

Національна академія наук України,
Інститут молекулярної біології і генетики

Національна академія наук України,
Інститут молекулярної біології і генетики,

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЯРИНКА ДАР'Я ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.1+577.15+543.6+544.725

ДИСЕРТАЦІЯ
ОПТИЧНІ БІОСЕНСОРНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРІВ-
БІОМІМЕТИКІВ ТА СМАРТФОНІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ХАРЧОВИХ
МІКОТОКСИНІВ: АФЛАТОКСИНУ В1 ТА ЗЕАРАЛЕНОНУ

091 Біологія та біохімія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____Яринка Д.В.

Науковий керівник Сергєєва Тетяна Анатоліївна, доктор біологічних наук, с.н.с.,
пров.наук.співр.

Київ 2023

АНОТАЦІЯ

Яринка Д.В. Оптичні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків та смартфонів для виявлення харчових мікотоксинів: афлатоксину В1 та зеараленону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія та біохімія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2023.

Щорічно у світі виявляють понаднормові рівні забруднення харчових продуктів мікотоксинами. Крім значних економічних збитків, пов'язаних з втратою врожаю (щорічно через забруднення мікотоксинами втрачається до 25% врожаїв зернових), мікотоксини небезпечні для здоров'я людей та тварин. Згідно з даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) до найнебезпечніших мікотоксинів належать, серед інших, афлатоксин В1 (АФВ1) та зеараленон (ЗОН). Тому, розробка нових підходів для моніторингу та контролю цих мікотоксинів в продуктах харчування – дуже актуальна. Перспективний напрямок таких розробок – створення високоселективних, високостабільних та чутливих біосенсорних систем на основі смартфонів, які, на відміну від традиційних аналітичних методів, будуть недорогими, експресними, зручними та простими у використанні. Зважаючи на це, **мета дисертаційної роботи** – створення оптичних біосенсорних систем на основі смартфонів та полімерів-біоміметиків у формі молекулярно-імпринтованих полімерних мембран для виявлення поширених харчових токсинів (афлатоксину В1 та зеараленону) у продуктах харчування та тваринних кормах.

Полімери-біоміметики у формі молекулярно-імпринтованих полімерних (МІП) мембран запропоновано використати як чутливі елементи біосенсорних систем для визначення АФВ1 та ЗОН. На противагу біологічним молекулам (ферментам, антитілам), полімери-біоміметики – значно стабільніші, процес створення та інтеграції таких елементів у біосенсорний пристрій – нескладний,

при цьому, вони не потребують спеціальних умов зберігання та не втрачають своїх властивостей за умов тривалого зберігання за кімнатної температури. Крім того, за чутливістю та селективністю щодо цільового аналіту, полімери-біоміметики не поступаються природним біомолекулам та можуть генерувати оптичні сенсорні відгуки, які легко реєструються. В основі роботи пропонуваного біосенсорних систем – природня здатність мікотоксинів до флуоресценції. Присутній у аналізованому зразку токсин, який зв'язався з поверхнею МПП мембрани за рахунок утворених в її структурі селективних рецепторних сайтів, можна виявляти після опромінення мембран ультрафіолетовим світлом з певною довжиною хвилі. Це, у свою чергу, ініціюватиме природну флуоресценцію мікотоксинів, інтенсивність якої буде пропорційною концентрації токсинів у зразку. Флуоресцентні біосенсорні сигнали, які генеруються полімерами-біоміметиками у формі мембран, можна реєструвати як за допомогою стандартного лабораторного спектрофлуориметра, так і за допомогою камери смартфона з подальшим аналізом за використання комерційно-доступних програм аналізу цифрових зображень (зокрема програми Spotxel® Reader, 2.1.5 для операційної системи Android 6+). Використання смартфона у ролі реєстратора та аналізатора оптичних сенсорних сигналів дозволить скоротити та спростити процедуру визначення аналіту та може успішно замінити високовартісне лабораторне обладнання. Завдяки цьому, такі методи можна буде використовувати поза межами лабораторій.

На першому етапі роботи, було синтезовано високостабільні чутливі елементи майбутніх біосенсорних систем на основі МПП мембран, які було отримано методом радикальної полімеризації *in situ*, з штучними рецепторними сайтами розпізнавання АФВ1 та ЗОН в їхній структурі та оптимізовано їхній склад. Найкраще розпізнавання АФВ1 виявляли для МПП мембран, синтезованих з використанням акриламідів (АА) як функціонального мономеру, з мономерної суміші із співвідношенням псевдоматриця: АА 1:2. Встановлено, що МПП мембрани, синтезовані із використанням функціональних мономерів 1-аллілпіперазину (1-АЛП) та етиленглікольметакритфосфату (ЕГМФ), з

мономерної суміші із співвідношенням псевдоматриця: ФМ 1:4 та 1:2, відповідно, демонстрували найкращі розпізнавальні властивості щодо ЗОН. Крім того, було досліджено вплив складу аналізованого розчину на здатність синтезованих МІП мембран розпізнавати цільові мікотоксини та визначено оптимальні умови зв'язування аналітів з мікотоксин-селективними рецепторними сайтами. Встановлено, що найвищі показники диференційних сенсорних відгуків АФВ1-чутливих МІП мембран виявляли за рН аналізованого розчину 6,0 у 20 мМ натрій-фосфатному буфері. Для ЗОН-селективних ЕГМФ-вмісних МІП мембран найбільші значення диференційних сенсорних відгуків спостерігали за рН аналізованого розчину 7,0 у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, тоді як найефективніше зв'язування ЗОН 1-АЛП-вмісними МІП мембранами відбувалось у 20 мМ натрій-фосфатному буфері рН 6,0, який містить 150 мМ хлориду натрію.

Визначено робочі характеристики створених біосенсорних систем на основі МІП мембран з оптимізованим складом. Для біосенсорної системи на основі АА-вмісних МІП мембран межа визначення АФВ1 становить 10 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон – 10–500 нг/мл. Створена біосенсорна система – високоселективна щодо виявлення АФВ1 і не чутлива до наявності у зразку його близьких структурних аналогів: афлатоксину G2 та охратоксину А (ОхА). За допомогою біосенсорних систем на основі ЗОН-селективних МІП мембран можливо виявляти цільовий мікотоксин з межею визначення 1 мкг/мл, при цьому лінійний динамічний діапазон визначення складає 1–25 мкг/мл. Встановлено, що біосенсорна система на основі ЕГМФ-вмісних МІП мембран здатна високоселективно зв'язувати цільовий мікотоксин – ЗОН, на відміну від його близьких структурних аналогів (α -зеараленол, 17- β -естрадіол, бісфенол А, резорцинол) та інших мікотоксинів (АФВ1 та ОхА). Біосенсорна система на основі 1-АЛП-вмісних МІП мембран здатна до високоселективного виявлення ЗОН та його метаболіту – α -зеараленолу, проте не чутлива до його близьких структурних аналогів та інших мікотоксинів. Стабільність створених

біосенсорних систем за зберігання при кімнатній температурі становить 18 місяців.

Вперше створено лабораторні прототипи оптичних біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків та смартфонів для визначення мікотоксинів та досліджено їхні робочі характеристики. Створений лабораторний прототип оптичної біосенсорної системи для детекції АФВ1 мав межу визначення АФВ1 15 нг/мл і лінійний динамічний діапазон від 15 до 100 нг/мл. Встановлено, що біосенсорна система на основі МІП мембран та смартфона здатна виявляти ЗОН з межею визначення 1 мкг/мл та лінійним динамічним діапазоном від 1 до 10 мкг/мл.

Крім того, розроблено підходи до покращення робочих характеристик створених біосенсорних систем для високочутливого визначення згаданих мікотоксинів за рахунок використання флуоресцентного маркера у конкурентному варіанті аналізу, а також наночастинок срібла та явища плазмонного підсилення флуоресценції. Використання флуоресцентного аналогу ЗОН (2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоату (ПАРА) у конкурентному варіанті аналізу забезпечило зниження межі визначення ЗОН у 100 разів. Встановлено, що в цьому випадку межа виявлення ЗОН дорівнює 10 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон 10–100 нг/мл. Також, розроблено метод синтезу срібних наночастинок (AgНЧ) в структурі МІП мембран та отримання селективних елементів сенсорів на основі МІП мембран з вбудованими AgНЧ (МІП-AgНЧ) для високочутливого визначення цільових мікотоксинів. Вперше срібні наночастинок було отримано *in situ* в результаті відновлення нітрату срібла (I) у структурі МІП мембран під час їхнього синтезу. Використовуючи явище плазмонного підсилення флуоресценції, на основі розроблених МІП-AgНЧ сенсорних елементів вперше створено лабораторні прототипи біосенсорних систем для високочутливого та селективного визначення АФВ1 та ЗОН. За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що за підсилення флуоресценції АФВ1 відповідають

сферичні AgНЧ, розміром 30–70 нм, які рівномірно розподілені в структурі полімеру. Срібні наночастинки, які забезпечують підсилення флуоресценції ЗОН, мали сферичну форму та діаметр 20–30 нм. Показано, що межа визначення АФВ1 за допомогою біосенсорної системи на основі МПП-AgНЧ становить 0,3 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення 0,3–25 нг/мл, що в 33 разів менше порівняно до біосенсорної системи на основі немодифікованих МПП мембран. Біосенсиори на основі МПП-AgНЧ мембран здатні виявляти ЗОН з межею визначення 5 нг/мл, що у 200 разів краще, у порівнянні з біосенсорами на основі МПП мембран, синтезованих без додавання нітрату срібла (I). Лінійний динамічний діапазон визначення ЗОН за допомогою таких чутливих елементів становить 5 нг/мл – 25 мкг/мл.

Розроблені в дисертаційній роботі прототипи біосенсорних систем були успішно апробовані для визначення АФВ1 та ЗОН у реальних зразках пшеничного, кукурудзяного борошна та мелених зразках зернових культур, спільно з ДП «Укрметртестстандарт» проведено метрологічні дослідження розроблених сенсорних систем та затверджено запропоновані методики визначення мікотоксинів.

Представлені в дисертаційній роботі нові оптичні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків мають ряд переваг над традиційними аналітичними методами визначення мікотоксинів: висока стабільність (мінімум 18 місяців за кімнатної температури) за дуже високої селективності біосенсора, низька вартість МПП, проста та швидка процедура аналізу за рахунок використання смартфона. Завдяки цьому вони можуть бути використані для надійного, високочутливого та селективного, експрес-виявлення мікотоксинів у продуктах харчування та тваринних кормах в тому числі у польових умовах.

Ключові слова: біосенсиори, флуоресцентні методи, флуоресценція, сенсори на основі смартфонів, полімери-біоміметики, молекулярно-імпринтовані полімери, комп'ютерне моделювання, токсини, мікотоксини, афлатоксин В1, зеараленон, наночастинки, плазмонне підсилення флуоресценції.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

1. Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Elsevier, Talanta, 201, 2019, P. 204–210. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.016. **IF 6.057 Q1.** *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран та визначення їхніх сенсорних характеристик, обробка результатів, підготовка статті до друку.*
2. Sensor based on molecularly imprinted polymer membranes and smartphone for detection of Fusarium contamination in cereals / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Dubey L., Dubey I., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Ternovska T., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Sensors 2020, 20, 4304. DOI: 10.3390/s20154304. **IF 3.735 Q1.** *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран та визначення їхніх сенсорних характеристик, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*
3. Validation of aflatoxin B1 MIP membrane-based smartphone sensor system for real sample applications / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V., Linnik, R. P., Antonyuk, M. Z., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skay A. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(5), P. 346–356. DOI: 10.7124/bc.000a60. *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран, валідації методики визначення АФВІ, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку.*
4. Zearalenone-selective biomimetic-based sensor system and its validation for real samples' analysis / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V., Stepanenko, Y., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skaya, A. V. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(6), P. 438–446. DOI: 10.7124/bc.000a69. *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран, валідації методики*

визначення ЗОН, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку.

5. Highly-selective and sensitive plasmon-enhanced fluorescence sensor of aflatoxins / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Lytvyn V., Demydov P., Lopatynskiy A., Stepanenko Ye., Brovko O., Pinchuk A., Chegel V. // Analyst, 2022, 147(6), P. 1135–1143. DOI: 10.1039/d1an02173g. **IF 5,227 Q1** *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран з вбудованими срібними наночастинками та визначення їхніх сенсорних характеристик, трансмісійна електронна мікроскопія, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

6. An enhanced fluorescent sensor system based on molecularly imprinted polymer chips with silver nanoparticles for highly-sensitive zearalenone analysis / **Yarynka D.**, Chegel V., Piletska E., Piletsky S., Dubey L., Dubey I. Ya., Brovko O., Nikolaiev R., and Sergeyeva T. // Analyst, 2023, 148(11), P. 2633–2643. DOI: 10.1039/d2an01991d. **IF 5,227 Q1**. *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран з вбудованими срібними наночастинками та визначення їхніх сенсорних характеристик, трансмісійна електронна мікроскопія, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

Метрологія:

1. Методика вимірювання концентрації афлатоксину В1 у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36/866-19 / Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

2. Методика вимірювання концентрації зеараленону у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36-4/20489/ Розробники: Кулик С., Сергеева Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2020.

Тези доповідей:

1. Fluorescent and colorimetric sensor systems for food toxins and endocrine disruptors detection based on molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva T., Yarynka D., Piletska E., Dubey I., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Advanced materials and technologies: from idea to market, 10th international conference, Catalogue, P. 79 (Ningbo, China, 24–26.10.2018).

2. Optical biosensor system for zearalenone detection based on nanostructured biomimetics / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skay A.V., Sergeyeva T.A. // Збірник тез, XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь І Поступ Біології”, Львів, Україна, 9 – 11.04.2019, – С. 14–15.

3. Smartphone-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Biopolymers and Cell. – 2019. – Vol. 35. – N 5. – P. 335 (P 381–414). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A14>

4. Nanobased fluorescent sensor system for zearalenone detection / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // The 19th FEBS Young Scientists' Forum Krakow, Poland, (3–6 July 2019), Abstract book. – P. 111; 44th FEBS Congress (6–11 July, 2019, Krakow, Poland), Abstract notation: P-35-016.

5. Smartphone sensor system for aflatoxin B1 and zearalenone detection based on nanostructured polymeric membranes / Sergeyeva T.A., Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V. // Abstracts book of the international research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2019), (Ukraine, Lviv, 27–30 august 2019) / Publishing House – LLC "Computer-publishing, information center" Kyiv, 2019. – P. 312.

6. Biomimetic-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 and zearalenone / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V., Sergeyeva T.A. // Медична та клінічна хімія. 2019. – Т.21. – №3. – С.294.

7. Detection of zearalenone in cereals using smartphone-based molecularly imprinted polymer membrane sensor system / Yarynka D., Dubey I., Dubey L., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Brovko O., Piletsky S., El'skaya A., Sergeyeva T. // XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України, Київ, Україна, 27-28.05.2020, Електронна збірка тез. – С. 5. <http://imbg.org.ua/uk/youngsci/>

8. Rapid mycotoxins monitoring systems in cereals using smartphone based biomimetic sensor / Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Stepanenko Ye.Yu., Linnik R.P., Antonyuk M.Z., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeyeva T.A. // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. P. – 187 (P 185–244). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>

9. Апробація флуориметричної сенсорної системи на основі смартфона для визначення афлатоксину В1 у зразках борошна / Яринка Д.В., Пілецька О.В., Линник Р.П., Бровко О.О., Пілецький С.А., Єльська Г.В., Сергєєва Т.А. // Тези доповідей, 9-та Міжнародна науково-технічна конференція "Сенсорна

електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ-9), Одеса, Україна, 20–24.09.2021, Одеса: Астропринт. 2021. – 212 с. – С. 112.

10. Highly selective chip-based fluorescent sensor systems for in-field analysis of mycotoxins / Yarynka D.V., Chegel V.I. Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Lopatynskyi A.M., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation [Internet]; 2022 June 15–17; Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2022. 158 p. Available from: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Confer.>

11. Chip based plasmon-enhanced fluorescence sensor for highly-sensitive zearalenone analysis / Yarynka D.V., Chegel V.I., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // 10-та Міжнародна конференція "Нанотехнології та наноматеріали" НАНО-2022 (Львів, Україна, 25–27.08.2022). Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2022), (Ukraine, Lviv, 25–27 august 2022) / Publishing Hous – LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2022. – P. 312.

ABSTRACT

Yarynka D.V. Optical biosensor systems based on biomimetic polymers and smartphones for food mycotoxins (aflatoxin B1 and zearalenone) detection. – The manuscript.

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology and Biochemistry). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

Annually excessive levels of mycotoxins in food products are detected worldwide. In addition to the significant economic losses associated with crop loss (about 25% of food products are lost every year due to mycotoxins contamination), mycotoxins are dangerous for human and animal health. According to the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), the most dangerous mycotoxins are, among others, aflatoxin B1 (AFB1) and zearalenone (ZON). Therefore, developing new approaches for monitoring and controlling these mycotoxins in food products is very important. A promising field of such developments is the creation of highly selective, stable and sensitive biosensor systems based on smartphones, which, unlike traditional analytical methods, will be cheap, express, handy and easy to use. Thus, **the dissertation aims** to create optical biosensor systems based on smartphones and biomimetic polymers in the form of molecularly imprinted polymer membranes to detect worldwide food toxins (AFB1 and ZON) in food products and animal feed.

Biomimetic polymers in the form of molecularly imprinted polymer (MIP) membranes are proposed as sensitive elements of biosensor systems to determine AFB1 and ZON. Unlike biological molecules (enzymes, antibodies), biomimetic polymers are much more stable, synthesising and integrating such elements into biosensor devices is simple and does not require special operating conditions. Moreover, regarding sensitivity and selectivity to the target analyte, MIPs are as good as natural biomolecules and can generate optical sensor responses that are easily

recorded. The proposed biosensor systems are based on the natural ability of mycotoxins to fluoresce. The toxin from analysed sample, bound with the selective receptor sites formed in the MIPs' structure, can be detected after irradiation of the membranes with ultraviolet (UV) light of a specific wavelength. It will initiate the fluorescence of mycotoxins, the intensity of which will be proportional to the concentration of toxins in the sample. Fluorescent sensor signals generated by the biomimetic polymers in the form of membranes can be registered both with a standard laboratory fluorimeter and with smartphone camera using commercially available digital image analysis programs for smartphones (in particular, the Spotxel program for the Android 6+ operating system) for further analysis. Using a smartphone as an analyser will simplify the analyte determination procedure and can successfully replace expensive laboratory equipment outside laboratories. Thus, this method can be used outside the laboratory.

Firstly, highly stable sensitive elements based on MIP membranes with artificial receptor sites for AFB1 and ZON recognition in MIPs' structure were synthesised by the *in situ* radical polymerisation method and optimised. The best recognition of AFB1 was found for MIP membranes synthesised using acrylamide (AA) as a functional monomer from a monomer mixture with a 1:2 “dummy” template: AA ratio. It was established that the MIP membranes synthesised using the functional monomers 1-allylpiperazine (1-ALP) and ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMF), with 1:4 and 1:2 “dummy” template: functional monomer ratio, respectively, demonstrated the best recognition properties in response to adding ZON. Also, the influence of the analysed sample conditions on the ability of the synthesised MIP membranes to recognise the target mycotoxins was investigated and optimised. It was established that the highest values of the sensor responses of AFB1-sensitive MIP membranes were detected in 20 mM sodium phosphate buffer with pH 6. The highest values of the sensor responses of EGMF-containing MIP membranes in response to the addition of ZON were determined in 20 mM sodium phosphate buffer with pH 7. For 1-ALP-containing MIP membranes, the highest levels of interaction with ZON were observed in a 20 mM sodium phosphate with pH 6, which contained 150 mM of sodium nitrate.

The analytical characteristics of the created biosensor systems based on MIP membranes with an optimised composition were determined. For the biosensor system based on AA-containing MIP membranes, the detection limit of AFB1 is 10 ng/mL, and the linear dynamic range is 10–500 ng/mL. The created biosensor system is highly selective for the AFB1 detection from the analysed solutions and demonstrated negligible selectivity towards its close structural analogues: aflatoxin G2 and ochratoxin A. With the created biosensor systems, it is possible to detect ZON with a detection limit of 1 µg/mL, while the linear dynamic range comprises 1–25 µg/mL. It was discovered that the biosensor system based on EGMF-containing MIP membranes is capable of highly selectively binding of the target mycotoxin - ZON, in contrast to its close structural analogues (α -zearalenol, 17- β -estradiol, bisphenol A, resorcinol) and other mycotoxins (AFB1 and ochratoxin A). The biosensor system based on 1-ALP-containing MIP membranes is capable of highly selective detection of ZON and its metabolite - α -zearalenol. At the same time, virtually no binding of its close structural analogues and other mycotoxins was observed. The created biosensor systems remain stable at room temperature for 18 months.

For the first time, laboratory prototypes of biosensor systems based on biomimetic polymers and smartphones for the mycotoxins analysis were created, and their analytical characteristics were investigated. The prototype of an optical biosensor system based on biomimetic polymers and a smartphone for AFB1 detection demonstrated a detection limit of 15 ng/mL and a linear dynamic range from 15 to 100 ng/mL. The biosensor system based on MIP membranes and a smartphone could detect ZON with a detection limit of 1 µg/mL and a linear dynamic range from 1 to 10 µg/mL.

In addition, to improve the working characteristics of proposed biosensor systems for highly sensitive mycotoxins analysis, new approaches were developed based on the use of a fluorescent marker in competitive analysis, as well as silver nanoparticles and plasmon-enhanced fluorescence. The use of a fluorescent analogue of ZON (2-[pyrene-1-carbonyl]amino)ethyl 2,4-dihydroxybenzoate (PARA) in a

competitive assay provided a 100-fold decrease of the ZON detection limit. In this case, the detection limit of ZON is 10 ng/mL, and the linear dynamic range is 10–100 ng/mL. Also, methods of covalent immobilisation of MIP membranes on glass surfaces, synthesis of silver nanoparticles in the structure of immobilised MIP membranes and production of highly sensitive MIP-AgNP sensor elements were developed. For the first time, silver nanoparticles were obtained *in situ* due to the reduction of silver (I) nitrate in the structure of MIP membranes during their synthesis on glass surfaces. Using the plasmon-enhanced fluorescence phenomenon, laboratory prototypes of biosensor systems based on the developed MIP-AgNP sensor elements for highly sensitive and selective determination of target mycotoxins were created for the first time. With the method of transmission electron microscopy, it was detected that spherical AgNPs, size 30–70 nm, which are evenly distributed in the polymer structure, are responsible for enhancing the AFB1 fluorescence. Silver nanoparticles, which provide amplification of ZON fluorescence, were spherical in shape, with a size of 20–30 nm. It was shown that the detection limit of AFB1 using the biosensor system based on MIP-AgNP chips is 0.3 ng/mL, and the linear dynamic range of detection is 0.3–25 ng/mL, which was decreased by a factor of 33 as compared to the biosensor system based on unmodified MIPs. Biosensors based on MIP-AgNP chips are capable of ZON analysis with a detection limit of 5 ng/mL and demonstrated a 200-fold sensitivity increase compared to the reference AgNPs-free MIP films. The linear dynamic range of ZON determination using such sensitive chips is 5 ng/mL – 25 µg/mL.

Prototypes of fluorescent biosensor systems based on smartphones and MIP membranes were successfully tested to determine AFB1 and ZON in wheat and corn real flour samples. In cooperation with the SE “Ukrmetrteststandard” the metrological studies of the developed sensor systems were carried out and the proposed methods for the mycotoxins analysis were approved.

The novel optical biosensor systems based on biomimetic polymers presented in the dissertation thesis have several advantages over traditional analytical methods for

mycotoxins determination: high stability (minimum 18 months), low cost of MIPs, simple and quick analysis procedure using a smartphone. Thus, they can be used for reliable, highly sensitive and selective, rapid mycotoxins detection in food products and animal feed.

