картофеля урожая 2007 г. и 30 сортах урожая 2008 г., выращенных на экспериментальной базе Института картофелеводства Академии аграрных наук Украины.

Ключевые слова: гликоалкалоиды, биосенсор, бутирилхолинэстераза, рН-чувствительный полевой транзистор, картофель.

BIOSENSOR ANALYSIS OF GLYCOALKALOIDS IN POTATOES

V. M. Arkhylova^{1,2}
M. K. Shelyakina^{1,3}
*O. L. Kukla*²
*O. A. Nazarenko*¹
*A. A. Osypchuk*⁴
*A. V. Elskaya*¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics
of NAS of Ukraine, Kyiv

² V. E. Lashkarev Institute of Semiconductor
Physics of NAS of Ukraine, Kyiv

³ Taras Shevchenko Kiev National University,
Kyiv

⁴ Institute of potatoes of AAS of Ukraine

E-mail: avalka@yahoo.com

Two protocols of analysis by using potentiometric enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors and enzyme butyrylcholinesterase have been proposed for screening of glycoalkaloids in potatoes and laboratory investigations. Optimal procedure for potatoes samples preparation was chosen, methods and protocols of measurements of glycoalkaloids were optimized, and influence of storage conditions of samples for sensors response was investigated. Quantitative analysis of glycoalkaloids contents in 24 potatoes varieties of 2007 and 30 potatoes varieties of 2008 from Institute of Potatoes was conducted.

Key words: glycoalkaloids, biosensor, butyrylcholinesterase, pH-sensitive field-effect transistor, potato.