Keywords: biosensors, fluorescent methods, fluorescence, smartphone-based sensors, biomimetic polymers, molecularly imprinted polymers, computational modelling, toxins, mycotoxins, aflatoxin B1, zearalenone, nanoparticles, plasmon-enhanced fluorescence.

List of publications

Articles:

1. Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Elsevier, Talanta, 201, 2019, P. 204–210. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.016. **IF 6.057 Q1.**
2. Sensor based on molecularly imprinted polymer membranes and smartphone for detection of Fusarium contamination in cereals / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Dubey L., Dubey I., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Ternovska T., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Sensors 2020, 20, 4304. DOI: 10.3390/s20154304. **IF 3.735. Q1.**
3. Validation of aflatoxin B1 MIP membrane-based smartphone sensor system for real sample applications / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V., Linnik, R. P., Antonyuk, M. Z., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skay A. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(5), P. 346–356. DOI: 10.7124/bc.000a60.
4. Zearalenone-selective biomimetic-based sensor system and its validation for real samples' analysis / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V.,

Stepanenko, Y., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skaya, A. V. // *Biopolymers and Cell*, 2021, 37(6), P. 438–446. DOI: 10.7124/bc.000a69.

5. Highly-selective and sensitive plasmon-enhanced fluorescence sensor of aflatoxins / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Lytvyn V., Demydov P., Lopatynskiy A., Stepanenko Ye., Brovko O., Pinchuk A., Chegel V. // *Analyst*, 2022, 147(6), P. 1135–1143. DOI: 10.1039/d1an02173g. **IF 5,227 Q1.**

6. An enhanced fluorescent sensor system based on molecularly imprinted polymer chips with silver nanoparticles for highly-sensitive zearalenone analysis / **Yarynka D.**, Chegel V., Piletska E., Piletsky S., Dubey L., Dubey I. Ya., Brovko O., Nikolaiev R., and Sergeyeva T. // *Analyst*, 2023, 148(11), P. 2633–2643. DOI: 10.1039/d2an01991d. **IF 5,227 Q1.**

Metrology:

3. Методика вимірювання концентрації афлатоксину В1 у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36/866-19 / Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

4. Методика вимірювання концентрації зеараленону у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36-4/20489/ Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

Conference abstracts:

1. Fluorescent and colorimetric sensor systems for food toxins and endocrine disruptors detection based on molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva

T., Yarynka D., Piletska E., Dubey I., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Advanced materials and technologies: from idea to market, 10th international conference, Catalogue, P. 79 (Ningbo, China, 24–26.10.2018).

2. Optical biosensor system for zearalenone detection based on nanostructured biomimetics / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skay A.V., Sergeyeva T.A. // Збірник тез, XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь І Поступ Біології”, Львів, Україна, 9 – 11.04.2019, – С. 14–15.

3. Smartphone-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Biopolymers and Cell. – 2019. – Vol. 35. – N 5. – P. 335 (P 381–414). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A14>

4. Nanobased fluorescent sensor system for zearalenone detection / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // The 19th FEBS Young Scientists' Forum Krakow, Poland, (3–6 July 2019), Abstract book. – P. 111; 44th FEBS Congress (6–11 July, 2019, Krakow, Poland), Abstract notation: P-35-016.

5. Smartphone sensor system for aflatoxin B1 and zearalenone detection based on nanostructured polymeric membranes / Sergeyeva T.A., Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V. // Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2019), (Ukraine, Lviv, 27–30 august 2019) / Publishing Hous – LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2019. – P. 312.

6. Biomimetic-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 and zearalenone / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P.,

Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V., Sergeyeva T.A. // Медична та клінічна хімія. 2019. – Т.21. – №3. – С.294.

7. Detection of zearalenone in cereals using smartphone-based molecularly imprinted polymer membrane sensor system / Yarynka D., Dubey I., Dubey L., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Brovko O., Piletsky S., El'skaya A., Sergeyeva T. // XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України, Київ, Україна, 27-28.05.2020, Електронна збірка тез. – С. 5. <http://imbg.org.ua/uk/youngsci/>

8. Rapid mycotoxins monitoring systems in cereals using smartphone based biomimetic sensor / Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Stepanenko Ye.Yu., Linnik R.P., Antonyuk M.Z., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeyeva T.A. // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. P. – 187 (P 185–244). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>

9. Апробація флуориметричної сенсорної системи на основі смартфона для визначення афлатоксину В1 у зразках борошна / Яринка Д.В., Пілецька О.В., Линник Р.П., Бровко О.О., Пілецький С.А., Єльська Г.В., Сергеева Т.А. // Тези доповідей, 9-та Міжнародна науково-технічна конференція “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ-9), Одеса, Україна, 20–24.09.2021, Одеса: Астропринт. 2021. – 212 с. – С. 112.

10. Highly selective chip-based fluorescent sensor systems for in-field analysis of mycotoxins / Yarynka D.V., Chegel V.I. Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Lopatynskiy A.M., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation [Internet]; 2022 June 15–17; Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2022. 158 p. Available from: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Confer.>

11. Chip based plasmon-enhanced fluorescence sensor for highly-sensitive zearalenone analysis / Yarynka D.V., Chegel V.I., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // 10-та Міжнародна конференція "Нанотехнології та наноматеріали" НАНО-2022 (Львів, Україна, 25–27.08.2022). Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2022), (Ukraine, Lviv, 25–27 august 2022) / Publishing Hous – LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2022. – P. 312.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1.....	35
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1. Загальна характеристика мікотоксинів.....	35
1.1.1. Характеристика афлатоксинів та їхнього впливу на живі організми.....	37
1.1.2. Характеристика ЗОН та його впливу на живі організми.....	38
1.2. Сучасні методи швидкого визначення мікотоксинів: біосенсиори.....	41
1.2.1. Електрохімічні сенсори для визначення мікотоксинів.....	41
1.2.2. П'єзоелектричні сенсори для виявлення мікотоксинів.....	43
1.2.3. Оптичні сенсори для визначення мікотоксинів.....	44
1.3. Сенсори на основі молекулярно-імпринтованих полімерів.....	49
1.3.1. Особливості отримання молекулярно-імпринтованих полімерів.....	50
1.3.2. Використання методу молекулярного імпринтингу для створення штучних аналогів біологічних рецепторів для визначення мікотоксинів.....	53
1.4. Сенсори на основі смартфонів.....	57
1.5 Покращення аналітичних характеристик біосенсорів для визначення мікотоксинів за допомогою наноматеріалів	61
РОЗДІЛ 2.....	66
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	66
2.1. Матеріали та реактиви.....	66
2.2. Методи дослідження.....	67
2.2.1. Комп'ютерне моделювання взаємодії цільових мікотоксинів АФВ1 та ЗОН з функціональними мономерами.....	67
2.2.2. Синтез МІП мембран за допомогою методу радикальної полімеризації <i>in situ</i>	68
2.2.3. Синтез та іммобілізація МІП мембран на скляних поверхнях.....	72

2.2.4. Визначення концентрації мікотоксинів за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії.....	73
2.2.5. Визначення концентрації мікотоксинів за допомогою смартфона.....	74
2.2.6. Екстракція та визначення мікотоксинів в реальних зразках.....	75
2.2.7. Трансмисійна електронна мікроскопія.....	77
2.2.8. Статистична обробка результатів.....	78
РОЗДІЛ 3.....	79
СТВОРЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ЧУТЛИВИХ ЕЛЕМЕНТІВ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ.....	79
3.1. Оптимізація складу полімерних композицій для синтезу мікотоксин- селективних полімерів-біоміметиків.....	79
3.1.1. Вибір псевдоматриць для синтезу АФВ1- та ЗОН-селективних МІП мембран	80
3.1.2. Вибір функціональних мономерів для синтезу АФВ1- та ЗОН- селективних МІП мембран.....	81
3.1.3. Синтез полімерів-біоміметиків у вигляді МІП мембран для виявлення мікотоксинів.....	83
3.2. Оптимізація складу мікотоксин-селективних полімерів-біоміметиків....	84
3.2.1. Вибір ФМ та оптимального співвідношення псевдоматриця : ФМ у мономерній суміші для синтезу АФВ1-селективних МІП мембран.....	85
3.2.2. Вибір ФМ та оптимального співвідношення псевдоматриця : ФМ у мономерній суміші для ЗОН-селективних МІП мембран.....	87
3.3. Дослідження оптимальних умов розпізнавання цільових мікотоксинів штучними рецепторними сайтами, сформованими у МІП мембранах.....	90
3.3.1. Визначення оптимальних умов розпізнавання АФВ1 штучними рецепторними сайтами у складі МІП мембран.....	90
3.3.2. Визначення оптимальних умов розпізнавання ЗОН штучними рецепторними сайтами у складі МІП мембран.....	92

3.4. Висновки до розділу.....	97
РОЗДІЛ 4.....	99
РОЗРОБКА ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ, СЕЛЕКТИВНИХ ДО МІКОТОКСИНІВ	99
4.1. Дослідження аналітичних характеристик флуориметричної біосенсорної системи на основі МПП мембран для визначення АФВ1.....	99
4.1.1. Калібрувальний графік для визначення АФВ1 за допомогою флуориметричної біосенсорної системи на основі МПП мембран.....	99
4.1.2. Дослідження селективності біосенсорної системи на основі молекулярно-імпринтованих полімерних мембран для визначення АФВ1...	101
4.2. Визначення робочих характеристик флуориметричних біосенсорних систем на основі МПП мембран для виявлення ЗОН.....	102
4.2.1. Калібрувальний графік для визначення ЗОН за допомогою флуориметричних біосенсорних систем на основі МПП мембран.....	102
4.2.2. Дослідження селективності біосенсорних систем на основі МПП мембран для визначення ЗОН.....	104
4.3. Розробка біосенсорних систем на основі МПП мембран та смартфона для визначення мікотоксинів	106
4.3.1. Визначення АФВ1 за допомогою оптичної біосенсорної системи на основі МПП мембран та смартфона.....	106
4.3.2. Визначення ЗОН за допомогою оптичної біосенсорної системи на основі МПП мембран та смартфона.....	108
4.4. Висновки до розділу.....	109
РОЗДІЛ 5.....	111
РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ РОБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРІВ-БІОМІМЕТИКІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МІКОТОКСИНІВ.....	111
5.1 Розробка біосенсорної системи на основі МПП мембран для виявлення ЗОН з використанням флуоресцентного маркера.....	112
5.2. Використання методу плазмонного підсилення флуоресценції для	

покращення аналітичних характеристик біосенсорів на основі МІП мембран для визначення мікотоксинів.....	115
5.2.1. Визначення оптимальної кількості нітрату срібла (I) для ефективного підсилення флуоресцентного сигналу.....	115
5.2.2. Дослідження морфології AgНЧ утворених в структурі МІП мембран.....	118
5.2.3. Калібрувальні графіки для визначення мікотоксинів за допомогою сенсорних чипів на основі МІП-AgНЧ мембран.....	120
5.2.4. Дослідження селективності біосенсорних систем на основі МІП-AgНЧ мембран для визначення мікотоксинів.....	122
5.3. Висновки до розділу.....	125
РОЗДІЛ 6.....	127
АПРОБАЦІЯ СТВОРЕНИХ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ.....	127
6.1. Визначення АФВ1 у зразках харчових продуктів та тваринних кормів...	127
6.2. Визначення ЗОН у зразках харчових продуктів та тваринних кормів.....	129
6.3. Апробація сенсорів на основі МІП-AgНЧ мембран для визначення АФВ1 та ЗОН.....	131
6.4. Висновки до розділу.....	134
РОЗДІЛ 7.....	136
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	136
ВИСНОВКИ.....	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	143
ДОДАТОК А.....	172

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АА	— акриламід
1-АЛП	— 1-алілпіперазин
АМПСК	— 2-акриламід-2-метилпропансульфонова кислота
АФВ1	— афлатоксин В1
АФВ2	— афлатоксин В2
АФГ2	— афлатоксин G2
БФА	— бісфенол А
ВЕРХ	— високоефективна рідинна хроматографія
4-ВП	— 4-вінілпіридин
ГЕМА	— 2-гідроксиетилметакрилат
ДЕАЕМ	— диетиламіноетилметакрилат
ДОН	— дезоксиніваленол
ДМФА	— диметилформамід
ДСВ	— диференційний сенсорний відгук
ЕГМФ	— етиленглікольметакрилатфосфат
ЕР	— естрогеновий рецептор
ЗАЛ	— зеараланол
ЗОЛ	— зеараленол
ЗОН	— зеараленон
ІК	— ітаконова кислота
ІФА	— імуноферментний аналіз
МБА	— N,N'-метиленбісакриламід
МІП	— молекулярно-імпринтовані полімери
ОУА	— олігоуретанакрилат
ОхА	— охратоксин А
ПАРА	— 2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоат
ПЕГ	— поліетиленгліколь

ППР	– поверхневий плазмонний резонанс
ТГМ-3	– 3-етиленглікольдиметакрилат
ТЕМ	– трансмісійна електронна мікроскопія
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
ФМ	– функціональний мономер
ЦДГБ	– циклододecilдигідробензоат
AgНЧ	– срібні наночастинки

ВСТУП

Актуальність теми. Вторинні метаболіти пліснявих грибів – мікотоксини – найпоширеніші природні забруднювачі харчових продуктів. За результатами останніх досліджень, щорічно у світі 25% зернових культур та тваринних кормів забруднені мікотоксинами [1]. На ріст та поширення мікотоксиногенних родів плісняви (зокрема, *Aspergillus spp.* та *Fusarium spp.*) позитивно впливають зміни клімату, які спостерігають у останні роки [2]. Зважаючи на це, попередження забруднення харчових продуктів мікотоксинами – актуальна проблема сьогодення. Наразі охарактеризовано близько 400 різних мікотоксинів, а найважливішими з точки зору безпеки харчових продуктів є мікотоксини, які належать до групи афлатоксинів та зеараленон. Афлатоксин В1 (АФВ1) – один з найнебезпечніших природних канцерогенів, віднесений до першої групи канцерогенних агентів відповідно до класифікації Міжнародної агенції дослідження раку [3]. Зеараленон (ЗОН) – вторинний метаболіт пліснявих грибів роду *Fusarium* останні кілька років набуває все більшого поширення в країнах Європейського союзу. За результатами останніх досліджень, в 2021 році ЗОН було виявлено у 49 % протестованих зразків зернових [4]. Незважаючи на те, що ЗОН віднесений до третьої групи канцерогенних агентів [3], при потраплянні в організм людини або тварини він може проявляти сильні тератогенні, канцерогенні, нейротоксичні, абортівні та естрогенні ефекти [5].

Окрім небезпеки для здоров'я, забруднення харчових продуктів та тваринних кормів АФВ1 та ЗОН, пов'язане також зі значними економічними втратами в сфері сільського господарства, особливо для тваринництва та птахівництва [6]. Щорічно ці економічні втрати сягають 1,5 млрд. доларів [7].

Зважаючи на поширення мікотоксинів, серйозні негативні наслідки для здоров'я людей та тварин, а також значні економічні втрати для сільського господарства та харчової промисловості, законодавства різних країн, у тому

числі й України, регламентують допустимі концентрації АФВ1 та ЗОН в продуктах харчування, які призначені для людей та тварин. Тому, проблема визначення та контролю вмісту цих мікотоксинів в продуктах харчування та тваринних кормах залишається дуже актуальною.

Сьогодні розроблено ряд аналітичних методів, які використовуються для рутинного моніторингу та контролю наявності мікотоксинів у продуктах харчування, а саме: хроматографічні методи [8, 9] та методи твердофазного імуноферментного аналізу [10]. Проте, всі вони мають велику кількість недоліків, зокрема, тривалість аналізу, потреба у великих об'ємах зразків для аналізу та висока вартість обладнання [11, 12].

Розробка сучасних аналітичних біосенсорних методів визначення харчових мікотоксинів, які були б простими, недорогими, швидкими та надійними, а також дозволили б проводити аналіз з високою швидкістю та селективністю залишається актуальною задачею сучасної біотехнології. Сьогодні розроблено ряд біосенсорних пристроїв на основі електрохімічних та оптичних перетворювачів, природних антитіл та ферментів для визначення АФВ1 та ЗОН [13–14]. Зважаючи на головний недолік більшості біосенсорів – низьку стабільність їхніх чутливих елементів на основі природних антитіл та рецепторів, розробка та створення біосенсорів на основі високостабільних штучних аналогів біологічних рецепторів (полімерів-біоміметиків) – перспективний сучасний підхід до розробки таких методів. Створення таких полімерів у вигляді молекулярно-імпринтованих полімерних (МІП) мембран забезпечить їхню легку інтеграцію у склад біосенсорного пристрою та генерацію сенсорного сигналу. Перспективність такого підходу була продемонстрована під час створення біосенсорів нового типу для визначення ряду низькомолекулярних аналітів: креатиніну [17], фенолу [18], бісфенолу А [19], деяких фармацевтичних препаратів [20]. Оптичні сенсорні сигнали, які генеруються МІП мембранами, можна легко зареєструвати в режимі реального часу за допомогою смартфона, який може успішно замінити високовартісне та

грозомізне лабораторне обладнання. Сьогодні розробка оптичних сенсорних систем на основі смартфонів – перспективний напрямок сучасної біосенсорики, ефективність якого підтверджується великою кількістю досліджень з цієї теми [21–24]. З іншого боку, на відміну від класичних чутливих елементів біосенсорів, МПП – термо- та механостабільні, а метод їхнього синтезу нескладний та недорогий, тоді як за селективністю та чутливістю такі чутливі елементи не поступаються природним антитілам та ферментам [25, 26]. Більше того, використання смартфона у ролі реєстратора та аналізатора сенсорних відгуків дозволить значно здешевити та спростити процедуру визначення харчових мікотоксинів, оскільки зникає потреба у використанні високовартісних приладів та залученні висококваліфікованого персоналу. Дана робота спрямована на розробку високостабільних біосенсорів нового покоління для визначення АФВ1 та ЗОН на основі полімерів-біоміметиків та смартфона, які б забезпечили високочутливий, нескладний, дешевий та надійний аналіз цільових аналітів в режимі реального часу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась в рамках бюджетної теми «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018–2022 роки), проєкту 8/1 «Створення сенсорних систем на основі смартфонів та «розумних» полімерів-біоміметиків для селективного визначення харчових токсинів та ендокринних руйнівників» в межах цільової програми наукових досліджень НАН України «“Розумні” сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U006190, 2018–2022 роки) та гранту № FSA3-19-65495(a)-0 «Highly-selective recognition of aflatoxins in cereals and feeding stuffs using nanostructured polymeric membranes», профінансованого Фондом цивільних досліджень та розвитку США (CRDF).

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – створення оптичних біосенсорних систем на основі смартфонів та полімерів-біоміметиків у формі молекулярно-імпринтованих полімерних мембран для виявлення поширених харчових токсинів (афлатоксину В1 та зеараленону) у продуктах харчування та тваринних кормах.

Відповідно до мети роботи було визначено наступні *завдання*:

1. Синтезувати полімери-біоміметики у вигляді МІП мембран, зі штучними рецепторними сайтами в їхній структурі, які селективні до афлатоксину В1 та зеараленону, використовуючи метод радикальної полімеризації *in situ*;
2. Встановити взаємозв'язок між складом МІП мембран та селективністю сайтів розпізнавання, утворених у структурі таких мембран, для афлатоксину В1 та зеараленону, відповідно;
3. Визначити оптимальні умови розпізнавання цільових мікотоксинів штучними рецепторними сайтами, які утворені в структурі МІП мембран;
4. Використовуючи синтезовані афлатоксин В1- та зеараленон-селективні МІП мембрани з оптимізованою композицією, створити оптичні сенсорні системи на основі смартфона та визначити їхні робочі характеристики;
5. Розробити підходи до покращення робочих характеристик створених біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків для визначення афлатоксину В1 та зеараленону;
6. Апробувати створені оптичні біосенсорні систем на основі полімерів-біоміметиків для визначення афлатоксину В1 та зеараленону в харчових продуктах та тваринних кормах.

Об'єкт дослідження цієї роботи – штучні аналоги біологічних рецепторів – полімери-біоміметики, селективні до поширених харчових мікотоксинів: афлатоксину В1 та зеараленону.

Предмет дослідження – оптичні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків та смартфона для визначення афлатоксину В1 та зеараленону.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи досліджень: флуоресцентна спектроскопія, методи ковалентної іммобілізації полімерів-біоміметиків, метод радикальної полімеризації *in situ*, метод отримання наночастинок срібла шляхом відновлення нітрату срібла I, методи рідинної екстракції мікотоксинів, трансмісійна електронна мікроскопія, методи комп'ютерного моделювання (молекулярної динаміки), статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше створено високочутливі та селективні оптичні біосенсорні системи на основі смартфона та МПП мембран зі штучними рецепторними сайтами зв'язування АФВ1 та ЗОН для визначення цільових мікотоксинів. На основі розроблених чутливих елементів нового покоління створено лабораторні прототипи флуориметричних біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків і смартфона для аналізу АФВ1 та ЗОН в харчових продуктах та тваринних кормах. Вперше з використанням даних, отриманих методом комп'ютерного моделювання, передбачено та оптимізовано структуру рецепторних сайтів у складі МПП мембран, що селективні до ЗОН. Розроблено універсальні підходи до покращення робочих характеристик створених біосенсорних систем на основі МПП мембран для високочутливого визначення цільових мікотоксинів з використанням високофлуоресцентного аналогу ЗОН у конкурентному варіанті аналізу, а також явища плазмонного підсилення флуоресценції АФВ1 та ЗОН за допомогою наночастинок срібла (AgНП). Вперше розроблено метод отримання високочутливих сенсорних елементів на основі іммобілізованих МПП мембран з вбудованими в їхню структуру наночастинами срібла (МПП-AgНП). На основі розроблених МПП-AgНП чутливих елементів та явища плазмонного підсилення флуоресценції створено лабораторні прототипи сенсорних систем для високочутливого та селективного визначення АФВ1 та ЗОН у харчових продуктах та тваринних кормах.

Практичне значення одержаних результатів. Створено лабораторні прототипи біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків та смартфона для високоселективного та високочутливого визначення АФВ1 та ЗОН. Доведено, що розроблені біосенсори можуть успішно використовуватись для моніторингу наявності цільових мікотоксинів в реальних зразках харчових продуктів. Проведено повний комплекс метрологічних досліджень спільно з Державним підприємством «Укрметртестстандарт», розроблено та затверджено методики визначення АФВ1 та ЗОН в зразках харчових продуктів та тваринних кормів (кукурудзяне та пшеничне борошно різних виробників, зразки меленої кукурудзи). Розроблені біосенсорні системи мають ряд переваг порівняно до традиційних аналітичних методів визначення мікотоксинів (висока стабільність, чутливість та селективність, низька вартість чутливих елементів на основі полімерів-біоміметиків; проста та швидка процедура виявлення за рахунок використання смартфона) та можуть бути використані для надійного, експрес-тестування харчових мікотоксинів як у лабораторних, так і польових умовах.

Особистий внесок здобувача. Результати наукової роботи, які викладено в дисертації, одержані авторкою особисто або за її безпосередньої участі. Планування досліджень, обговорення та аналіз отриманих результатів, а також підготовка публікацій до друку здійснювалась разом із науковим керівником д.б.н., пров.н.с. Т.А. Сергєєвою. Комп'ютерне моделювання взаємодії мікотоксинів з потенційними функціональними мономерами здійснено у співпраці з к.б.н. О.В. Пілецькою (E. Piletska) та проф. С.А. Пілецьким (S. Piletsky) з університету м. Лестер (Велика Британія). Синтез псевдоматриці циклододецилдигідробензоату (ЦДГБ) та високофлуоресцентного аналогу зеараленону – 2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоату (ПАРА) здійснено м.н.с. Л.В. Дубей та д.х.н. І. Я. Дубеєм (Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ). Синтез олігоуретанакрилату (ОУА) проведено к.х.н. В. Ф. Матюшовим та д.х.н. О.О. Бровко (Інститут хімії високомолекулярних сполук НАНУ). Флуориметричні дослідження проводили спільно з к.х.н Р.П. Линником (Київський національний університет імені Тараса Шевченка),

асп. Є.Ю. Степаненком та м.н.с Р.О. Ніколаєвим (Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ). Методика визначення мікотоксинів за допомогою смартфона розроблена спільно з проф. М.З. Антонюком (Національний університет «Києво-Могилянська академія»). Дані трансмісійної електронної мікроскопії отримані у співпраці з д.ф.-м.н. В.І. Чегелем (Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України).

Авторка висловлює щирю подяку науковому керівнику та співавторам за надану допомогу з планування та проведення експериментальних досліджень, обговорення отриманих результатів та підготовки результатів до публікації.

Апробація результатів. Результати дисертаційного дослідження були апробовані на українських та міжнародних конференціях: Advanced materials and technologies: from idea to market, 10th international conference (Ningbo, China, 24–26.10.2018), XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь І Поступ Біології” (Львів, Україна, 9–11.04.2019), XIII Всеукраїнська конференція ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 22–25.05.2019), The 19th FEBS Young Scientists' Forum and 44th FEBS Congress (Krakow, Poland, 3–11.07.2019), 7-ма Міжнародна конференція "Нанотехнології та наноматеріали" НАНО-2019 (Львів, Україна, 27–30.08.2019), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 30.09–4.10.2019), XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 27–28.05.2020), XV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 26–27.05.2020), 9-та Міжнародна науково-технічна конференція “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ-9) (Одеса, Україна, 20–24.09.2021), All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (Kyiv, Ukraine, 15–17.06.2022), 10-та Міжнародна конференція "Нанотехнології та наноматеріали" НАНО-2022 (Львів, Україна, 25–27.08.2022). Крім того, запропоновані методики визначення АФВ1 та ЗОН в зразках харчових продуктів та тваринних кормів затверджено ДП «Укрметртестстандарт».

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (сумарний імпакт-фактор становить 24,24) та 11 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, затверджено 2 методики визначення афлатоксину В1 та зеараленону.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини (три розділи), аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації – 176 сторінок. Робота містить 28 рисунків і 6 таблиць. Список використаної літератури охоплює 226 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика мікотоксинів

Мікотоксини — це низькомолекулярні високотоксичні сполуки, які утворюються в результаті життєдіяльності мікроскопічних пліснявих грибів. Найчастіше продуцентами мікотоксинів виступають мікроскопічні гриби, які належать до родів *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* та *Fusarium spp.* [1].

Група токсичних сполук, об'єднана терміном мікотоксини, досить гетерогенна. Хімічна структура мікотоксинів може варіювати від простих чотирикарбонових сполук (наприклад моніліформін) до більш складних (наприклад дезоксиніваленол (ДОН), охратоксин А (ОхА) та ін.) (рис.1.1) [27]. За своїми хімічними властивостями мікотоксини відносять до різних хімічних класів з молекулярними масами від 200 до 500 кДа. Більшість мікотоксинів мають полікетидне походження, а процеси їхнього біосинтезу схожі з біосинтезом жирних кислот [28].

Оскільки більшість мікотоксинів мають високу стійкість до температур та гамма випромінювань, їхнє руйнування досить проблематичне. Крім того, в організмі тварини чи людини, мікотоксини, під дією ферментів детоксикації ксенобіотиків, можуть перетворюватись на більш токсичні сполуки [29].

Вважається, що мікотоксини не токсичні для своїх продуцентів, проте виявляють токсичні властивості відносно рослин, тварин та людини [30]. Після потрапляння мікотоксинів всередину організму з їжею, через шкіру або органи

більше повідомлень про забруднення харчових продуктів АФВ1 та ЗОН, наднормові концентрації яких виявляють у сільськогосподарських культурах та продуктах харчування з кукурудзи, ячменю, пшениці [37, 38].

З 1960 року, коли вперше було ідентифіковано афлатоксини [39], відомо близько 400 видів мікотоксинів, серед яких найбільше уваги зосереджено на афлатоксинах різних груп (особливо АФВ1), охратоксинах, зеараленоні, фумонізінах [40]. Оскільки дана робота присвячена створенню біосенсорних систем для визначення АФВ1 та ЗОН наступні пункти огляду будуть зосереджені на докладній характеристиці саме цих мікотоксинів.

1.1.1. Характеристика афлатоксинів та їхнього впливу на живі організми. Група афлатоксинів сьогодні налічує близько 20 різних мікотоксинів, які утворюються в процесі життєдіяльності мікроскопічних грибів *Aspergillus flavus* та *Aspergillus parasiticus* [41, 42]. Проте, найбільше занепокоєння викликає найнебезпечніший та найпоширеніший серед цієї групи – АФВ1 та деякі його структурні аналоги афлатоксини В2, G1, G2 та М1 [41].

З їжею, яка була забруднена мікроскопічними грибами, або при вдиханні пилу, АФВ1 може потрапляти в організм людини чи тварин і наносити непоправної шкоди здоров'ю. Для більшості тварин та людини показник ЛД₅₀ (летальна доза 50 %) АФВ1 становить 0,3 – 17,9 мг/кг [43]. Крім того, відомі випадки гострих афлатоксикозів у людей, які супроводжуються розвитком гепатиту, анорексією та загальним нездужанням [27, 44].

Основне місце накопичення АФВ1 в організмі – це печінка, де під дією мікосомальних ферментів (цитохром Р450 1A2 та 3A4) відбувається його перетворення на більш реакційно здатну сполуку АФВ1-епоксид [45]. Відомо, що АФВ1 – сильний мутаген та канцероген, який в перетвореному вигляді афлатоксин-екзо-епоксиду може ковалентно зв'язуватись з молекулами ДНК або РНК, порушуючи процеси реплікації та синтезу білка [42]. В 2012 році була

доведена роль АФВ1 у розвитку гепатоцелюлярної карциноми у людей та Міжнародна агенція дослідження раку віднесла цей токсин до першої групи канцерогенних сполук [46]. Встановлено механізм мутагенного ефекту: метаболіт АФВ1 – афлатоксин-екзо-епоксид ковалентно зв'язується з гуаніном, який входить до складу ДНК або РНК, у положенні N7. Так утворюється аддукт АФВ1-ДНК (дигідро-8- (N7-гуаніл)-9гідрокси-1 афлатоксин-N7-гуанідин) та відбувається афлатоксин-опосередкована зміна триплету (AGG → AGT) гена *TP53* [47]. Це призводить до того, що в білку p53 відбувається заміна амінокислоти аргініну на серин, що спричиняє порушення його функцій репарації ДНК [41].

Крім того, доведено, що АФВ1 у формі афлатоксин-екзо-епоксиду може інгібувати активність різних ферментів вуглеводневого обміну: глікогенсинтазу, трансглікозилазу та фосфоглюкомутазу [41]. Також, АФВ1 може впливати на інші системи клітини, зокрема, інгібуючи активність цитохром оксидази, порушується функціонування електронтранспортного ланцюга [44].

1.1.2. Характеристика зеараленону та його впливу на живі організми.

Зеараленон утворюється в результаті життєдіяльності мікроскопічних пліснявих грибів роду *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* та *F. semitectum* [48]. ЗОН – нестероїдний мікоестроген, який за хімічною будовою та фізіологічними властивостями подібний до 17- β -естрадіолу [49].

З їжею, ЗОН потрапляє в організм тварин та людей. Метаболізм ЗОН відбувається в клітинах печінки та кишківника. Подібно до інших мікотоксинів, потрапляючи в організм тварин, ЗОН перетворюється на більш небезпечні свої похідні. Досліджено, що під дією ферментів 3 α - та 3 β -гидроксистероїд дегідрогеназ, кето група ЗОН у положенні C8 (C6) руйнується з утворенням метаболітів: α - або β -зеараленолу (ЗОЛ) (рис. 1.2.в), які за своєю структурою є

більш подібними до 17- β -естрадіолу [49]. В результаті, пізнішої редукції подвійного зв'язку в положенні C11–C12 утворюються також інші метаболіти: α - або β -зеараланол (ЗАЛ) (рис. 1.2.г) [49, 50].

ЗОН та його похідні здатні зв'язуватись з естрогеновими рецепторами (ER) та діяти подібно до 17- β -естрадіолу. Використовуючи клітини, трансфіковані людськими ER α або β , виявлено конкурентну агоністичну або антагоністичну дію ЗОН відносно естрогенових рецепторів. Показано, що ЗОН – повний агоніст до рецептору ER α та частковий агоніст ER β [49, 51]. У складі рецепторного комплексу ЗОН може транспортуватись в ядро та активувати транскрипцію певних генів, які знаходяться під контролем естроген-чутливих елементів (estrogen-responsive elements) [52]. Встановлено, що ЗОН, α - та β -ЗОЛ – ендокринні руйнівники, які впливають на утворення прогестерону, естрадіолу, тестостерону та кортизолу [53]. У самців тварин вплив ЗОН пов'язаний з безпліддям та фемінізацією статевих органів: знижується рівень тестостерону, зменшується розмір яєчок, порушується сперматогенез. У самиць свиней та щурів спостерігали зміни морфології тканин матки, порушення циклу овуляції. ЗОН та його метаболіти негативно впливають на зачаття, імплантацію та ембріональний розвиток плода [54]. Крім того, безліч дослідників повідомляють про роль цього мікотоксину в розвитку та прогресуванні раку молочної залози. Подібно до природних естрогенів, ЗОН – дозо-залежний та здатний стимулювати проліферацію естроген-чутливих клітинних ліній T47D та MCF-7 [55, 56]. Проте, участь ЗОН в розвитку раку не доведена, тому його віднесено до третьої групи канцерогенних агентів за класифікацією Міжнародної агенції дослідження раку, хоча й відомо, що ЗОН може взаємодіяти з ДНК, утворюючи ДНК-адукти, викликати фрагментацію ДНК, утворювати мікроядра, індукувати апоптоз [57].

Інформації щодо впливу зеараленону та його метаболітів на організм людини досить небагато. ЗОН пов'язують з розвитком гіперестрогенового синдрому у людей. Крім того, високі рівні мікотоксину були виявлені у сироватці крові дітей, які страждали на ідіопатичний передчасний статевий

розвиток [58]. Також ЗОН був виявлений у ендометрії жінок, які мали порушення репродуктивної системи, пов'язані з гіперестрогеновим синдромом [59]. Незважаючи на те, що токсичність зеараленону низька і показник LD_{50} для різних тварин коливається в межах 2000 – 20000 мг/кг [60], ЗОН пов'язують з кількома спалахами мікотоксикозів у людей з різних країн. Гострі токсикози, спричинені ЗОН у людей супроводжувалися нудотою, блювотою та діареєю [61].

Отже, беручи до уваги всі можливі негативні наслідки для здоров'я людини і тварин, які можуть бути спричинені вживанням продуктів харчування забруднених АФВ1 та ЗОН, важливо контролювати вміст цих мікотоксинів. Законодавством України передбачається контроль вмісту АФВ1 та ЗОН в продуктах харчування та встановлені їхні допустимі концентрації для різних продуктів, призначених для людини і тварин (наказ МОЗ від 13.05.2013 № 368 «Про затвердження Державних гігієнічних правил і норм “Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах”»). Для АФВ1 допустимі концентрації для різних продуктів коливаються у межах від 2 до 12 мкг/кг, для продуктів дитячого харчування – 0,1 мкг/кг, тоді як для ЗОН – 20–100 мкг/кг для продуктів, призначених для вживання людиною, та 200–450 мкг/кг для тваринних кормів на основі злаків та кукурудзи. Аналіз наявної сьогодні наукової літератури свідчить про те, що визначення та контроль кількості цих мікотоксинів у продуктах харчування – актуальна проблема сучасної аналітичної біотехнології. Зважаючи на це, наступний підрозділ огляду літератури присвячений наявним сьогодні сучасним аналітичним методам визначення мікотоксинів у продуктах харчування та збіжжі.

1.2. Сучасні методи швидкого визначення мікотоксинів: біосенсиори

Сьогодні традиційні аналітичні процедури визначення мікотоксинів поступово замінюються більш швидкими та простими методами визначення. Попри те, що хроматографічні (тонкошарова хроматографія – ТШХ [62], високоефективна рідинна хроматографія – ВЕРХ [9]) та імунохімічні методи [10] залишаються золотим стандартом визначення мікотоксинів та є відносно недорогими та надійними, нові швидкі методи набувають все більшої популярності. Адже, коли мова йде про швидкий аналіз зразків у польових умовах або в місцях зберігання сировини, продуктів та кормів, використання традиційних методів дуже обмежене. У цьому випадку найефективніше використовувати прості, швидкі та не менш надійні методи, які сьогодні представлені різноманітними біосенсорними пристроями для визначення мікотоксинів. Біосенсиори для визначення мікотоксинів можна розділи за типом перетворювача сигналу на такі групи: оптичні (колориметричні, на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) та флуоресцентні), п'єзоелектричні (на основі кварцових резонаторів) та електрохімічні (імпедіометричні, потенціометричні та амперометричні) [63]. При цьому, ферменти, антитіла, аптамери, та все більше МПП найчастіше використовуються як чутливі елементи для таких сенсорів [64].

1.2.1. Електрохімічні сенсори для визначення мікотоксинів.

Особливість електрохімічних сенсорів полягає у тому, що результатом взаємодії біоселективного елемента з аналітом є електричний сигнал, який може бути зареєстрований електрохімічним перетворювачем. Залежно від природи електричного сигналу такі сенсори можна розділити на кондуктометричні (реєструють зміну провідності між двома електродами), потенціометричні (визначають зміну потенціалу) та амперометричні (реєструють зміну струму в

результаті електрохімічної реакції). Електрохімічні сенсори мають ряд переваг: чутливість та селективність, можливість зменшення розмірів приладу та проведення аналізу поза межами лабораторії. Саме до класу електрохімічних сенсорів належать глюкометри, які досягли найбільш успішної комерціалізації. Тому електрохімічні перетворювачі широко використовуються у біоаналітичній хімії, у тому числі, для розробки сенсорів для визначення мікотоксинів [65].

Традиційно електрохімічні біосенсори складаються з трьох або двох електродів: робочого (з нанесеним біологічним матеріалом), електроду порівняння і допоміжного електроду. Для створення потенціометричних біосенсорів використовують іон-селективні електроди або іон-селективні польові транзистори. На основі диференційної вольтаметрії та непрямого конкурентного ІФА за використання ферментної мітки, Azri F. з співавторами створили потенціометричний імуносенсор для виявлення АФВ1 в екстрактах арахісу. Лінійний динамічний діапазон визначення розробленого імуносенсора становив 0,0001–10 нг/мл, а межа визначення – 0,3 пг/мл [13]. Натомість Yan X. та He B. створили потенціометричний міточний сенсор на основі аптамеру для виявлення ЗОН. Використовуючи модифіковані золоті електроди та диференційну вольтаметрію їм вдалося виявляти ЗОН в зразках кукурудзяного борошна. Межа визначення ЗОН в оптимізованих умовах становила 0,105 пг/мл [66]. Проте, практичне використання потенціометричних біосенсорів обмежується складом аналізованого зразку, оскільки результат вимірів дуже залежить від значення рН та буферної ємності аналізованого розчину.

Амперометричні біосенсори – ще один клас електрохімічних сенсорів, які використовуються для виявлення мікотоксинів. Як і потенціометричні сенсори, вони можуть складатись з двох або трьох електродів. Проте, амперометричний перетворювач вимірює зміну струму, яка виникає в результаті окисно-відновних реакцій на поверхні робочого електроду [67]. Зазвичай робочі електроди виготовляються з інертних матеріалів (Pt, Au). Сьогодні для виробництва електродів також використовують карбонові нанотрубки, графіт та склоподібний

вуглець. Крім того, широкої популярності набули одноразові друковані електроди за рахунок низької вартості та великих масштабів виробництва [63, 68, 69].

З метою виявлення мікотоксинів створено ряд амперометричних біосенсорів на основі антитіл та аптамерів [70–72]. Tang, J. та інші [70] розробили амперометричний сенсор на основі аптамерів та шарів молібдену дисульфід (2D MoS₂) для виявлення ОхА у вині. Крім того, що молібден дисульфід має високу спорідненість до одноланцюгової молекули ДНК, MoS₂ володіє пероксидазоподібною активністю та може посилювати електрохімічний сигнал гідрохінон/бензохінон окисно-відновної системи. На золотих електродах шляхом самозбирання формувались зонди дволанцюгових ДНК (ОхА-аптамер та допоміжна одноланцюгова ДНК). Після появи аналіту, ОхА-аптамери зв'язуються з ОхА, а допоміжна одноланцюгова ДНК взаємодіє з молібден дисульфідом. Таким чином, молібден дисульфід абсорбується на поверхні електроду та каталізує окисно-відновні перетворення гідрохінону в присутності перекису водню і генерує електрохімічний сигнал. Межа визначення ОхА за допомогою розробленого сенсору становила 0,23 пг/мл [70].

Проте, незважаючи на великий потенціал амперометричних біосенсорів, головний недолік цих сенсорів – необхідність процесу відновлення між вимірами, що значно обмежує їхнє використання [64, 73].

1.2.2. П'єзоелектричні сенсори для виявлення мікотоксинів. Для виявлення мікотоксинів та різноманітних патогенів також створюють п'єзоелектричні сенсори на основі кварцових резонаторів [64, 74]. Робота п'єзоелектричних імоносенсорів ґрунтується на вимірюванні маси об'єкта за допомогою кварцових резонаторів. Кварцові резонатори це пластина кристалу α -кварцу з нанесеними на його поверхню золотими електродами. При накладанні на кварцову пластину змінної напруги, під дією електричного поля виникає

п'єзоефект – механічні коливання пластини кристалу. На поверхні кварцової пластини нанесено сенсорний шар з іммобілізованими біомолекулами (антитіла, аптамери). За наявності аналіту, та, в результаті, його молекулярного розпізнавання, збільшується вага сенсорного шару, що викликає зміну частоти коливань. Зміна частоти коливань кварцових резонаторів реєструється золотими електродами та є пропорційною кількості аналіту, який зв'язався з сенсорним шаром [75].

Ertekin Ö. та інші створили безміточний імуносенсор на основі кварцових резонаторів для виявлення АФВ1. Вчені змогли виявляти АФВ1 з межею визначення 1,625 нг/мл. Вони використали моноклональні імуноглобуліни А для високочутливого виявлення згаданого токсину [14]. Крім того, іншими групами науковців були розроблені імуносенсиори на основі кварцових резонаторів для виявлення АФВ1 в зразках рису та пшениці [76] та ОхА у червоному вині [77].

На жаль, використання п'єзоелектричних сенсорів залишається обмеженим, оскільки для таких сенсорів характерний високий фоновий сигнал, який створює перешкоди для проведення високочутливих вимірів. Крім того, п'єзоелектричні сенсори потребують етапу регенерації між різними вимірами, що збільшує час аналізу та може впливати на точність результатів [78].

1.2.3. Оптичні сенсори для визначення мікотоксинів. Оптичний біосенсор – це компактний аналітичний пристрій, який містить біологічний чутливий елемент, інтегрований із оптичним перетворювачем. В залежності від сигналу, який генерується в результаті біорозпізнавання, оптичні біосенсиори можна розділити на колориметричні, флуоресцентні, хемілюмінесцентні та на основі ППР. Порівняно до інших типів біосенсорних пристроїв, оптичні сенсори мають багато переваг: простота, висока чутливість та селективність [79, 80].

Біосенсиори на основі ППР широко використовуються для розробки швидких методів визначення мікотоксинів [15, 16, 81] завдяки тому, що не

потребують барвника чи флуоресцентної мітки. Вони дозволяють проводити аналіз в режимі реального часу, безпосередньо вимірювати кінетику зв'язування та кількісно оцінювати міжмолекулярні взаємодії [80].

Wei T. з командою розробили імуносенсор на основі ППР для одночасного виявлення АФВ1, ОхА, ЗОН та ДОН у зразках кукурудзи та пшениці. Антитіла до згаданих мікотоксинів були іммобілізовані на поверхні чипа за допомогою самовпорядкованого моношару гідразонових сполук. Після фіксації антитіл на поверхні сенсорного чипа, додавали відповідні антигени. Подію зв'язування антиген-антитіло виявляли за допомогою явища ППР. За допомогою розробленого ППР сенсора вдалося виявляти мікотоксини з межею визначення 0,59 нг/мл, 1,27 нг/мл, 7,07 нг/мл та 3,26 нг/мл, для АФВ1, ОхА, ЗОН та ДОН відповідно. Похибка досліджень була менше ніж 10%. За своїми аналітичними характеристиками розроблений ППР сенсор відповідав характеристикам аналізу за допомогою ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією (ВЕРХ-МС). Проте, на відміну від ВЕРХ-МС, для кількісного аналізу мікотоксинів достатньо було трьох грамів зерна [16].

Не зважаючи на високу чутливість сенсорів на основі ППР, головним їхнім недоліком залишається велика кількість псевдопозитивних результатів, що ускладнює їх успішну комерціалізацію [82].

Наступні за популярністю серед оптичних сенсорних систем – це колориметричні тест-системи. Сьогодні для визначення мікотоксинів на ринку представлені лише колориметричні тест-системи на основі імуноферментного аналізу (ІФА). Комерційно доступні тест-набори на основі ІФА для кількісного визначення мікотоксинів виробляються багатьма компаніями у світі (Sigma, Elabscience, Eurofins, Romer Labs, ELISA Technologies, Cusabio, Astori Tecnica та ін.) [83]. Вони прості у використанні, хоч і потребують лабораторних умов для роботи, час аналізу разом з пробопідготовкою займає від двох до п'яти годин залежно від кількості аналізованих зразків (інкубаційний період може бути зменшений до 15 хвилин). Комерційні ІФА тест-системи використовують

антитіла, як чутливі елементи, та ферментну мітку (пероксидазу хрину/ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин) для створення колориметричного сигналу. Основними недоліками доступних сьогодні ІФА тест-систем є потреба в кількох стадіях промивання та досить довгий час інкубації. Крім того, більшість виробників обмежують перелік продуктів, до аналізу яких можуть бути застосовані їхні тест-системи, з метою уникнення псевдопозитивних результатів [84].

Деякі компанії створюють та реалізують тест-смужки для швидкого якісного моніторингу мікотоксинів у зразках зерна (Sigma, Romer Labs, ELISA Technologies, R-Biopharm та ін.). Пропоновані комерційні тест-смужки для виявлення мікотоксинів працюють за принципом колориметричного імунохроматографічного аналізу. В якості кольорової мітки в більшості комерційних тест-смужок використовують наночастинки золота, якими мітять антитіла. Оскільки, як відомо [85], залежно від розміру наночастинки, в результаті контрольованої агрегації (реакції антиген-антитіло) може змінюватись колір (від рожевого до фіолетового або блідо-блакитного). Так, компанією R-Biopharm створено тест-смужки RIDA®QUICK для кількісного імунохроматографічного аналізу деяких мікотоксинів: АФВ1, ЗОН, ОхА та ін. Якісний аналіз за допомогою таких тест-смужок можна провести поза лабораторією, результат аналізу оцінюється неозброєним оком, а час аналізу займає кілька хвилин [86]. Проте, для кількісної оцінки тест-смужок необхідні додаткові аналізатори. Пропоновані аналізатори хоч і можуть одночасно аналізувати до чотирьох тест-смужок (виявляти одночасно чотири різні мікотоксини), але залишаються доволі дорогими, як і самі тест-смужки. Сьогодні лише одна компанія пропонує використовувати для кількісного аналізу своїх тест-смужок не додатковий аналізатор, а смартфон. Компанія R-Biopharm розробила та пропонує своїм клієнтам мобільний застосунок RIDA®SMART для кількісного аналізу кольорового сигналу, який здатний за 3–5 хвилин оцінювати рівень забруднення зразків афлатоксинами, зеараленоном, токсином Т2 [83, 87].

Хоча сьогодні доступна велика кількість комерційних імуноферментних тест-систем, вчені продовжують розробки колориметричних сенсорних систем для виявлення мікотоксинів. Основна маса сучасних розробок зосереджена на пошуку більш стабільного та чутливого сенсорного елементу, ніж ферменти та антитіла, на використанні яких ґрунтується ІФА. В літературі описано багато успішних прикладів створення колориметричних тест-систем для виявлення мікотоксинів, зокрема на основі аптамерів. На відміну від антитіл, аптамери більш стабільні, забезпечують високу чутливість та специфічність аналізу [88].

Wu J. з командою створили колориметричний біосенсор для виявлення АФВ1 на основі аптамеру та G-квадруплексів ДНК [89]. G-квадруплекс ДНК (G-4) – це неканонічна гуанін-збагачена послідовність ДНК, яка формує гуанінові тетради за допомогою Гугстинівських водневих зв'язків. G-квадруплекси – це ДНК/РНК-зими з пероксидазоподібною активністю. В порівнянні з білковими пероксидазами, G-квадруплекси мають менший розмір та більшу стабільність [90]. Тому автори використали G-квадруплекси в якості сигнальної мітки. Вони поєднали шпильковий ДНК зонд з екзонуклеазою III (Ехo III), яку використали для підсилення сигналу. Шпильковий ДНК зонд складався з регіону розпізнавання (для взаємодії з АФВ1), стовбура та G-збагаченої послідовності в петлі. За наявності токсину, активувалась екзонуклеаза III, яка розщеплювала шпильковий ДНК зонд. В результаті, утворювались вільні G-квадруплекси, які каталізували окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину та утворення кольорового сигналу. За наявності АФВ1, аналізований розчин забарвлювався у синій колір. Межа визначення розробленого аптасенсора 1 пМ. До недоліків цього методу належить, перш за все, складність схеми аналізу та тривалість самої процедури (лише інкубація триває 40 хвилин), що є типовим для аптасенсорів такого типу (час інкубації в середньому займає 30-70 хвилин) [91, 92].

Незважаючи на велике різноманіття оптичних сенсорів, найбільш популярними серед сучасних розробок є флуориметричні біосенсори. Флуоресцентна спектроскопія – домінуючий дослідницький інструмент у

багатьох галузях аналітичних та біологічних наук [93, 94]. І це не дивно, адже в порівнянні з комерційно доступними ІФА, флуоресцентна спектроскопія забезпечує високочутливий аналіз [95]. Навіть серед традиційних методів виявлення мікотоксинів саме ВЕРХ з флуориметричною детекцією рекомендована Європейським комітетом зі стандартизації (European Standardization Committee) для кількісного визначення мікотоксинів в зернових [96]. Крім того, дослідників приваблює низька вартість та простота використання цього методу.

З метою виявлення мікотоксинів створюють як безміточні флуориметричні сенсори, які ґрунтуються на природній здатності мікотоксинів до флуоресценції [97, 98], так і сенсори на основі флуоресцентних міток [99, 100].

Для покращення колориметричних імуноферментних систем, вчені на чолі з Zhang X. створили імуноферментну систему на основі поляризаційної флуоресценції для виявлення ЗОН. На думку вчених, системи на основі поляризаційної флуоресценції мають більше переваг: вимірювання займає кілька хвилин, відсутній етап промивання, а кількісний результат доступний одразу [101]. Свою тест-систему вони створили на основі моноклональних антитіл до ЗОН та флуоресцентного маркеру. Використовуючи різні маркери, структура яких визначала чутливість методу, оцінили їхнє зв'язування з антитілами та обрали найкращий (6-етилендіамін флуоресцеїнтіокарбаміл – 6-EDF). Використовуючи флуоресцентний маркер 6-EDF, їм вдалося виявляти ЗОН з межею визначення 12 мкг/кг [102].

Власне, аби отримати справді високу чутливість аналізу необхідно додатково використовувати яскраві та стабільні флуоресцентні мітки. На жаль, ті органічні барвники, які доступні сьогодні, мають багато недоліків: гідрофобність, низький квантовий вихід, малий час життя, фотовигорання [103]. Тому сьогодні з погляду підвищення чутливості та подолання обмежень застосування органічних барвників, розробка нових підходів до флуориметричного аналізу – дуже актуальна.

Отже, як можна зрозуміти з вище викладеного, біосенсорні пристрої мають ряд переваг перед класичними методами визначення мікотоксинів: простота аналізу та малий розмір пристрою поряд з високою чутливістю та селективністю. Однак, стабільність більшості чутливих елементів на основі природних біомолекул (ферменти, антитіла, аптамери), які використовуються в сучасних біосенсорних пристроях залишається низькою та потребує покращення. Тому наступний підрозділ огляду літератури буде присвячений сучасним альтернативним та більш стабільним чутливим елементам біосенсорів, зокрема полімерам-біоміметикам.

1.3. Сенсори на основі молекулярно-імпринтованих полімерів

Сьогодні біосенсорні технології – успішна альтернатива традиційним методам визначення різних аналітів. Переважна більшість біосенсорів створена на основі природних біомолекул (ферментів, антитіл та рецепторів). На жаль, практично всі розроблені сьогодні класичні біосенсорні пристрої мають суттєвий недолік, який обумовлений обмеженою стабільністю природних біомолекул. Стабільність за зберігання більшості біосенсорів на основі ферментів, антитіл та рецепторів зазвичай не перевищує 14-30 днів (за температури 4⁰С [104]. Комерційні імунологічні тест-набори на основі природних антитіл також мають обмежений термін придатності (кілька місяців за зберігання при температурі 4⁰С) [84]. Окрім цього такі тест-системи мають високу вартість, і за їхньої допомоги можуть бути проаналізовані далеко не всі зразки, що пов'язано з істотним впливом на результат визначення складу аналізованих зразків. Тому, вчені продовжують пошук альтернативних підходів до розробки біосенсорів, яким властива як більша операційна стабільність, так і стабільність за зберігання. Один з найперспективніших напрямків сучасної біосенсорики

передбачає заміну біомолекул в складі біосенсора їхніми штучними аналогами – молекулярно-імпринтованими полімерами (МІП) [105]. МІП ще називають полімерами-біоміметиками, оскільки вони імітують активні сайти природних рецепторів чи антитіл. Чутливі елементи біосенсорів на основі МІП мають високу стабільність, що дозволяє використовувати їх впродовж тривалого часу. МІП можуть використовуватись за екстремальних значень рН аналізованого розчину, підвищеної температури, а також вони не чутливі до наявності у аналізованих зразках органічних розчинників та важких металів. Завдяки високій селективності МІП, зазвичай вплив складу аналізованого зразку на результат аналізу є мінімальним [106]. Більше того, такі чутливі елементи мають низьку вартість і метод їхнього отримання досить простий. Тому, далі буде розглянуто особливості отримання та використання МІП з метою створення чутливих елементів для виявлення мікотоксинів.

1.3.1. Особливості отримання молекулярно-імпринтованих полімерів.

В основі створення МІП – технологія молекулярного імпринтингу, яка передбачає отримання полімерів, зі штучно синтезованими молекулярними «відбитками» до аналітів. Технологія молекулярного імпринтингу – найперспективніший метод отримання штучних антитіл, рецепторів та навіть ферментів, яка вперше була описана ще Wulff G. та Sarhan A. в 1972 році [107]. Ця технологія базується на формуванні сітчастих полімерів навколо молекули-аналіту (матричної молекули). На першому етапі між матричною молекулою та функціональним мономером формується преполімеризаційний комплекс, що є визначальним для подальшого формування штучних рецепторних сайтів у структурі полімеру. Такі комплекси можуть утворюватися за рахунок ковалентних або нековалентних (водневих, іонних, гідрофобних, ван-дер-Ваальсових та ін.) взаємодій. В результаті співполімеризації функціонального і зшиваючого мономеру в присутності молекули-аналіту, утворені комплекси фіксуються в полімерній сітці. Це забезпечує збереження просторового

положення функціональних груп і формування рецепторних сайтів зв'язування. На останньому етапі відбувається видалення молекули аналіту з утвореного полімеру за допомогою екстракції. Після цього у структурі синтезованого полімеру залишаються «молекулярні відбитки» або штучні рецепторні сайти зв'язування, які подібні до молекули аналіту за формою, розміром та розташуванням функціональних груп. Даний підхід дозволяє отримати полімери з «молекулярною пам'яттю», які здатні повторно зв'язувати аналіт, застосований під час синтезу, з високою селективністю, подібно до природних рецепторів чи антитіл [108–111].

Залежно від природи зв'язків у преполімеризаційних комплексах розрізняють ковалентний та нековалентний імпринтинг. Головний недолік ковалентного імпринтингу – необхідність отримання похідної сполуки матричної молекули, яка здатна до ковалентного включення у полімерну сітку, і, відповідно, обмеження у виборі функціональних мономерів [112]. Тому, найчастіше у аналітичній біотехнології використовують МПП, синтезовані шляхом нековалентного імпринтингу. Такий підхід має більше переваг: необмежений вибір функціональних мономерів та матриць, гнучкість взаємодії між матрицею та функціональним мономером і можливість видалення матричних молекул зі сформованого полімеру шляхом екстракції у відповідному розчиннику [108, 109].

Очевидно, що вибір функціонального мономеру (ФМ) – дуже важливий етап успішного імпринтингу. Для вибору ФМ все частіше використовують метод комп'ютерного моделювання (молекулярної динаміки). Використовуючи теоретичні розрахунки для оцінки конформаційної та хімічної взаємодії між матрицею і ФМ в різних співвідношеннях і в різних комбінаціях, можна істотно поліпшити робочі характеристики сенсорів на основі МПП [113, 114]. До того ж такі розрахунки дозволяють оцінити тип взаємодії між матрицею та ФМ, визначити та відібрати комплекси з найвищою енергією зв'язування [115].

Крім, матриці та ФМ, мономерна суміш для синтезу МПП має також містити зшиваючий агент, розчинник, пороутворювач та ініціатор полімеризації. Зшиваючий агент відіграє важливу роль при утворенні структури полімеру під час полімеризації: закріплює функціональні групи у певному просторовому положенні та забезпечує механічну стабільність полімеру. Тому, в якості зшиваючих агентів часто використовують мономери з вінільними або акрилатними групами, бо вони можуть взаємодіяти з функціональними мономерами, яким притаманні різноманітні хімічні властивості [116]. Це забезпечує стабілізацію штучних рецепторних сайтів у просторі з тим, аби розташування функціональних груп у їхньому складі залишалися незмінними тривалий час. Пороутворювач – органічний розчинник, який забезпечує формування структури пор у полімерах-біоміметиках, аби після полімеризації штучні сайти розпізнавання залишались доступними до подальших молекулярних взаємодій [117]. Властивості та якість синтезованих МПП залежать від поєднання різних компонентів мономерної суміші: кількість зшиваючих агентів та розчинника, тип ініціатора полімеризації тощо [117]. Наприклад, з метою отримання макропористих полімерів, полімеризацію проводять у присутності зшиваючого агенту (його вміст може становити до 90 %) та пороутворювача (50 %) [117, 118].

Попри те, що сьогодні існує безліч методів синтезу МПП [119–122], зазвичай, для цього використовують метод полімеризації *in situ*, який ґрунтується на механізмі радикальної полімеризації [123]. Радикальна полімеризація – це утворення полімеру за вільнорадикальним механізмом з подальшим приєднанням молекул мономеру до мікрорадикалу, який росте. Полімеризація проходить або в присутності ініціатора, або за умови опромінення ультрафіолетовим світлом ($\lambda = 200\text{--}400$ нм) [124], або під дією підвищеної температури ($130\text{--}200$ °C) [125, 126]. Сьогодні проведення радикальної полімеризації можливе для більшості вінільних, вініліденових, дієнових мономерів, а також для деяких циклічних сполук [116]. В результаті, вільнорадикальної полімеризації отримують суцільний твердий полімер, який

подрібнюють для отримання полімерних частинок. Однак, МПП, синтезовані у вигляді полімерних частинок мають ряд недоліків: вони потребують додаткового етапу подрібнення полімеру, під час чого втрачається велика кількість синтезованих рецепторних сайтів. Крім того, існують труднощі іммобілізації таких частинок на поверхні фізичних перетворювачів під час створення біосенсорних пристроїв на їхній основі [111, 127]. Зважаючи на це, для синтезу МПП також використовують преципітаційну полімеризацію, емульсійну полімеризацію, твердофазну полімеризацію, прищеплену-полімеризацію та електрополімеризацію безпосередньо на поверхні електродів [119–122, 128].

Обраний метод полімеризації визначає форму синтезованих МПП, яка може бути доволі різною та залежить від подальшого застосування МПП. Сьогодні МПП можуть створювати у вигляді блоків (монолітів) [123], мікро- чи наносфер [121, 122], тонких плівок чи мембран [129, 111]. Тому, зважаючи на велике різноманіття МПП, далі буде доцільно розглянути особливості створення та використання МПП селективних до мікотоксинів.

1.3.2. Використання методу молекулярного імпринтингу для створення штучних аналогів біологічних рецепторів для визначення мікотоксинів. За останні роки кількість публікацій, які стосуються створення МПП та їхнього використання в біосенсориці та біоаналітичній технології, суттєво зросла. Сьогодні МПП, які селективні до мікотоксинів, застосовують у твердофазній екстракції [130, 131], хроматографії [131, 132], та біосенсориці [18, 25].

Зважаючи на високу вартість мікотоксинів та їхню токсичність, для отримання мікотоксин-селективних МПП, дуже часто використовують не токсини, а їхні безпечні аналоги – псевдоматриці, які близькі до них за структурою [133, 134]. Так, для синтезу ЗОН-селективних МПП запропоновано використати псевдоматрицю циклододецил-дигідробензоат (ЦДГБ), а в якості

функціональних мономерів – 1-алілпіпезин (1-АЛП), 2-гідроксиетилметакрилат (ГЕМА), 4-вінілпіридин (4-ВП), або диетиламіноетилметакрилат (ДЕАЕМ) [131]. За допомогою методу повної радикальної полімеризації, автори отримали МПП частинки розміром 25–50 мкм, які використали в якості альтернативи антитілам в імуноафінних колонках: для екстракції та очистки ЗОН перед подальшим аналізом [131, 135].

За допомогою методу радикальної полімеризації було також створено полімерні частинки селективні до АФВ1 та ОхА, які було використано для флуориметричного аналізу згаданих мікотоксинів у поєднанні з системою ToxiQuant T1. Для синтезу АФВ1-селективних частинок використовували ФМ – N,N'-метилєнбісакриламід (МБА), зшивач – етиленгліколь диметакрилат та ініціатор полімеризації – 1,1-азобіс (циклогексанкарбонітрил). При цьому матрична молекула не використовувалась взагалі, а функціональний мономер обирали методом комп'ютерного моделювання, враховуючи його енергію взаємодії з АФВ1. Синтезовані полімерні частинки розміром 25–63 мкм, 63–125 мкм та 125–200 мкм поміщали в колонки для твердофазної екстракції, розміщені в системі ToxiQuant T1. В результаті, авторам вдалося виявляти АФВ1 у концентраціях від 10 до 200 нг/мл [136].

Проте, як вже зазначалось, синтез МПП у вигляді полімерних частинок має кілька суттєвих недоліків, що обмежують їхнє використання у біосенсоріці. Ці недоліки зумовлені необхідністю подрібнення полімеру, в результаті чого велика кількість синтезованих рецепторних сайтів пошкоджується або втрачається взагалі, та формою полімерної частинки, яку дуже складно іммобілізувати на поверхні фізичних перетворювачів під час створення мініатюрних високочутливих біосенсорних пристроїв. Тому, для створення чутливих елементів біосенсорів для визначення мікотоксинів використовують МПП синтезовані у формі тонких плівок [25, 137, 138], або мембран [17, 134, 127].

Група науковців показала можливість створення ППР сенсора на основі молекулярно-імпринтованих чипів для високоселективного виявлення ДОН.

Sung-Wook Choi з командою створили синтетичні рецептори до ДОН у вигляді молекулярно-імпринтованої поліпіролової плівки, яку синтезували на поверхні золотих чипів за допомогою методу електрополімеризації. Селективність синтетичних рецепторів до ДОН та його ацетильованих структурних аналогів (3-ацетилдезоксиніваленол та 15-ацетилдезоксиніваленол) становила 100 %, 19 %, та 44 %, відповідно. Крім високої селективності, розроблений ППР сенсор володів також високою чутливістю: межа визначення дорівнювала 1 нг/мл [25].

Крім того, сьогодні запропоновано більш зручний метод синтезу МІП – у вигляді мембран із застосуванням методу полімеризації *in situ* [127]. Використовуючи цей метод, можна отримати тонкі, гнучкі, механічно стабільні плівки, які мають у своїй структурі штучні рецепторні сайти до певного аналіту. Зокрема, Сергєєвою Т.А. зі співавторами показана можливість отримання АФВ1-селективних МІП мембран, які синтезували використовуючи не токсин, а його структурний аналог – псевдоматрицю етил-2-оксоциклопентанкарбонову кислоту [134, 17]. Авторами показана можливість використання таких мембран у твердофазовій екстракції, а також для створення простих та надійних біосенсорних систем для виявлення харчових мікотоксинів та інших аналітів [139, 18].

Останніми роками в молекулярному імпринтингу популярним стало використання досягнень сучасних нанотехнологій [140, 141]. Поєднавши МІП та квантові точки, Fang G. з командою створили флуоресцентний метод для високоселективного визначення ЗОН. Для синтезу ЗОН-селективних МІП автори використали не токсин, а його безпечний структурний аналог – ЦДГБ [141, 131]. Крім того, мономерна суміш містила метакрилову кислоту (ФМ), етиленгліколь диметакрилат (зшиваючий агент), 2,2-азобізізобутиронітрил (ініціатор полімеризації). За допомогою термоініційованої вільнорадикальної полімеризації синтезували МІП на поверхні стабілізованих CdSe/ZnS квантових точок. В результаті, селективного зв'язування ЗОН з МІП, флуоресценція квантових точок зменшувалась та була обернено пропорційна до концентрації токсину в

зразку. За оптимальних умов ЗОН виявляли в межах від 0,003 до 3,12 мкМ/л, а межа визначення дорівнювала 0,002 мкМ/л. Створений флуоресцентний сенсор успішно виявляв ЗОН у зразках кукурудзяного, рисового та пшеничного борошна. Крім того, створені МІП були високоселективними лише відносно ЗОН, на відміну від інших мікотоксинів (ДОН, ОхА) [141].

Як видно з сучасної наукової літератури, технології молекулярного імпринтингу наразі швидко та активно розвиваються, що, власне, є найкращим доказом їхньої перспективності. І це не дивно, адже чутливі елементи, створені на основі МІП, володіють високою чутливістю та селективністю, подібно до характеристик чутливих елементів сенсорів на основі природних біомолекул, при цьому стабільність штучних рецепторів та антитіл в десятки-сотні разів вища порівняно до природних біомолекул. Крім того, МІП значно дешевші за природні антитіла, для виробництва яких потрібні тварини. Утримання та щеплення тварин, виділення та очищення антитіл, їхнє зберігання та транспортування передбачають великі витрати, яких не потребують виробники МІП матеріалів. Тому, великі хімічні компанії як Sigma Aldrich вже довгий час виробляють та реалізують МІП для розділення різних речовин в псевдо-імунохроматографічних колонках [26].

Отже, МІП, селективні до мікотоксинів, активно використовуються як для вдосконалення вже існуючих аналітичних методів, так і для створення нових. Сьогодні показана можливість використання МІП не тільки в якості альтернативи антитіл в імуноафінних колонках, а саме для екстракції та очистки мікотоксинів перед подальшим аналізом [142], а також розроблено підходи (синтез та іммобілізація МІП на поверхні наночастинок [143], синтез МІП у вигляді гнучких мембран [127]), які дозволяють легко інтегрувати їх у склад біосенсорного пристрою. Крім того, як було показано раніше [98] синтез МІП у вигляді мембран є нескладним, недорогим та ефективним підходом отримання високоселективних елементів біосенсорних пристроїв для визначення мікотоксинів. При цьому, використання досягнень нанотехнологій та поєднання

наночастинок з молекулярно-імпринтованими структурами може відкрити нові можливості для аналітичної біотехнології: створення високочутливих та селективних сенсорних елементів, які мали б високу стабільність.

1.4. Сенсори на основі смартфонів

Сьогодні споживачі потребують простих, дешевих та надійних інструментів для моніторингу та контролю якості харчових продуктів [144]. Зважаючи на сучасні виклики, нові аналітичні прилади мають відповідати ряду вимог. Новітній аналітичний прилад для тестування поза межами лабораторій має бути «ASSURED» – самозабезпеченим: доступним (**A**ffordable), чутливим (**S**ensitive), специфічним (**S**pecific), простим у використанні (**U**ser-friendly), швидким і надійним (**R**apid and **r**obust), без додаткового обладнання (**E**quipment free) та доступним для споживача (**D**eliverable) [145, 146]. Перспективним напрямком розробки таких приладів вважається створення сенсорів на основі смартфонів. Смартфони вже обладнанні операційною системою, багатоядерним процесором, внутрішньою пам'яттю, перетворювачами, модулем зв'язку та високоякісною камерою. Тому, їх розглядають як чудову альтернативу традиційним фізичним перетворювачам. За рахунок того, що в смартфон вже вбудовані різні функціональні модулі, його можна використовувати як самостійний пристрій для візуалізації та детектування результатів аналізу, так і в поєднанні з іншими аксесуарами в різних сенсорних системах [147]. Сьогодні у світі налічується близько семи мільярдів користувачів смартфонів, тому не дивно, що смартфони в майбутньому будуть перетворені на економні та надзвичайно потужні платформи для різних вимірювань, які досі потребували лабораторного обладнання [148].

Сьогодні вже доступні деякі комерційні тест-системи на основі смартфонів, де телефон використовується для візуалізації результатів (портативний глюкометр на основі смартфона iHealth Align), а також для візуалізації та детектування результатів аналізу (тест-смужки для визначення мікотоксинів RIDA®QUICK та мобільний застосунок для аналізу за допомогою смартфона RIDA®SMART APP від компанії R-Biopharm) [149]. Крім того, в науковій літературі висвітлено велику кількість успішних лабораторних розробок сенсорів на основі смартфонів, які можуть бути комерціалізованими в майбутньому [21–24, 150–152].

За рахунок того, що смартфони обладнані камерами з високою роздільною здатністю, саме колориметричні та флуоресцентні сенсорні системи використовують найчастіше для поєднання та інтеграції зі смартфоном. Такі сенсорні системи не потребують перетворювачів сигналу у вигляді додаткових аксесуарів для смартфона. Для аналізу достатньо лише камери та програми аналізу цифрових зображень. За допомогою камери смартфона можна зробити цифрове зображення, яке потім аналізують за допомогою мобільних застосунків, встановлених на смартфоні. Виявлення та кількісна оцінка аналітів може проводитись шляхом вимірювання характеристик цифрового зображення, залежних від концентрації: зміна кольору, флуоресценція, показник заломлення тощо [148, 149].

В науковій літературі наведено приклади створення колориметричних та флуоресцентних біосенсорів на основі смартфонів для діагностики стану здоров'я [21], моніторингу довкілля та контролю якості харчових продуктів, у тому числі для виявлення мікотоксинів [22–24]. Успішні розробки колориметричних сенсорів на основі смартфонів для виявлення мікотоксинів представлені в роботах, які опублікували Li X. [152] та Chen Y. з колегами [153].

Більше того, група науковців на чолі з Liu Z. створили дворежимний сенсорний пристрій на основі смартфона для виявлення мікотоксинів [154]. Вони створили два типи імунохроматографічних тест-смужок, кожна з яких містила

п'ять тестових ліній для одночасного виявлення АФВ1, ЗОН, Т2 токсину (Т-2), ДОН та фумонізину В1 (ФВ1). Перший тип тест-смужок працював в режимі видимого світла (мітка–золоті наночастинки), другий тип – в режимі флуоресценції (мітка–флуоресцентні мікросфери). Тому, пристрій для смартфона складався з двох оптичних модулів: з білим та ультрафіолетовим світлодіодом. Крім того, автори створили застосунок для смартфона аби спростити та пришвидшити оцінку результатів. В пристрій для смартфона поміщали тест-смужку, яку відповідно до вибраного режиму аналізу в застосунку смартфона, опромінювали білим чи УФ світлом. Надалі отримані зображення аналізували і будували калібрувальні криві в тому ж мобільному застосунку. Вчені також встановили, що флуоресцентні тест-смужки мали більшу чутливість та селективність порівняно до колориметричних. Межа визначення мікотоксинів за допомогою флуоресцентного режиму аналізу дорівнювала 0,42/0,10/0,05/0,75/0,04 мкг/кг для ФВ1/ЗОН/Т-2/ДОН/АФВ1, відповідно [154].

Проте, як вже зазначалось, біосенсиори створені на основі біомолекул (ферментів, антитіл) об'єднані суттєвим недоліком – низька стабільність чутливих елементів за кімнатної температури. Тому, найбільш перспективний напрямок розвитку смарт-сенсорів – створення сенсорів на основі МПП та їхнє поєднання зі смартфоном [155, 156]. Більше того, розробка колориметричних та флуоресцентних біосенсорів є найпростішим підходом для створення сенсорів на основі смартфонів. Оптичні біосенсорні системи на основі МПП та смартфонів вже запропоновані для деяких аналітів [157–159]. Оптичний сенсор на основі МПП та смартфона представили науковці під керівництвом Wang W., які створили сенсор на основі фільтрувального паперу, вкритого шаром МПП для визначення норфлоксацину, який здатен до флуоресценції. Модифікований фільтрувальний папір занурювали в аналізований розчин на кілька хвилин, де відбувались адсорбція цільового аналіту. Після цього паперові смужки висушували та визначали концентрацію норфлоксацину після їхнього опромінення ультрафіолетовим світлом ($\lambda=365$ нм). Флуоресценцію норфлоксацину на поверхні МПП визначали неозброєним оком, а також робили

фотографії за допомогою смартфона, які потім аналізували в програмі Photoshop CS6. Цифрове зображення переводили у відтінки сірого та будували калібрувальну криву залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації норфлораксацину. За допомогою створеного сенсора норфлораксацин виявляли з межею визначення 2,59 нг/мл. Крім того, сенсор апробували на зразках фармацевтичних препаратів. Отримані результати корелювали з результатами аналізу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. На думку розробників такі сенсори можуть замінити високовартісні імунохроматографічні тест-смужки та широко використовуватись для моніторингу довкілля [158].

Отже, сенсори на основі смартфонів – доступні, прості у використанні та надійні інструменти для виявлення різноманітних сполук. Щонайголовніше, такі сенсори не потребують додаткового обладнання та використовують лише смартфон для детектування сигналу та аналізу отриманих сенсорних сигналів. Використання МПП як чутливих елементів сенсорів на основі смартфонів – перспективний напрямок для створення нових аналітичних інструментів у тому числі для виявлення харчових мікотоксинів. Створення ж високоселективних МПП у вигляді мембран – найпростіший спосіб отримати зручні у використанні чутливі елементи без застосування додаткових основ як папір чи інші інертні підкладинки (в тому числі полімерні), адже МПП мембрани здатні не тільки розпізнавати цільові аналіти, а й генерувати оптичні сенсорні відгуки, які можна легко зареєструвати як з використанням лабораторних спектрофотометрів/спектрофлуориметрів, так і за допомогою камери смартфона [134, 18, 17]. Смарт-сенсори на основі МПП мембран можуть мати наступні переваги: низька вартість МПП та їхнє легке виробництво, стабільність і висока чутливість аналізу на їхній основі, нескладна процедура визначення цільових аналітів, відсутність додаткового обладнання та можливість проведення аналізу поза межами лабораторій. Тому, використання МПП для створення простих сенсорів на основі смартфонів – перспективний напрямок створення сучасних аналітичних інструментів для виявлення різноманітних аналітів, у тому числі і мікотоксинів. Крім того, оскільки вже були згадані деякі приклади використання

наноматеріалів для покращення аналітичних характеристик біосенсорів, доцільно буде розглянути більш детально цей аспект. Тому, наступний підрозділ огляду літератури присвячений використанню наноматеріалів для покращення аналітичних характеристик біосенсорів.

1.5. Покращення аналітичних характеристик біосенсорів для визначення мікотоксинів за допомогою наноматеріалів

Сучасні біосенсорні технології постійно розвиваються. Якщо раніше деякі підходи до розробки сенсорів вважались не перспективними, зважаючи на чутливість та селективність розроблених сенсорів у порівнянні з традиційними методами, то сьогодні з розвитком нанотехнологій вдається не лише зрівняти їх за характеристиками, а й зробити сенсори на порядок кращими за традиційні методи. Сьогодні аналітичні технології на основі сенсорів (електрохімічні, оптичні, на основі ППР, та ін.), які використовують чутливі мітки та різноманітні матеріали для підсилення сигналу, активно розробляються та впроваджуються у практику повсякденного визначення мікотоксинів [154, 160, 161]. Серед великої різноманітності сенсорів, саме флуориметричні сенсори використовуються найбільше. Це пояснюється невисокою вартістю таких розробок, їхньою простотою, високою чутливістю та селективністю [95–98, 162, 163].

З метою підсилення сигналу використовують наночастинки різної природи (золоті або срібні наночастинки (AgHЧ) [164, 165]), напівпровідникові квантові точки [166], апконверсійні наночастинки [167], наночастинки органічних полімерів (мікросфери [24], карбонові нанотрубки [168]). У флуоресцентному форматі аналізу наноматеріали можуть виконувати роль як підсилювачів так і гасителів сигналу [169, 164, 165, 162].

Li S. та інші у своїй роботі запропонували три різні типи конкурентного імунохроматографічного аналізу, використовуючи як мітки наночастинки різної природи [170]. Автори використовували колоїдне золото, квантові точки та полістиролові мікросфери як мітки для флуориметричного аналізу ЗОН. Ковалентно зв'язані з антитілами наночастинки виявляли різні оптичні сигнали за присутності ЗОН в аналізованому зразку. Найбільш чутливим (межа визначення 6 мкг/кг) виявився імунохроматографічний аналіз на основі квантових точок та полістиролових мікросфер. Імунохроматографічний аналіз на основі наночастинок колоїдного золота забезпечував визначення ЗОН з межею визначення 60 мкг/кг [170].

При створенні флуоресцентних аптасенсорів для підсилення сигналу широко застосовуються також срібні наноматеріали [171–173]. В порівнянні з іншими наномітками, срібні наноматеріали мають ряд переваг: відсутність токсичності, біосумісність, простий синтез, високий квантовий вихід, фотостабільність [174]. Наноматеріали срібла (наночастинки та нанокластери) – ефективні акцептори у парі резонансного переносу енергії Форстера (FRET). Відповідно до теорії резонансного переносу енергії Фостера, швидкість випромінення та просторовий розподіл випромінення можуть бути змінені за рахунок взаємодії флуорофору з металом, який знаходиться у безпосередній близькості до нього. Такі взаємодії можуть збільшити швидкість збудження та/або випромінення флуорофору [175]. У випадку, коли срібні наноматеріали у парі FRET виконують функцію акцептора, вони інгібують флуоресценцію донора-флуорофора, і найчастіше саме у такій ролі їх використовують для покращення аналітичних характеристик сенсорів для визначення мікотоксинів [166, 176–178].

У флуоресцентному аналізі AgHЧ можуть виконувати подвійну функцію як FRET-акцептор – інгібувати базовий флуоресцентний сигнал мітки, а також виконувати функцію підкладинки для біологічного аналізу та підвищувати ефективність аналізу. Авторами показано, що за використання AgHЧ в якості

підкладки константа швидкості FRET зростала у 21 раз [179]. Використання AgНЧ для покращення чутливості ДНК-сенсора для виявлення ОхА представлено в роботі Wang Ch. [180]. Автори використали FRET-пару: флуоресцентні вуглецеві точки – срібні наночастинки для підвищення флуоресцентного сигналу взаємодії ОхА з аптамером. При наявності токсину в зразку, він зв'язувався з аптамером, збільшуючи відстань між вуглецевими точками та AgНЧ, що збільшувало флуоресцентний сигнал. Авторам вдалося виявляти ОхА в межах 10–5000 нМ, а межа визначення такого ДНК сенсора дорівнювала 8,7 нМ [180].

Крім того, була показана можливість використання срібних наноматеріалів (срібні нанострижні та срібні наносфери) для виявлення афлатоксинів за допомогою підсиленої поверхнею раманівської спектроскопії (SERS). У випадку використання срібних наноматеріалів авторам вдалося виявляти $6,17 \times 10^{-12}$ моль/нГ АФВ1. Відповідно до їхніх результатів, використання срібних наноматеріалів – перспективний шлях покращення наявних методів виявлення мікотоксинів [181, 182].

Проте, за певних умов срібні наноматеріали можуть підсилювати флуоресцентний сигнал флуорофору. Таке явище має назву плазмонне (металеве) підсилення флуоресценції, що визначається формою та розміром металевої частинки, а також відстанню між металом та флуорофором [183]. Металеві наночастинки та наноструктури мають гарні оптичні властивості. Завдяки збудженню їхніх локалізованих поверхневих плазмонів світлом, змінюються смуги поглинання поверхневих плазмонів та відбувається підсилення локальних електромагнітних полів. Перекриття спектру випромінювання флуорофору та плазмонного резонансу викликає підсилення флуоресценції [184, 185].

Farcaua С. з командою вдалося збільшити випромінювання флуорофору – Бенгальський рожевий у 28 разів за рахунок його розміщення на відстані 1 нм над срібною напів-оболонкою [186]. AgНЧ часто використовують для

дослідження явища плазмонного підсилення флуоресценції [187, 188]. Згідно з Zhang J. оптимальна відстань між флуорофором та металом за якої спостерігається найбільше підсилення флуоресценції становить 8 нм [179]. Li H. зі співавторами розробили флуоресцентний метод імуноаналізу для визначення імуноглобуліну E (IgE) за допомогою AgНЧ та флуорофору Cu_3 на основі аптамерів [187]. В основі розробленого методу – явище плазмонного підсилення флуоресценції. Імуноаналіз за типом “сендвіч” проводили у два етапи. На першому етапі імуноглобулін E селективно розпізнавався анти-IgE антитілами. На другому етапі до аналізованого розчину додавали гібридну мітку з AgНЧ та флуорофору Cu_3 на основі аптамерів. Відстань між AgНЧ та флуорофором становила 8 нм та регулювалась за допомогою довжини аптамеру. За рахунок підсилення флуоресценції флуорофору Cu_3 , авторам вдалося виявляти IgE з межею визначення 40 пг/мл (211 фМ). Лінійний динамічний діапазон визначення становив 0,49–1000 нг/мл [187].

Зважаючи на успішне використання срібних наноматеріалів для покращення аналітичних характеристик сенсорів, доцільно їх використати і при розробці флуориметричних сенсорів на основі МІП мембран для визначення мікотоксинів. Використання срібних наночастинок для підсилення флуоресценції мікотоксинів може дозволити значно знизити межу виявлення мікотоксинів. В результаті чого розроблені сенсори зможуть конкурувати з найбільш чутливими традиційними методами на основі мас-спектроскопії.

Отже, АФВ1 та ЗОН – належать до найбільш поширених та небезпечних забруднювачів харчових продуктів. Тому, визначення та контроль цих мікотоксинів в продуктах харчування – актуальна проблема сьогодення. Зважаючи на успіхи пов’язані з розвитком біосенсорних технологій, та недоліки традиційних методів визначення мікотоксинів, доцільно створювати нові біосенсори для визначення АФВ1 та ЗОН. Один з найперспективніших методів створення сучасних біосенсорів – розробка сенсорів на основі штучних аналогів біологічних рецепторів, які отримують у вигляді молекулярно-імпринтованих

полімерів-біоміметиків. Крім того, ще одним ефективним підходом до створення біосенсорів нового покоління є використання смартфонів у ролі детектора і аналізатора. Так, смарт-сенсори на основі МПП мембран поєднують переваги чутливих елементів у вигляді МПП та аналізаторів у вигляді смартфона: низька вартість та нескладне виробництво МПП, їхня стабільність, висока чутливість та селективність, простий аналіз за допомогою смартфона, відсутність додаткового аналізу, та можливість проведення тестування поза межами лабораторії. Крім того, за рахунок використання срібних наноматеріалів можна суттєво покращити аналітичні характеристики біосенсорів, у тому числі флуориметричних сенсорів на основі МПП мембран для визначення мікотоксинів. Як вже зазначалось, наночастинки срібла можна використати для підсилення флуоресценції мікотоксинів, що дозволить створити високочутливі біосенсорні пристрої. Розв'язанню цих задач і присвячена дана робота.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та реактиви

У роботі використовували акриламід (АА), 2-акриламід-2-метилпропансульфонову кислоту (АМПСК), аліламін, 1-алілпіперазин (1-АЛП), 4-вінілпіридин (4-ВП), 2-гідроксиетилметакрилат (ГЕМА), диетиламіноетилметакрилат (ДЕАЕМ), N,N-диметилформахід (ДМФА), 2,2-диметокси-2-фенілацетофенон (кеталь), етил-2-оксоциклопентан-карбонову кислоту, етиленглікольметакрилатфосфат (ЕГМФ), ітаконову кислоту (ІК), N,N' – метиленбісакриламід (МБА), поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 20 000, 3-етиленглікольдиметакрилат (ТГМ-3). Етил-2-оксоциклопентанкарбонову кислоту було отримано від «Acros» (Гіл, Бельгія). ЕГМФ – від «abcг GmbH» (Карлсруе, Німеччина). Крім того, під час виконання дослідження використовувати ацетонітрил, ацетат натрію, дигідрофосфат натрію, трис(гідроксиметил)амінометан (Трис), хлорид натрію, гідроксид натрію, оцтову кислоту (0,1 М), соляну кислоту (14,8 %), нітрат срібла (І) виробництва «Sigma-Aldrich» (Сент-Люїс, США) зі ступенем очищення $\geq 99\%$; етиловий спирт 96% (ТОВ «ВФК «Біо-Фарма ЛТД»); 3-метакрилоксипропілтриметоксисілан виробництва «Serva» (Гайдельберг, Німеччина); м-дигідроксибензен (резорцинол) виробництва «ТСІ» (Токіо, Японія). Також, у роботі використовували АФВ1, АФГ2, ОхА, ЗОН, бісфенол А (БФА), 17- β -естрадіол отримані від «Sigma-Aldrich» зі ступенем очищення $\geq 99\%$. Всі інші

реактиви (ч.д.а.) було отримано від «Sigma-Aldrich» та використано без додаткового очищення.

Олігоуретанакрилат (ОУА) з молекулярною масою 2600 було синтезовано згідно методики [189], та надано к.х.н. В. Ф. Матюшовим та д.х.н. О.О. Бровко (Інститут хімії високомолекулярних сполук НАНУ). Для синтезу зеараленон-селективних МП мембран використовували псевдоматрицю – циклододецилдигідробензоат (ЦДГБ), яку було синтезовано згідно методики [190], та надано м.н.с. Л.В. Дубей та д.х.н. І. Я. Дубеєм (Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ). Флуоресцентний маркер 2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоату (ПАРА) було синтезовано як описано у роботі [190] та надано м.н.с. Л.В. Дубей та д.х.н. І. Я. Дубеєм (Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ).

Під час виконання роботи використовували аналітичні ваги Kern 770 (Белінген, Німеччина), ультрафіолетову лампу КФ-4М (Саяногорськ, ССРСР), ультрафіолетову лампу “UV/White Light Transilluminator TMW-20” (UVP, Аппленд, США), змішувач (Hook & Tucker Instruments Ltd, Нью-Аддінгтон, Велика Британія), спектрофлуориметр Perkin-Elmer LS 55 (Сір Грін, Велика Британія), спектрофлуориметр Fluoromax_PLUS_PR928P (Horiba, Кіото, Японія), трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230 (JEOL, Токіо, Японія).

Як скляні поверхні для іммобілізації МП та контрольних мембран використовували відшліфовані та попередньо порізані предметні скельця розміром 13×25,4 мм (ПАТ «Склоприлад», Київ, Україна).

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Комп'ютерне моделювання взаємодії цільових мікотоксинів АФВ1 та ЗОН з функціональними мономерами. Попередній вибір

функціональних мономерів, які буде використано для синтезу відповідних АФВ1- або ЗОН-селективних МПІ мембран здійснювали *in silico* з використанням віртуальної бібліотеки функціональних мономерів [98, 191]. Комп'ютерне моделювання було здійснено за допомогою робочої станції від Research Machines (операційна система CentOS 5 GNU/Linux, процесор Core 2 Duo 3,2 ГГц, 4 ГБ) та пакету програмного забезпечення SYBYL 7.3 (Tripos Inc., Сент-Луїс, США). Моделювання функціональних взаємодій функціональний мономер: матриця було проведено к.б.н. О.В. Пілецькою (E. Piletska) та проф. С.А. Пілецьким (S. Piletsky) з університету м. Лестер (Велика Британія) згідно методу, описаного у роботі [98].

2.2.2. Синтез МПІ мембран за допомогою методу радикальної полімеризації *in situ*. МПІ мембрани синтезували, використовуючи метод радикальної полімеризації *in situ*, відповідно до принципів методу молекулярного імпринтингу на основі використання псевдоматриць та методу синтезу напів-взаємопроникних полімерних сіток (напів-ВПС) [127]. Склад мономерних композицій, які використовували для синтезу АФВ1- та ЗОН-селективних МПІ мембран представлені в таблиці 2.1 та 2.2. Основний компонент полімерної сітки – суміш зшиваючого агенту та модифікатора-еластифікатора – суміш ТГМ-3/ОУА у співвідношенні 85:15. Також, мономерні суміші містили ДМФА – розчинник-пороутворювач у кількості 50 мас% відносно загальної маси мономерів та додатковий пороутворювач – ПЕГ з ММ 20 000 у кількості 15 мас% відносно загальної маси мономерів. Всі композиції МПІ мембран містили псевдоматриці (етил-2-оксоциклопентан-карбонову кислоту або циклододецилдигідробензоат), маса яких складала 5 мас% від загальної маси мономерів, які входять до мономерної суміші. Для синтезу МПІ мембран, селективних до АФВ1, використовували наступні функціональні мономері: АА, аліламін, АМПСК, ДЕАЕМ, МБА у співвідношеннях псевдоматриця: функціональний мономер 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Композиції МІП мембран, селективних до афлатоксину В1

Мономер / олігомер	Функціональний мономер																
	АА				ДЕАЕМ				МБА		АМПСК			аліламін			
	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:1	1:2	1:4	1:1	1:2	1:4	1:6
ФМ, мг	9	18	36	54	23,7	47,5	94,9	142,4	19,7	39,4	26,5	53	79,5	7,3	14,6	21,9	29,2
псевдо-матриця, мг	20				20				20		20			20			
ТГМ-3/ ОУА, мг	394	382	364	346	376,3	352,5	305,1	257,6	380,3	360,6	373,5	347	320,5	392,7	385,4	378,1	363,5
ДМФА, мкл	200				200				200		200			200			
ПЕГ, мг	60				60				60		60			60			
кеталь, мг	2				2				2		2			2			

З метою синтезу ЗОН-селективних МІП мембран використовували такі функціональні мономері: ДЕАЕМ, ЕГМФ, МБА, ІК, 1-АЛП, 4-ВП, ГЕМА у співвідношеннях псевдоматриця: функціональний мономер 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 (таблиця 2.2). Кеталь (2,2-диметокси-2-фенілацетофенон) – ініціатор полімеризації (0,5 мас% від всієї маси мономерів) додавали до композиції безпосередньо перед полімеризацією.

Таблиця 2.2

Композиції МІП мембран, селективних до зеараленону

Моно- мер / оліго- мер	Функціональний мономер															
	ДЕАЕМ				ІК				ЕГМФ				МБА			
	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6
ФМ, мг	11.7	23.1	46.2	69.4	8.2	16.2	32.5	48.7	13.11	26.2	52.4	78.7	9.6	19.2	38.5	57.7
ЦДГБ, мг	20				20				20				20			
ТГМ-3/ ОУА, мг	388.4	376.9	353.8	330.6	391.9	383.8	367.5	351.3	386.9	373.8	347.6	321.3	390.4	380.8	361.5	342.3
ДМФА, мкл	200				200				200				200			
ПЕГ, мг	60				60				60				60			
кеталь, мг	2				2				2				2			

Для подальшої оцінки селективності синтезованих МІП мембран, паралельно синтезували контрольні мембрани, які не містять мікотоксин-селективних сайтів зв'язування, з тої ж суміші мономерів, яка була використана для синтезу відповідного МІП, проте не містила псевдоматриці (див. таблиці 2.1–2.2).

Продовження таблиці 2.2

Мономер / олігомер	Функціональний мономер											
	1-АЛП				4-ВП				ГЕМА			
	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6	1:1	1:2	1:4	1:6
ФМ, мг	7,9	15,8	31,5	47,3	6,6	13,1	26,2	39,4	8,2	16,2	32,5	48,7
ЦДГБ, мг	20				20				20			
ТГМ-3/ ОУА, мг	391.1	384.2	368.5	352.7	393.4	387.9	373.8	360.6	391.8	383.8	367.5	351.3
ДМФА, мкл	200				200				200			
ПЕГ, мг	60				60				60			
кеталь, мг	2				2				2			

Всі мономерні суміші полімеризували 30 хвилин між двома скляними пластинами, які розміщували під ультрафіолетовою лампою КФ-4М ($\lambda = 365$ нм, $3,4 \text{ Вт м}^{-2}$). Товщину мембран, яка дорівнювала 60 мкм, забезпечували за допомогою спейсерів з тефлонової плівки, які розміщували по периметру скляних поверхонь.

Після полімеризації з МІП та контрольних мембран видаляли псевдоматриці та компоненти мономерної суміші, які не увійшли до складу полімеру. Це необхідно для отримання у структурі МІП мембран нанорозмірних рецепторних сайтів. Видалення проводили етиловим спиртом в екстракторі Сокслета впродовж 8 годин. Після цього з усіх синтезованих мембран видаляли додатковий пороутворювач ПЕГ з ММ 20 000. Екстракцію ПЕГ з контрольних та

дослідних мембран проводили у дистильованій воді за температури 80⁰С та постійного перемішування, впродовж 8 годин.

Наостанок мембрани після екстракції висушували за кімнатної температури впродовж 12 годин. Для контролю ефективності екстрагування мембрани зважували до та після екстракції. Всі синтезовані мембрани зберігали у конвертах з фільтрувального паперу за кімнатної температури.

2.2.3. Синтез та іммобілізація МІП мембран на скляних поверхнях. Для отримання МІП та контрольних мембран, іммобілізованих на скляних поверхнях, використовували мономерні суміші, склад яких детально описано у розділі 2.2.2. На першому етапі ретельно очищені скляні слайди розміром 13 × 25,4 мм обробляли 10 мкл 1 % розчину 3-метакрил-оксипропілтриметоксисилану.

Склад мономерних сумішей для синтезу МІП та контрольних мембран на скляних поверхнях наведено в таблиці 2.3–2.4. МІП мембрани, у структурі яких формували срібні наночастинки (AgНЧ), отримували з мономерних сумішей, до яких додавали 0,6–291 мМ нітрату срібла (I) (таблиця 2.3–2.4). Приготовані мономерні суміші полімеризували між двома скляними пластинами, розміром 13 × 25,4 мм, одна з яких попередньо активована обробкою розчином 3-метакрил-оксипропілтриметоксисилану, як описано вище. Полімеризацію ініціювали опроміненням ультрафіолетовим світлом ($\lambda=365$ нм, 3,4 Вт м⁻²) та проводили протягом 30 хв під ультрафіолетовою лампою КФ-4М. AgНЧ формувались в структурі МІП мембран *in situ* в результаті відновлення нітрату срібла (I) під час полімеризації.

Як і в попередньому випадку, синтезовані МІП та контрольні мембрани на скляних поверхнях, 8 годин екстрагували в екстракторі Сокслета, після чого ще 8 годин відмивали у дистильованій воді за температури 80⁰С, постійно

перемішуючи. Всі синтезовані на скляних поверхнях МІП зберігали у конвертах з фільтрувального паперу за кімнатної температури.

Таблиця 2.3

Композиції МІП-AgНЧ сенсорних чипів, селективних до афлатоксину В1

Функціональний мономер акриламід (АА)						
Композиція/ співвідношення	матриця, мг	АА, мг	ТГМ- 3/ОУА, мг	ДМФА, мкл	ПЕГ 20,000 мг	кеталь, мг
МІП 1:2	10	9,18	190,9	100	30	0,2
Контроль 1:2	-	9,18	190,9	100	30	0,2

Таблиця 2.4

Композиції МІП-AgНЧ сенсорних чипів, селективних до зеараленону

Функціональний мономер етиленглікольметакрилатфосфат (ЕГМФ)						
Композиція/ співвідношення	мат- риця, мг	ЕГМФ, мг	ТГМ- 3/ОУА, мг	ДМФА, мкл	ПЕГ 20,000 мг	кеталь, мг
МІП 1:2	5	6,55	93,44	50	15	0,2
Контроль 1:2	-	6,55	93,44	50	15	0,2

2.2.4. Визначення концентрації мікотоксинів за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії. З метою кількісного визначення мікотоксинів, зразки МІП та контрольних мембран розміром 13×25,4 мм інкубували у розчинах, які містять цільові мікотоксини, впродовж 12 годин. Для цього використовували модельні розчини об'ємом 10 мл з певною концентрацією

АФВ1 (0,1–500 нг/мл) або ЗОН (1 нг/мл – 80 мкг/мл), які містили 10 % ацетонітрилу для мінімізації впливу неспецифічних гідрофобних взаємодій. Для визначення впливу умов аналізованого середовища на ефективність розпізнавання АФВ1 та ЗОН рецепторними сайтами МПП мембран, проводили визначення цільових мікотоксинів за різних значень рН, концентрації буфера, та концентрації хлориду натрію. Для цього використовували 20 мМ буферні розчини: ацетатний буфер (рН 3,0), ацетатний буфер (рН 4,0), ацетатний буфер (рН 5,0), натрій-фосфатний буфер (рН 6,0), натрій-фосфатний буфер (рН 7,0), трис-НСІ буфер (рН 8,0), трис-НСІ буфер (рН 9,0). Для визначення впливу буферної ємності, проводили визначення за різної концентрації буферних розчинів: від 5 мМ до 50 мМ. З метою визначення впливу концентрацій солі на ефективність розпізнавання АФВ1 та ЗОН до модельних розчинів додавали різні кількості хлориду натрію, щоб забезпечити його кінцеву концентрацію від 5 до 150 мМ. Для побудови калібрувальних графіків, МПП мембрани інкубували у водних розчинах, які містять 10% ацетонітрилу та різні концентрації АФВ1 або ЗОН.

Після інкубування у модельних розчинах, висушені мембрани фіксували у тримачі спектрофлуориметра (Perkin-Elmer LS 55 (Сір Грін, Велика Британія) або Fluoromax_PLUS_PR928P (Horiba, Кіото, Японія)). Усі виміри проводили за кімнатної температури. Збудження флуоресценції АФВ1 здійснювали ультрафіолетовим світлом з довжиною хвилі 365 нм. Спектри флуоресценції реєстрували в діапазоні 395–550 нм, з максимумом при $\lambda=420$ нм. Для збудження флуоресценції ЗОН зразки мембран опромінювали ультрафіолетовим світлом з довжиною хвилі 320 нм. Спектри флуоресценції реєстрували в діапазоні 395–650 нм. Максимум флуоресценції зеараленону спостерігали при $\lambda=464$ нм.

2.2.5. Визначення концентрації мікотоксинів за допомогою смартфона.

Після інкубування МПП мембран з розчинами мікотоксинів, як і в попередньому, випадку їх висушували та розміщували зразки на цупкому картоні чорного

кольору. Збудження флуоресценції мікотоксинів здійснювали за допомогою УФ-трансліюмінатора ($\lambda=365$ нм). Після 1 хв опромінення ультрафіолетовим світлом інтенсивність флуоресценції досягала свого максимуму і в цей момент робили фото мембран за допомогою камери смартфона (Meizu 16, 20 MP, f/1.8, автоматичні налаштування камери) (рис. 2.1). За допомогою штативу (Weifeng, Нінбо, Китай) смартфон розміщували на відстані 10 см під кутом 90^0 від дослідних зразків. Отримані зображення зберігали в форматі JPG з розширенням 4160×3120 пікселів та аналізували за допомогою комерційно доступного застосунку для смартфона на операційній системі Android 6.0+ – Spotxel® Reader, 2.1.5 (Sicasys Software GmbH, Гейдельберг, Німеччина). Застосунок перетворює значення інтенсивності флуоресценції в умовні одиниці, що дозволяє отримати залежності інтенсивності флуоресценції мікотоксинів від їхньої концентрації в зразку.

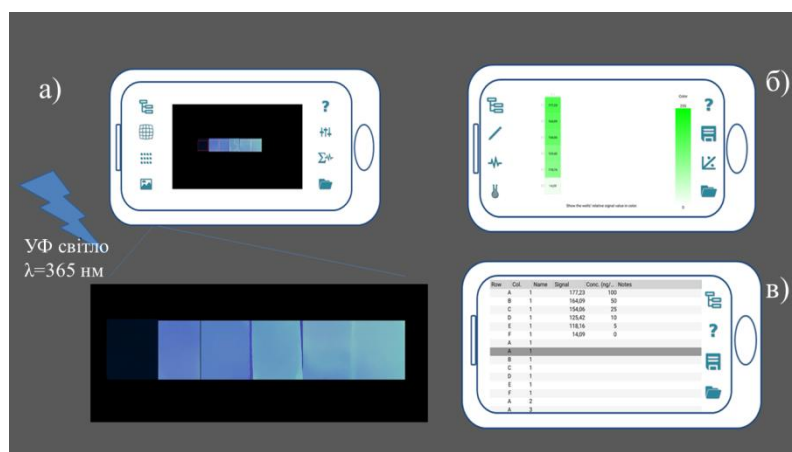


Рис. 2.1. Визначення мікотоксинів за допомогою біосенсорної системи на основі МІП мембран та смартфона: а – реєстрація флуоресцентних сенсорних відгуків з поверхні МІП мембран за допомогою камери смартфона; б – аналіз сенсорних відгуків в мобільному застосунку Spotxel® Reader, 2.1.5; в – приклад результатів аналізу отриманих в мобільному застосунку.

2.2.6. Екстракція та визначення мікотоксинів в реальних зразках. З

метою апробації створених біосенсорних систем використовували два типи

реальних зразків: зразки вільні від мікотоксинів, в які додавали відому концентрацію АФВ1 або ЗОН, та природно-забруднені мікотоксинами зразки меленої кукурудзи (стандартні контрольні зразки) охарактеризовані виробником за допомогою стандартного методу визначення мікотоксинів – рідинної хроматографії у поєднанні з мас-спектрометрією. Зразки вільні від мікотоксинів – пшеничне, житнє та кукурудзяне борошно різних виробників, були куплені в супермаркетах м. Києва (Україна). Стандартні контрольні зразки забруднені мікотоксинами (АФВ1 та ЗОН) були отримані від Romer Labs (Юніон, США), а саме: 1) матеріал контролю якості Афлатоксини в кукурудзі, низький рівень (Quality Control Material 10003612 (QCM1C1)); 2) матеріал контролю якості Афлатоксини в кукурудзі, середній рівень (Quality Control Material 10003613 (QCM1C2)); 3) матеріал контролю якості, Афлатоксини в кукурудзі (CSSMY013 – M17411A); 4) матеріал контролю якості Зеараленон в кукурудзі, низький рівень (Quality Control Material 10003624 (QCM6C1)); 5) матеріал контролю якості Зеараленон в кукурудзі, високий рівень (Quality Control Material 10003626 (QCM6C3)); 6) стандартний контрольний зразок, Зеараленон в борошні (Romer Labs-Check-Sample-Survey CSSMY012-M17161DZ).

АФВ1 та ЗОН екстрагували з реальних зразків згідно методу [192] відповідно до європейських та вітчизняних стандартів визначення мікотоксинів у продуктах харчування. Зразок масою 1 г змішували з 10 мл розчину для екстракції: ацетонітрил: вода (86:14 за об'ємом) та інтенсивно перемішували впродовж 10 хв за допомогою змішувача (Hook & Tucker Instruments Ltd, Нью-Аддінгтон, Велика Британія). Отриману суміш фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Whatman 1 (Мейдстоун, Велика Британія). Екстракт змішували з 10 мл розчину для екстракції. Після фільтрації отримані екстракти аналізували щодо наявності у них цільових мікотоксинів за допомогою флуориметричних біосенсорів на основі МІП мембран.

Беручи до уваги міжнародні (UCM612334) та українські стандарти (ДСТУ ISO 14718:2006, ДСТУ ISO 6870:2006) визначення мікотоксинів, аналіз

отриманих екстрактів проводили за наступною схемою. На першому етапі будували калібрувальні криві для біосенсорної системи як залежність величини сенсорного відгуку від концентрації аналіту та за їх допомогою визначали концентрацію мікотоксинів у реальних зразках. Надалі отримані концентрації (нг/мл або мкг/мл) перераховували у кількість мікотоксинів у реальних зразках (у мкг/кг зразку). Для цього використовували формулу:

$$C \times V_1 / k \times V_2 \times m ,$$

де C – концентрація мікотоксинів визначена за допомогою калібрувальних кривих, V_1 – об'єм отриманого екстракту, V_2 – об'єм зразку, k – коефіцієнт екстракції мікотоксинів в органічних розчинниках ($k=20,6$ для АФВ1, $k=19,85$ для ЗОН в ацетонітрилі), m – маса зразку.

2.2.7. Трансмісійна електронна мікроскопія. Дослідження морфології та розміру AgНЧ, які було отримано в структурі МІП мембран під час їхнього синтезу, досліджували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). З цією метою готували препарати МІП мембран, які містять у своїй структурі AgНЧ, на мідних ґратках. Для цього мідну ґратку (розміром 3 мм) розміщували на скляній поверхні (розміром $13 \times 25,4$ мм). Мономерні суміші для синтезу відповідних АФВ1- або ЗОН-селективних МІП мембран містили 1,5 та 59 мМ нітрату срібла I, відповідно (склад мономерних сумішей наведено у таблицях 2.3–2.4). На поверхню мідної ґратки наносили 0,5 мкл мономерної суміші, полімеризацію проводили між двома скляними пластинами, як описано вище (див. пункт 2.2.2). Отримані на мідних ґратках препарати МІП мембран з вбудованими AgНЧ аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу (JEM-1230, JEOL, Токіо, Японія, 50–120 кВ).

2.2.8. Статистична обробка результатів. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel. Визначали показники середнього значення, середнього квадратичного відхилення та середньої квадратичної похибки.

РОЗДІЛ 3

СТВОРЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ЧУТЛИВИХ ЕЛЕМЕНТІВ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ

3.1. Оптимізація складу полімерних композицій для синтезу мікотоксин-селективних полімерів-біоміметиків

Полімери-біоміметики у формі МПП мембран запропоновано використати як основу майбутніх біосенсорних систем для визначення АФВ1 та ЗОН. МПП мембрани зі штучними рецепторними сайтами до згаданих мікотоксинів синтезували з використанням методу радикальної полімеризації *in situ* згідно принципу формування напів-взаємопроникних полімерних сіток [127]. Кожна мономерна композиція, яка була використана для синтезу відповідних МПП, містила основні компоненти майбутніх мембран: псевдоматрицю, функціональний мономер (ФМ), органічний розчинник, зшиваючий агент, модифікатор-еластифікатор та додатковий полімерний пороутворювач. Тип та вміст перших двох компонентів (псевдоматриця та ФМ) у вихідній композиції для синтезу мембран та їхнє молярне співвідношення потребують оптимізації, оскільки вони є різними для різних аналітів, для яких створюються штучні аналоги біологічних рецепторних сайтів в структурі МПП мембран, на відміну від всіх інших компонентів, які залишаються однаковими для різних МПП та формують основу полімерної сітки.

3.1.1. Вибір псевдоматриць для синтезу АФВ1- та ЗОН-селективних МП мембран. З метою формування штучних сайтів зв'язування мікотоксинів в структурі МП, в класичному варіанті методу молекулярного імпринтингу передбачається використання цих же мікотоксинів під час синтезу МП [193]. Проте, цей підхід має певні недоліки: висока вартість мікотоксинів, можливість отримання псевдопозитивних результатів, пов'язаних з неповним видаленням матричних молекул з полімеру. Тому, в даній роботі використано альтернативний підхід на основі використання псевдоматриць [133]. Псевдоматриці – структурні аналоги відповідних токсинів, які використовували з метою зменшення вартості МП, а також кількості псевдопозитивних результатів подальшого аналізу та збільшенню його чутливості завдяки зниженню фоновій флуоресценції МП мембран. Зважаючи на це, для синтезу АФВ1-селективних МП мембран використовували псевдоматрицю етил-2-оксоциклопентан-карбонову кислоту (рис. 3.1.а), яка імітує кетано-лактонову частину молекули афлатоксину В1, ефективність застосування якої була доведена раніше [98].

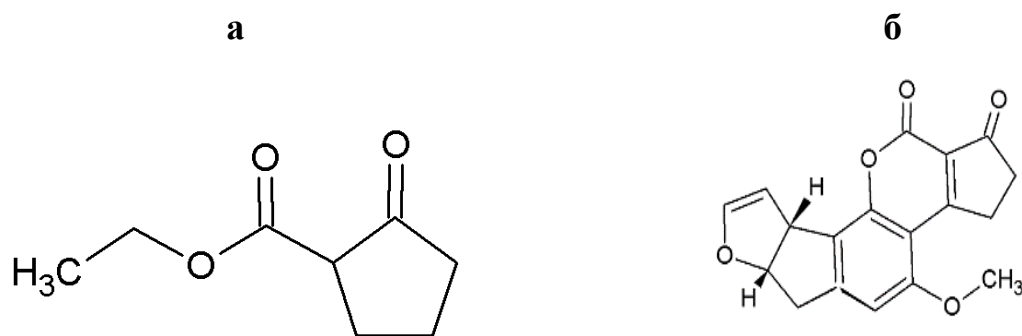


Рис. 3.1. Структура псевдоматриці – етил-2-оксоциклопентан-карбонової кислоти (а) та АФВ1 (б).

В результаті аналізу даних літератури [119, 191] для синтезу МП мембран селективних до ЗОН, було використано псевдоматрицю –

циклододецилдигідробензоат (ЦДГБ), яка подібна за формою та розміром до молекули ЗОН (рис. 3.2).

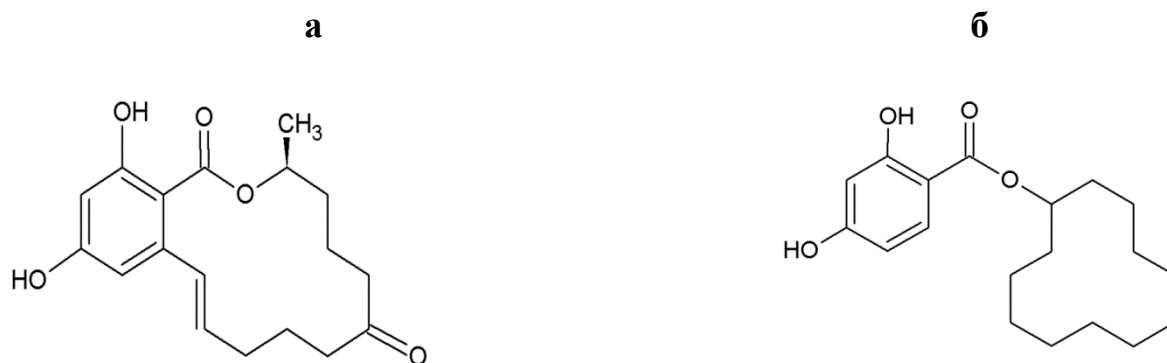


Рис. 3.2. Структура ЗОН (а) та псевдоматриці – циклододецилдигідробензоату (б).

Отже, для синтезу мікотоксин-селективних МІП використовували псевдоматриці – етил-2-оксоциклопентан-карбонову кислоту та ЦДГБ, які за своєю структурою подібні до АФВ1 та ЗОН, відповідно.

3.1.2. Вибір функціональних мономерів для синтезу АФВ1- та ЗОН-селективних МІП мембран. Створення сенсорної системи на основі полімерів-біоміметиків починається з дизайну штучних рецепторних сайтів, які формуватимуться в структурі МІП мембран та матимуть найвищу афінність до цільового аналіту. Для цього використовували метод комп'ютерного моделювання [98, 193], який дозволяє оцінити сили взаємодії між потенційними функціональними мономерами та аналітом, а також візуалізувати структуру цих комплексів, що допоможе передбачити структуру штучних рецепторних сайтів зв'язування, сформованих в структурі майбутніх МІП мембран.

На першому етапі роботи, віртуальну бібліотеку потенційних функціональних мономерів, які могли б утворювати міцні комплекси з АФВ1 і ЗОН за допомогою нековалентних взаємодій та вбудовуватись до складу

полімерної сітки за рахунок наявності подвійних зв'язків у їхній структурі [194, 98, 191] аналізували за допомогою методу комп'ютерного моделювання у співпраці з к.б.н. Пілецькою О.В. та проф. Пілецьким С.А. з університету м. Лестер (Велика Британія). Всі функціональні мономери, що увійшли до бібліотеки, добре розчинні в органічних розчинниках, що також необхідно для успішного імпринтингу.

Раніше у відділі, під час створення МІП для твердофазової екстракції було показано, що найвищі енергії взаємодії з АФВ1 мали аліламін (-60,30 кКал/моль), ДЕАЕМ (-34,37 кКал/моль), МБА (-32,26 кКал/моль), АА (-27,11 кКал/моль) та АМПСК (-19,06 кКал/моль) [98]. Тому, використовуючи ФМ, які мали найвищі енергії взаємодії з молекулою АФВ1, було синтезовано серії контрольних та дослідних мембран. Згідно результатів комп'ютерного моделювання комплекс АФВ1-ФМ утворюється за участі однієї молекули функціонального мономера, тобто молярне співвідношення у мономерній суміші має становити 1:1, проте до складу полімерної сітки зазвичай входить менше молекул ФМ, ніж це може бути передбачено теоретично [195, 196]. Тому, для зменшення ймовірності формування штучних рецепторних сайтів зв'язування, до складу яких не увійшла молекула функціонального мономера, у вихідній мономерній суміші ФМ має бути присутнім у надлишку. Перші серії МІП та контрольних синтезували з мономерних сумішей, у яких молярне співвідношення псевдоматриця: ФМ становило 1:2.

Відповідно до результатів комп'ютерного моделювання: ДЕАЕМ, ЕГМФ, ІК, МК, МБА використовували як функціональні мономери для синтезу ЗОН-селективних МІП мембран. Оскільки вони забезпечують високі енергії взаємодії з цільовим мікотоксином (від -28,36 до -50,57 кКал/моль): ЕГМФ – -50,57 кКал/моль, ІК – -38,21 кКал/моль, ДЕАЕМ – -30,52 кКал/моль, МБА – -28,36 кКал/моль.

Крім того, в результаті аналізу даних літератури було ідентифіковано кілька потенційних ФМ, які також можуть бути успішно використані для створення

ЗОН-селективних МІП [190]. Команда науковців на чолі з Urraka J. [131, 197] використовували 1-АЛП, 4-ВП, ДЕАЕМ та ГЕМА як функціональні мономері для створення МІП для екстракції та очистки зразків, які містять ЗОН, перед подальшим аналізом. Тому, ці ФМ також використали для синтезу ЗОН-селективних МІП мембран.

Отже, для синтезу АФВ1-селективних МІП використовували функціональні мономері аліламін, ДЕАЕМ, МБА, АА та АМПСК. З метою отримання ЗОН-селективних МІП мембран використовували такі функціональні мономері: ЕГМФ, ІК, МК, МБА, 1-АЛП, 4-ВП, ДЕАЕМ та ГЕМА.

3.1.3. Синтез полімерів-біоміметиків у вигляді МІП мембран для виявлення мікотоксинів. Крім псевдоматриці та функціональних мономерів, мономерні композиції містили також такі компоненти: органічний розчинник, зшиваючий агент, модифікатор-еластифікатор та додатковий пороутворювач.

В усіх мономерних композиціях основним компонентом була суміш зшиваючого агенту та модифікатора-еластифікатора – ТГМ-3/ОУА (ММ 2600) у співвідношенні 85:15, яка складала основу полімерних мембран, ефективність якої була доведена раніше для синтезу МІП мембран, що є високоселективними до ряду токсичних аналітів різної хімічної структури [98, 111, 198].

Крім того, до складу мономерних композицій входили диметилформамід – пороутворювач та ПЕГ (ММ 20 000) – додатковий пороутворювач. Ці компоненти необхідні для формування у структурі синтезованих полімерів пор, які спрощують доступ цільових аналітів до штучних рецепторних сайтів зв'язування в структурі МІП мембран.

Метод полімеризації *in situ*, використаний у даній роботі, дозволяє отримати МІП мембрани як у вигляді гнучких мембран без застосування жодних додаткових підкладінок при синтезі, так і у вигляді плівок, що іммобілізовані на інертних поверхнях, наприклад скляних. На рис. 3.4 наведено

фотографію зразків МІП мембран, а також МІП мембран іммобілізованих на скляних поверхнях.

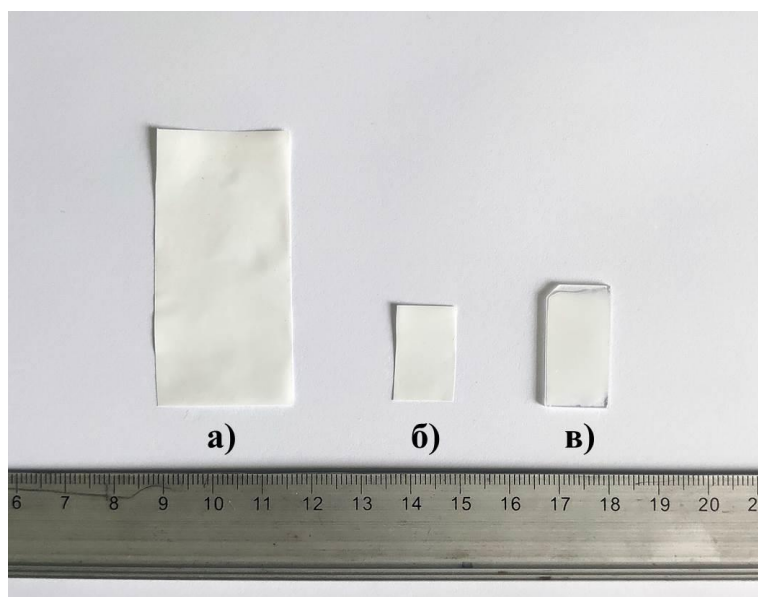


Рис. 3.4. Фотографія зразків МІП мембран, отриманих за відсутності підкладинок (а, б) та іммобілізованих на скляних поверхнях (в).

Отже, було отримано гнучкі мікотоксин-селективні МІП мембрани синтезовані за відсутності підкладинок та мембрани, іммобілізовані на скляних поверхнях, які пізніше будуть використані як чутливі елементи біосенсорних систем для виявлення АФВ1 або ЗОН.

3.2. Оптимізація складу мікотоксин-селективних полімерів-біоміметиків

На наступному етапі за допомогою модельних розчинів оцінювали здатність синтезованих МІП мембран селективно зв'язувати АФВ1 або ЗОН, та обирали функціональний мономер, який забезпечує формування найбільш селективних

сайтів зв'язування. Всі синтезовані мембрани інкубували у розчинах з відомою концентрацією АФВ1 або ЗОН, в процесі чого відбувалось селективне розпізнавання та зв'язування молекул аналітів штучними рецепторними сайтами, сформованими у структурі полімеру.

Флуоресцентні сенсорні відгуки генерували, опромінюючи такі мембрани УФ світлом, та реєстрували за допомогою флуориметра безпосередньо на поверхні МПП мембран. Здатність синтезованих МПП мембран селективно зв'язувати цільовий мікотоксин оцінювали порівнюючи показники диференційних сенсорних відгуків (ДСВ). Величину диференційного сенсорного відгуку визначали як різницю у інтенсивності флуоресценції контрольних та МПП мембран однакового складу.

3.2.1. Вибір ФМ та оптимального співвідношення псевдоматриця : ФМ у мономерній суміші для синтезу АФВ1-селективних МПП мембран. Показано (рис.3.5), що найвищі значення ДСВ були виявлені для АФВ1-селективних сенсорних систем на основі МПП мембран, де в якості функціонального мономеру використовували акриламід. Найменші значення ДСВ виявляли біосенсорні системи на основі МПП мембран синтезованих з використанням аліламіну, ДЕАЕМ та МБА.

Отримані результати підтверджують дані, отримані раніше за допомогою методу комп'ютерного моделювання. Як було показано, АА продемонстрував не найвищі енергії взаємодії з АФВ1 (-27,11 кКал/моль), але саме для АА-вмісних МПП мембран спостерігали найвищі значення ДСВ (див. рис. 3.5). Це пов'язано з тим, що відповідно до результатів комп'ютерного моделювання, АА взаємодіє з кетона-лактоною частиною молекули АФВ1, на відміну від аліламіну, ДЕАЕМ та МБА, а рецепторні сайти, утворені за його участі, є просторово комплементарними цільовому аналіту [199].

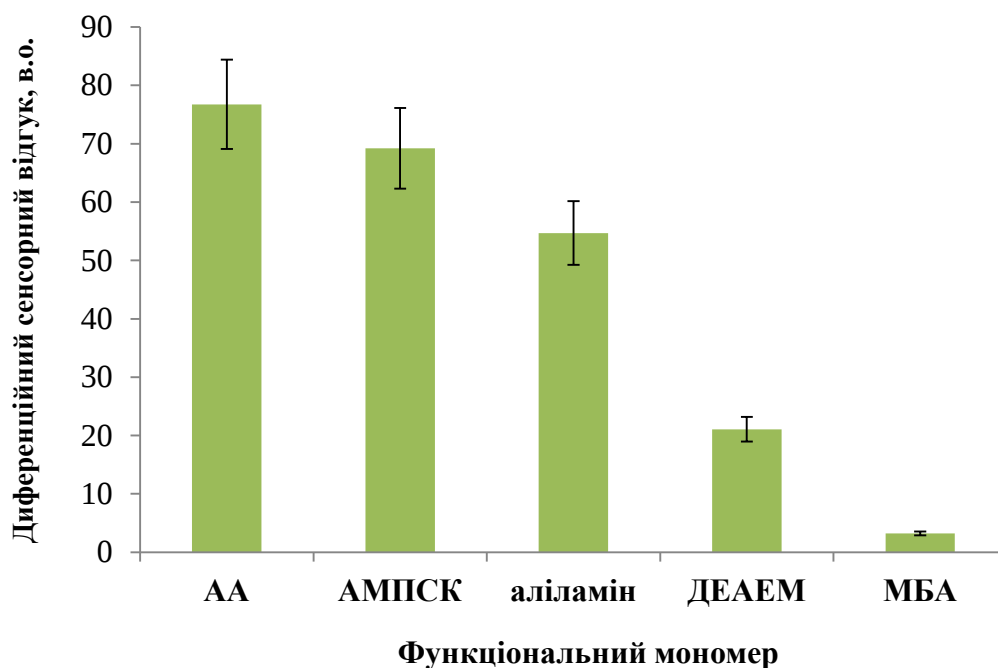


Рис. 3.5. Графік залежності величин ДСВ біосенсорної системи для визначення АФВ1 від типу ФМ, застосованого для формування АФВ1-селективних рецепторних сайтів, у відповідь на додавання 100 нг/мл цільового аналіту. Аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Мономерна суміш для синтезу МПІ мембран містила псевдоматрицю та ФМ у співвідношенні 1:2. Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Крім того, для МПІ мембран, які були синтезовані з використанням АА, оптимізували вміст функціонального мономеру у вихідній мономерній суміші (рис. 3.7).

Показано, що найбільші величини ДСВ у відповідь на додавання АФВ1 були характерні для АА-вмісних МПІ мембран, у яких співвідношення псевдоматриця: функціональний мономер становило 1:2. Збільшення кількості функціонального мономеру у вихідній мономерній суміші (у випадку мембран, синтезованих з мономерних сумішей, у яких співвідношення псевдоматриця: ФМ становило 1:3, 1:4 та 1:5) призводило до значно більшого

зв'язування токсину з контрольними мембранами та, відповідно, зменшення показника ДСВ у відповідь на додавання АФВ1.

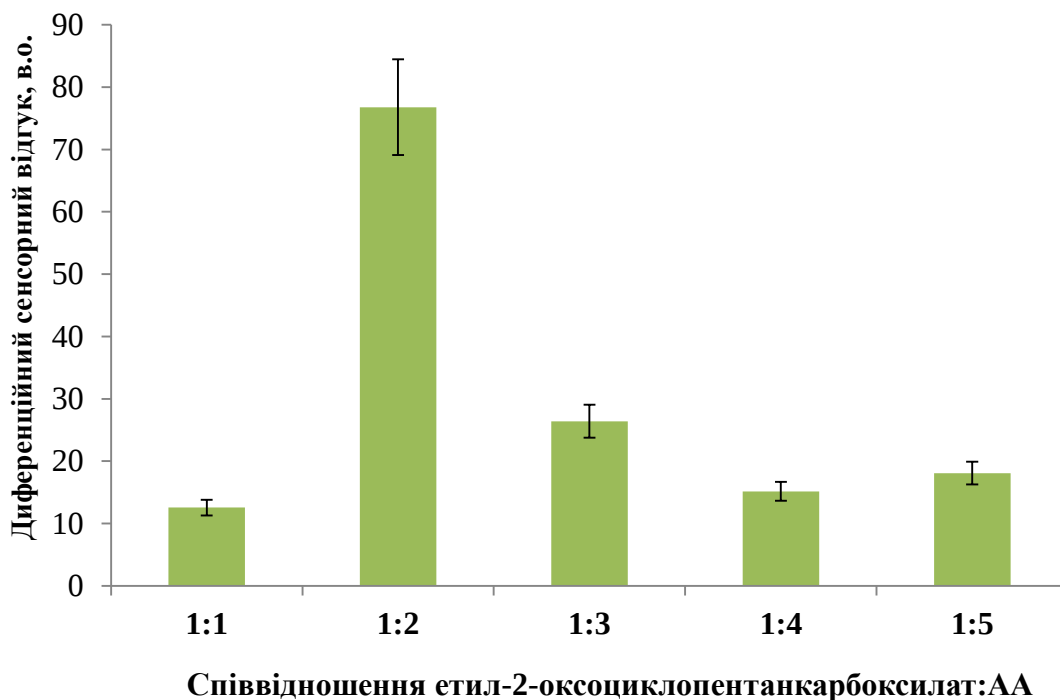


Рис. 3.7. Графік залежності величини ДСВ біосенсорної системи для визначення АФВ1 від співвідношення псевдоматриця: АА у вихідній мономерній суміші у відповідь на додавання 100 нг/мл АФВ1. Аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Отже, найвищі показники диференційних сенсорних відгуків у відповідь на додавання АФВ1 були зафіксовані для МІП мембран, які було синтезовано з використанням функціонального мономеру акриламід, при цьому оптимальне молярне співвідношення псевдоматриця: АА у мономерній суміші для синтезу біоміметика становило 1:2. Тому, АА-вмісні МІП мембрани з оптимізованим складом були використані в наступних дослідженнях.

3.2.2. Вибір ФМ та оптимального співвідношення псевдоматриця: ФМ у мономерній суміші для ЗОН-селективних МІП мембран. Результати оцінки

здатності синтезованих ЗОН-селективних МПІ мембран розпізнавати цільовий мікотоксин представлені на рис. 3.8.

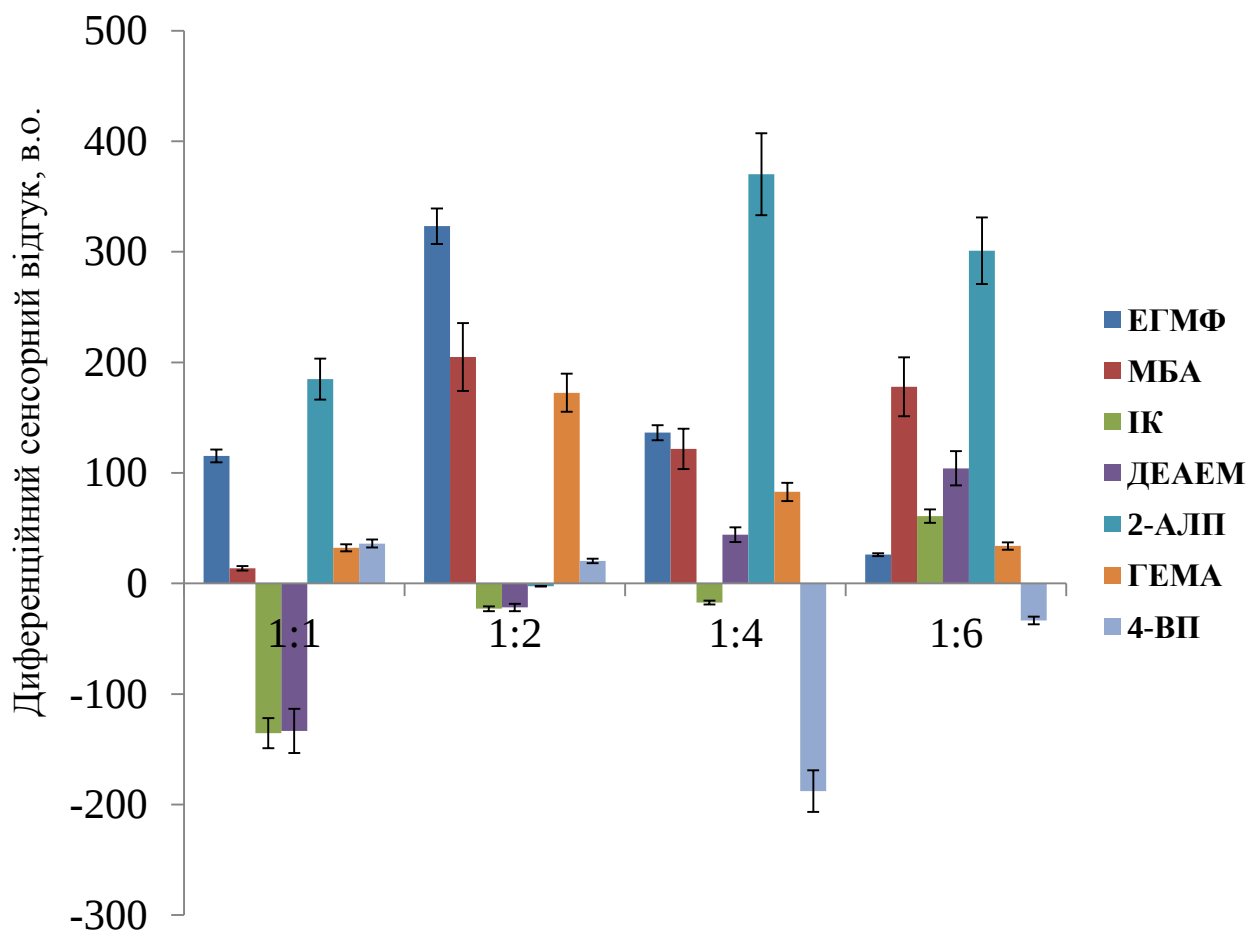


Рис. 3.8. Залежність диференційних сенсорних відгуків біосенсорних систем для визначення ЗОН від типу функціонального мономеру, використаного під час синтезу МПІ мембран у відповідь на додавання 25 мкг/мл ЗОН. Аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Відповідно до отриманих результатів, МПІ мембрани синтезовані на основі функціональних мономерів ЕГМФ, МБА, 1-АЛП та ГЕМА демонстрували ефективне зв'язування ЗОН з аналізованих розчинів, про що свідчать високі показники ДСВ, отримані для цих мембран. Найбільші величини ДСВ спостерігали для МПІ мембран синтезованих з мономерних сумішей, в яких співвідношення псевдоматриця: ФМ не перевищувало 1:4. Натомість для МПІ

мембран, синтезованих з використанням ДЕАЕМ, 4-ВП та ІК у якості функціональних мономерів виявлено низьку здатність селективно зв'язувати ЗОН, зважаючи на переважно низькі та негативні значення ДСВ.

Найвищі величини ДСВ спостерігали для біосенсорної системи на основі МПІ мембран, синтезованих з використанням функціонального мономера 1-АЛП, молярне співвідношення псевдоматриця: 1-АЛП, у яких становило 1:4 (див. рис. 3.8). Подібні значення диференційного сенсорного відгуку були продемонстровані для біосенсорної системи на основі МПІ мембран, синтезованих з використанням ЕГМФ як функціонального мономера, зі співвідношенням псевдоматриця: ФМ 1:2. Отримані результати, відповідають результатам комп'ютерного моделювання (див. табл. 3.2), відповідно до яких етиленглікольметакрилатфосфат мав найвищу енергію зв'язування з молекулою зеараленону (-50,57 кКал/моль). Крім того, було змодельовано структуру молекулярного комплексу між ЗОН та ЕГМФ (рис. 3.9) і показано, що дві молекули ЕГМФ взаємодіють з однією молекулою ЗОН (див. рис. 3.8).

Отже, в подальшій роботі використовували ЗОН-селективні мембрани на основі ЕГМФ та 1-АЛП, молярне співвідношення псевдоматриця: ФМ у яких становило 1:2 та 1:4, відповідно.

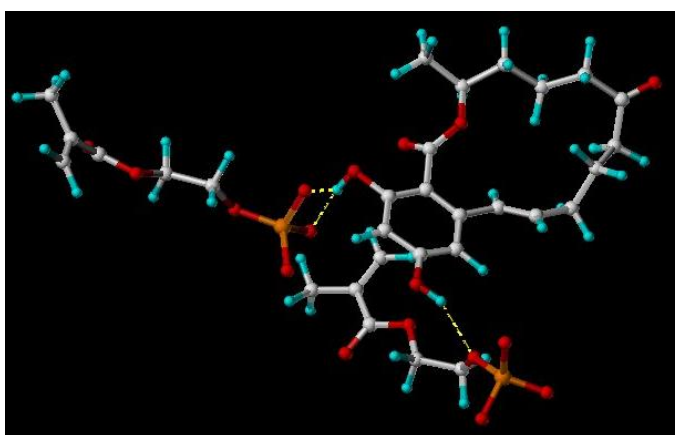


Рис. 3.9. Структура молекулярного комплексу зеараленону з двома молекулами ЕГМФ, отримана методом молекулярної динаміки (робоча станція Research Machines, програмне забезпечення SYBYL 7.3).

3.3. Дослідження оптимальних умов розпізнавання цільових мікотоксинів штучними рецепторними сайтами, сформованими у МІП мембранах

Зважаючи на необхідність використання створених біосенсорних систем для визначення АФВ1 та ЗОН у зразках різних харчових продуктів та тваринних кормах, важливо дослідити вплив умов аналізованого середовища на здатність синтезованих МІП мембран розпізнавати цільовий мікотоксин та визначити оптимальні умови, за яких відбувається таке розпізнавання. Для цього у адсорбційних експериментах досліджували вплив рН аналізованого розчину, концентрації буферу та концентрації хлориду натрію у ньому на величину ДСВ.

3.3.1. Визначення оптимальних умов розпізнавання АФВ1 штучними рецепторними сайтами у складі МІП мембран. Результати визначення впливу умов аналізованого розчину на ефективність розпізнавання АФВ1 рецепторними сайтами в структурі АА-вмісних МІП мембран наведено на рис. 3.10.

Встановлено, що оптимальними значеннями рН аналізованого розчину щодо зв'язування цільового аналіту є нейтральні значення рН (рН 5,0–7,0), адже саме за таких умов спостерігали найвищі показники ДСВ (рис. 3.10.а). У лужному та кислому середовищі (за рН аналізованого розчину 3,0–4,0 та 8,0–9,0) спостерігали суттєве зниження зв'язування АФВ1 мікотоксин-селективними рецепторними сайтами. Для подальших досліджень було обрано натрій-фосфатний буфер з рН 6,0.

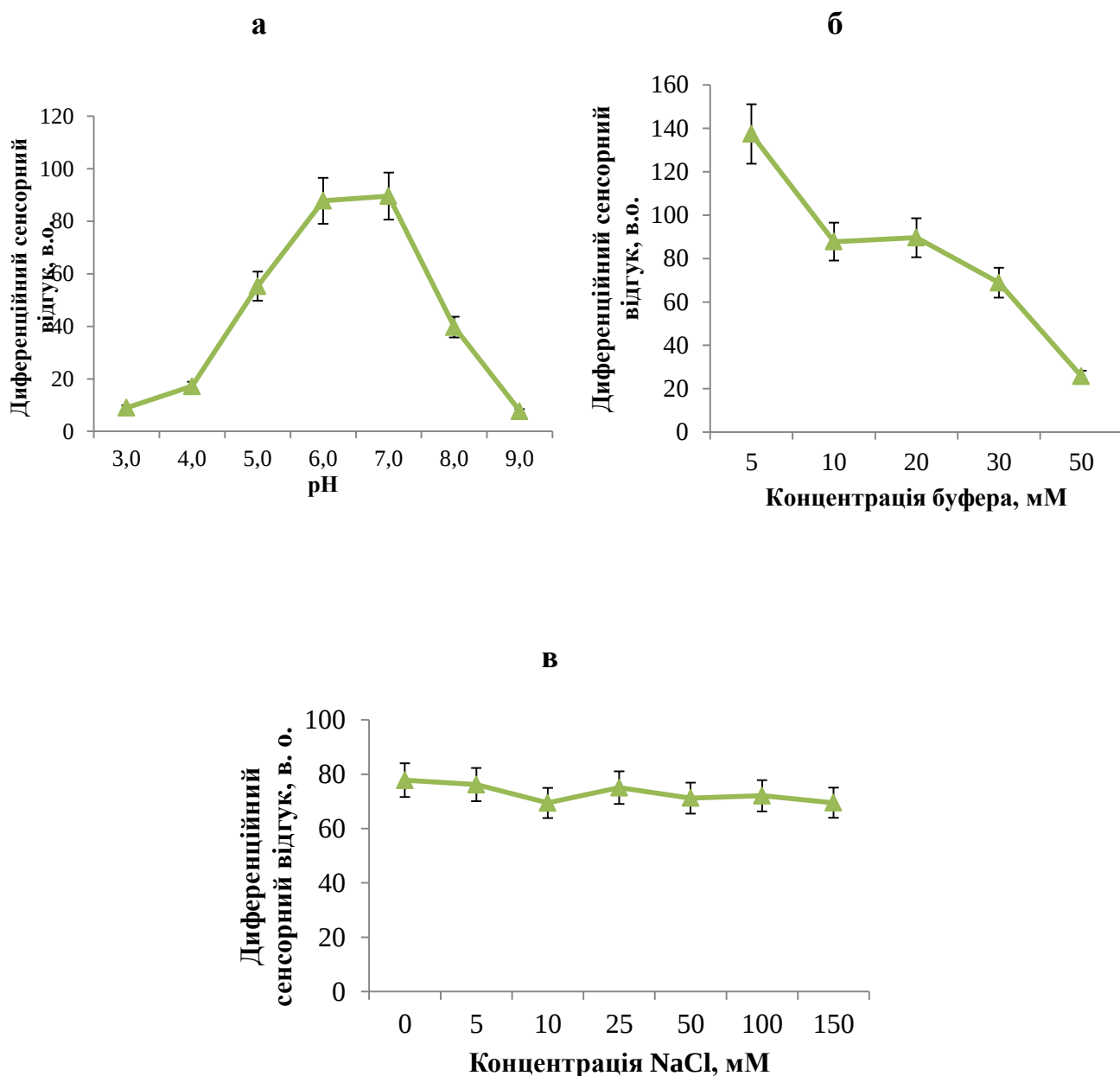


Рис. 3.10. Вплив складу аналізованого розчину на розпізнавання АФВ1 мікотоксин-селективними рецепторними сайтами у структурі МП, які синтезовані з використанням АА зі співвідношенням псевдоматриця: ФМ у вихідній мономерній суміші 1:2. Залежність величин ДСВ у відповідь на додавання 100 нг/мл АФВ1 від: а – значення рН аналізованого розчину; б – концентрації натрій-фосфатного буфера, рН 6,0; в – концентрації хлориду натрію в аналізованих зразках. Аналіз зв'язування проводили у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 6,0). Всі аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Показано (рис. 3.10.б), що зростання концентрації буферного розчину негативно впливає на величину ДСВ. Ймовірно, зростання концентрації іонів в аналізованому розчині, зменшує силу нековалентних взаємодій та, відповідно, кількість молекул АФВ1, зв'язаних з рецепторними сайтами, сформованими у полімері. Проте, беручи до уваги необхідність застосування синтезованих МІП мембран для аналізу реальних зразків, а також зважаючи на те, що величини ДСВ практично не змінювались за концентрацій буферного розчину від 10 до 50 мМ, для подальших досліджень використовували буфер з достатньою буферною ємністю: концентрацією 20 мМ.

Крім того, наявність хлориду натрію в аналізованому розчині в досліджуваному діапазоні концентрацій практично не впливає на величини ДСВ (див. рис. 3.10.в), що є суттєвою перевагою, оскільки спрощує подальший аналіз наявності АФВ1 в реальних зразках.

Отже, досліджено вплив рН, концентрації буферу та концентрації хлориду натрію у аналізованому розчині на здатність синтезованих МІП мембран селективно зв'язувати АФВ1. Ідентифіковано оптимальні умови, за яких відбувається ефективне високоселективне зв'язування цільового аналіту штучними рецепторними сайтами зв'язування, сформованими у структурі АА-вмісних МІП мембран. Найвищі показники диференційних сенсорних відгуків у відповідь на додавання АФВ1, реєстрували за таких умов: рН аналізованого розчину 6,0 та концентрації натрій-фосфатного буфера 20 мМ [199].

3.3.2. Визначення оптимальних умов розпізнавання ЗОН штучними рецепторними сайтами у складі МІП мембран. На рис. 3.11 представлено результати дослідження впливу складу аналізованого розчину на розпізнавання ЗОН 1-АЛП-вмісними МІП мембранами, які було синтезовано з мономерної суміші зі співвідношенням псевдоматриця: ФМ 1:4.

Для МІП мембран, отриманих на основі 1-АЛП, найвищі значення ДСВ спостерігали за рН 6,0 (рис. 3.11.а). Під час аналізу у лужному середовищі було зафіксовано зниження здатності МІП селективно зв'язувати ЗОН, про що

свідчать низькі значення ДСВ. Було показано (рис. 3.11.б), що зростання концентрації буферного розчину, не має суттєвого впливу на розпізнавання ЗОН штучними рецепторними сайтами в структурі МПП мембран. Проте, виявлено (рис. 3.11.в), що підвищення концентрації хлориду натрію в аналізованому розчині суттєво впливає на значення ДСВ створеної біосенсорної систем, підвищуючи здатність штучних рецепторних сайтів в структурі МПП мембран зв'язувати ЗОН.

Отримані результати (див. рис. 3.11) можна пояснити основно-кислотними властивостями ЗОН і синтезованих МПП мембран. За своїми хімічними властивостями ЗОН – слабка кислота, з $pK_a=7,62$ [200]. Тому, у водному середовищі за $pH=3,0-7,0$ ЗОН перебуває у нейтральній формі, а зі збільшенням pH зростає вміст депротонованої форми. За умови коли pH розчину більше за значення pK_a , переважаючою формою стає фенолят-аніон. В той же час, 1-АЛП-вмісні МПП мембрани, мають основні залишки піперазину, і очікується, що їхні значення pK_a будуть близькі до значень pK_a для 1-метил- та 1-етилпіперазину: 9,14 та 9,20, відповідно [201]. Тому, за $pH \leq 9,0$, цей полімер існує у переважно протонованій формі.

Як відомо, зв'язування аналіту зі штучними рецепторними сайтами в структурі МПП мембран відбувається за рахунок слабких, але високоспецифічних Ван-дер-Ваальсових, водневих взаємодій, а також сильніших, але менш специфічних, іонних взаємодій. Проте, відносний внесок іонного зв'язування залежить як від pH аналізованого розчину, так і від іонної сили розчину.

У нейтральному та кислому середовищі ($pH 4,0-7,0$) МПП протонований, а молекула ЗОН перебуває у переважно нейтральній формі. Тому, у цьому діапазоні значень pH внесок іонних зв'язків – відносно низький, переважає специфічне зв'язування, а різниця в отриманих значеннях ДСВ – незначна (рис. 3.11.а).

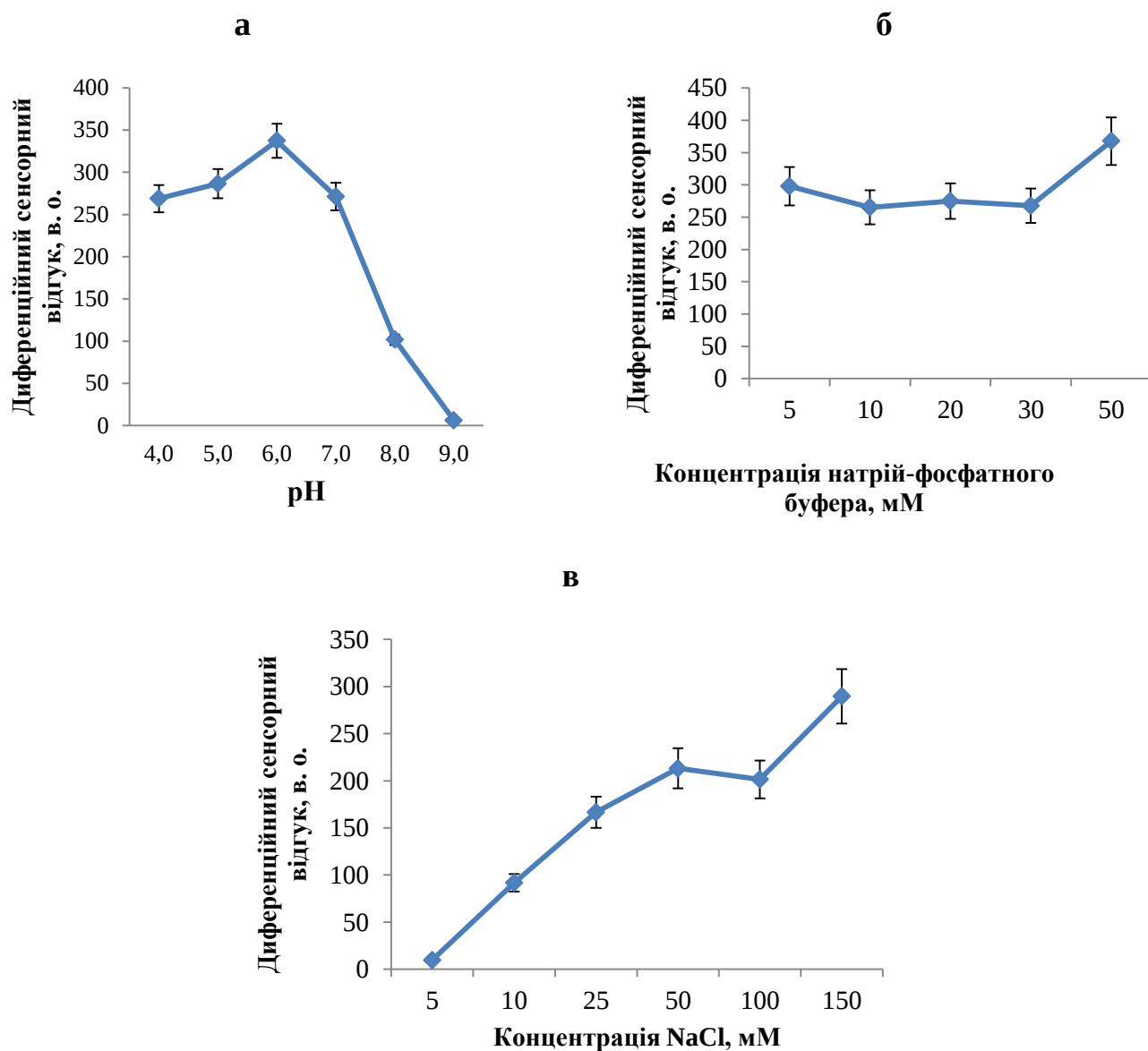


Рис. 3.11. Вплив складу аналізованого розчину на розпізнавання ЗОН 1-АЛП-вмісними МПП мембранами, молярне співвідношення псевдоматриця: ФМ у яких становить 1:4. Залежність величин ДСВ у відповідь на додавання 25 мкг/мл ЗОН від: а – значення рН аналізованого розчину; б – концентрації натрій-фосфатного буфера (у адсорбційних експериментах використовували натрій-фосфатний буферний розчин з рН 6,0); в – концентрації NaCl у аналізованих зразках (аналіз зв'язування проводили у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 6,0). Всі аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

При збільшенні значень рН (див. рис. 3.11.а) зростає вміст аніонної форми ЗОН, МІП залишається у протонованій формі, і зростає внесок іонних взаємодій. Тому, при зростанні значень рН, спостерігали зменшення значень ДСВ (див. рис. 3.11.а), оскільки зросла кількість неспецифічних взаємодій ЗОН з контрольними МІП мембранами за рахунок неспецифічних іонних взаємодій. Крім того, було показано (див. рис. 3.11.в), що високі концентрації хлориду натрію також пригнічують внесок неспецифічних іонних взаємодій про що свідчить зростання значень ДСВ у відповідь на додавання ЗОН.

Вплив різних умов аналізованого середовища на розпізнавання ЗОН МІП мембранами, синтезованими з використанням функціонального мономеру ЕГМФ зі співвідношенням псевдоматриця: ФМ 1:2 у вихідній мономерній суміші, представлено на рис. 3.12.

Як і в попередньому випадку, найвищі значення ДСВ (рис. 3.12.а) спостерігали за нейтральних значень рН аналізованого розчину. Було зафіксовано, що в лужному та кислому середовищі відбувається значне зниження здатності МІП мембран селективно зв'язувати ЗОН, відповідно до низьких значень ДСВ. Зважаючи на це, далі використовували буферний розчин з рН 7,0. Також, встановлено (рис. 3.12.б), що збільшення буферної ємності аналізованого розчину, суттєво не впливає на величини ДСВ, а також зв'язування ЗОН рецепторними сайтами у складі МІП мембран, синтезованих з використанням функціонального мономеру ЕГМФ. Тому, в наступних дослідженнях використовували натрій-фосфатний буфер з концентрацією 20 мМ, що дозволить забезпечити достатню буферну ємність та найкраще розпізнавання ЗОН полімерами-біоміметиками.

Використовуючи дослідні розчини з оптимальними значенням рН та концентрацією буфера (20 мМ, натрій-фосфатний буфер рН 7,0), у адсорбційних експериментах було визначено величини диференційних сенсорних відгуків за різних концентрацій хлориду натрію у зразку (5–150 мМ NaCl). Встановлено (див. рис. 3.12.в), що зростання концентрації хлориду натрію в аналізованому

розчині суттєво не впливає на показники диференційного сенсорного відгуку біосенсорної системи для визначення ЗОН на основі ЕГМФ-вмісних МІП мембран.

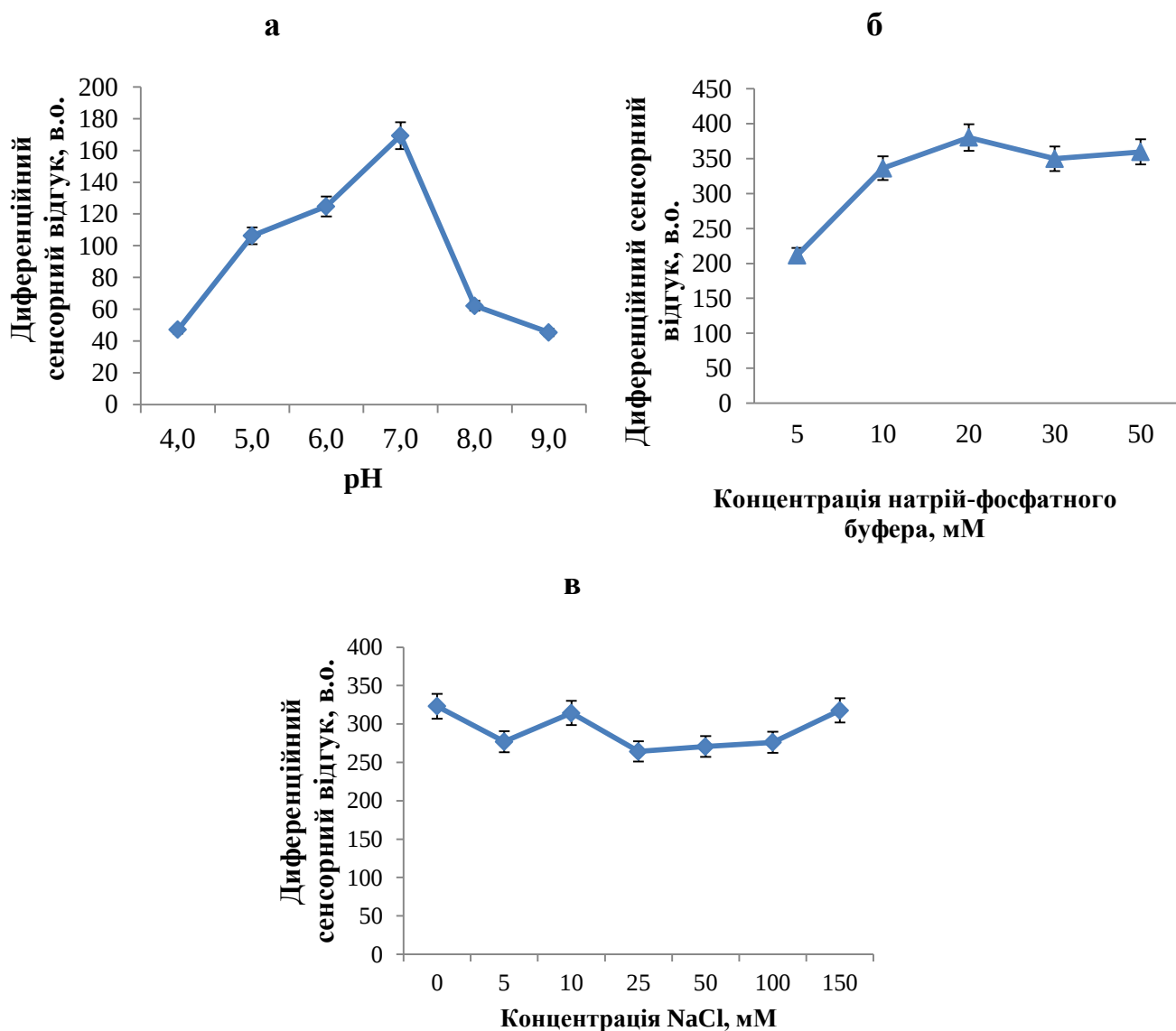


Рис. 3.12. Вплив складу аналізованого розчину на розпізнавання ЗОН ЕГМФ-вмісними МІП мембранами, молярне співвідношення псевдоматриця: ФМ у яких становить 1:2. Залежність величин ДСВ у відповідь на додавання 25 мкг/мл ЗОН від: а – значення рН аналізованого розчину; б – концентрації натрій-фосфатного буфера, рН 7,0; в – концентрації NaCl у аналізованих зразках (у адсорбційних експериментах використовували 20 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 7,0). Всі аналізовані водні зразки містили 10% ацетонітрилу. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Отже, досліджено впливи значень рН, концентрації іонів в аналізованому розчині на здатність мікотоксин-селективних МІП селективно розпізнавати зеараленон, та визначено оптимальні умови розпізнавання ЗОН рецепторними сайтами у складі створених МІП мембран. Найвищі величини ДСВ для 1-АЛП-вмісних МІП мембран спостерігали у 20 мМ натрій фосфатному буфері з рН 6,0 та концентрацією хлориду натрію 150 мМ. Для ЕГМФ-вмісних МІП мембран найкраще розпізнавання ЗОН зафіксовано у 20 мМ натрій фосфатному буфері з рН 7,0.

3.4. Висновки до розділу

Використовуючи технологію молекулярного імпринтингу, синтезовано та оптимізовано склад полімерів-біоміметиків у вигляді мембран для виявлення АФВ1 та ЗОН. Найвищі значення ДСВ щодо цільового аналіту виявляли МІП мембрани, синтезовані з використанням функціонального мономеру АА з мономерної суміші з молярним співвідношенням псевдоматриця: АА 1:2. Визначено оптимальний склад мономерних сумішей для синтезу ЗОН-селективних МІП мембран з найкращими розпізнавальними властивостями відносно цільового аналіту. МІП мембрани синтезовані з використанням функціональних мономерів ЕГМФ та 1-АЛП з молярними співвідношеннями псевдоматриця: ФМ 1:2 та 1:4, відповідно, демонстрували найкраще розпізнавання ЗОН.

Досліджено вплив умов аналізованого розчину на здатність синтезованих МІП мембран розпізнавати цільові мікотоксини. Встановлено, що найбільші величини ДСВ для розроблених АФВ1-чутливих МІП мембран виявляли при рН аналізованого розчину 6,0 у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, при цьому присутність 5–150 мМ хлориду натрію у зразку не впливала на величини сенсорних відгуків. Найвищі показники біосенсорних відгуків у відповідь на додавання ЗОН спостерігали за аналізу в нейтральних розчинах (20 мМ натрій-

фосфатний буфер з рН 6,0–7,0). Крім того, встановлено, що зростання іонної сили аналізованого розчину не впливає на здатність штучних рецепторних сайтів у складі ЕГМФ-вмісних МПП мембран розпізнавати ЗОН, на відміну від 1-АЛП-вмісних МПП, для яких найвищі показники біосенсорних відгуків були зафіксовані за концентрації хлориду натрію 150 мМ.

Результати, представлені у розділі, опубліковані у наукових працях [190, 199, 202–211].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ, СЕЛЕКТИВНИХ ДО МІКОТОКСИНІВ

4.1. Дослідження аналітичних характеристик флуориметричної біосенсорної системи на основі МІП мембран для визначення АФВ1

4.1.1. Калібрувальний графік для визначення АФВ1 за допомогою флуориметричної біосенсорної системи на основі МІП мембран. Типові калібрувальні графіки для біосенсорної системи на основі МІП мембран, синтезованих на основі функціонального мономеру акриламід, представлені на рис. 4.1.

З отриманих калібрувальних графіків (див. рис. 4.1) стає зрозуміло, що для афлатоксину В1 характерне переважне зв'язування з дослідними (молекулярно-імпринтованими), а не контрольними мембранами. Очевидно, що зв'язування АФВ1 з МІП мембранами відбувається за рахунок формування у їхній структурі штучних рецепторних сайтів розпізнавання, адже неімпринтовані мембрани не відрізняються за складом мономерів від молекулярно-імпринтованих, проте, через відсутність псевдоматриці у мономерній суміші, у такому полімері не були сформовані рецепторні сайти зв'язування цільового мікотоксину.

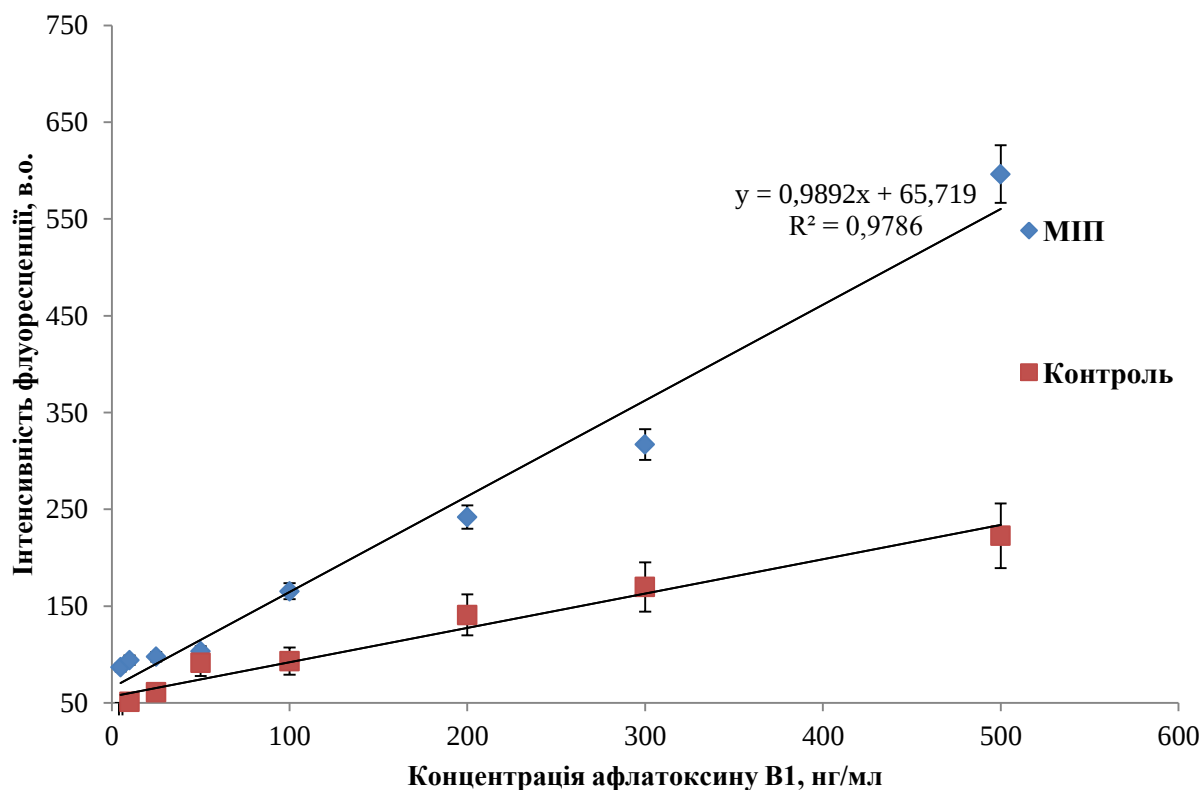


Рис. 4.1. Типовий калібрувальний графік оптичної біосенсорної системи для виявлення АФВ1. Флуоресценція МІП та контрольних мембран, синтезованих з використанням акриламід у як функціонального мономера у відповідь на додавання 5–500 нг/мл АФВ1. Аналіз зв'язування проводили у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 6,0, який містить 10% ацетонітрилу. Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Встановлено, що межа визначення АФВ1 за допомогою біосенсорної системи на основі МІП мембран, синтезованих за участі АА, становить 10 нг/мл, лінійний динамічний діапазон визначення – 10–500 нг/мл. Також, визначено, що за зберігання розробленої системи за кімнатної температури, вона залишалась стабільною продовж 18 місяців. Стабільність розробленої системи за зберігання при кімнатній температурі становила 18 місяців.

4.1.2. Дослідження селективності біосенсорної системи на основі молекулярно-імпринтованих полімерних мембран для визначення АФВ1. Оцінки селективності створених біосенсорних систем проводили у адсорбційних експериментах за використання близьких структурних аналогів АФВ1. Для цього використовували розчини АФВ1, АФГ2 та ОхА з концентрацією 100 нг/мл (рис. 4.2) та визначали здатність мікотоксин-селективних сайтів у МІП мембранах селективно розпізнавати цільовий аналіт у аналізованих розчинах.

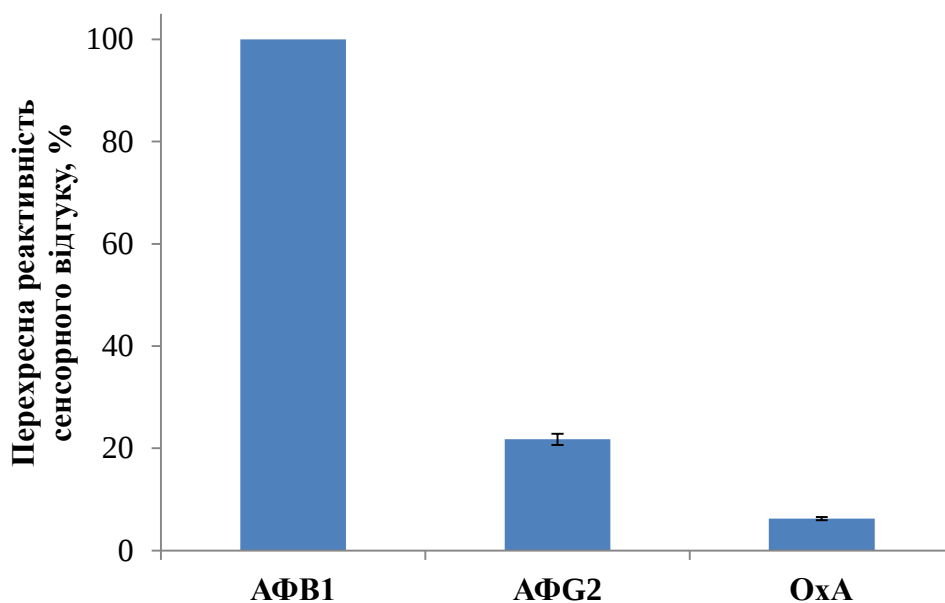


Рис 4.2. Перехресна реактивність сенсорних відгуків біосенсорної системи на основі МІП мембран у відповідь на додавання 100 нг/мл АФВ1 та його структурних аналогів (АФГ2 та ОхА). За 100% вважали відгук сенсорної системи на основі АА-вмісних мембран у відповідь на додавання 100 нг/мл АФВ1. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Для біосенсорної системи на основі МІП мембран, синтезованих за участі акриламиду, зареєстровано низькі рівні перехресної реактивності при виявленні структурних аналогів цільового мікотоксину. У порівнянні з сенсорними відгуками у відповідь на додавання АФВ1, перехресна реактивність сенсорних відгуків у відповідь на додавання його структурних аналогів була мінімальною (менше 20% для АФГ2, та менше 10% для ОхА) (див. рис. 4.2).

Отже, створена біосенсорна система на основі полімерів-біоміметиків – високоселективна до цільового аналіту – афлатоксину В1.

4.2. Визначення робочих характеристик флуориметричних біосенсорних систем на основі МІП мембран для виявлення ЗОН

4.2.1. Калібрувальний графік для визначення ЗОН за допомогою флуориметричних біосенсорних систем на основі МІП мембран. Типові калібрувальні графіки для мембран, синтезованих з використанням функціональних мономерів ЕГМФ та 1-АЛП, представлені у вигляді залежностей інтенсивності флуоресценції МІП та контрольних мембран від концентрації токсину в зразку, на рис. 4.

З отриманих графіків можна зрозуміти (див. рис. 4.3.а та 4.3.в), що обидві біосенсорні системи взаємодіють з цільовим аналітом за рахунок утворених ЗОН-чутливих штучних рецепторних сайтів зв'язування в структурі МІП мембран, про що свідчить суттєва різниця флуоресцентних сенсорних відгуків зареєстрованих з поверхні МІП та контрольних мембран.

Також, визначено аналітичні характеристики пропонованих біосенсорних систем на основі ЕГМФ- та 1-АЛП-вмісних МІП мембран (див. рис. 4.3.б та 4.3.г). Обидві біосенсорні системи здатні виявляти ЗОН з межею визначення 1 мкг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення складає 1–25 мкг/мл. Створені ЗОН-селективні біосенсорні системи залишались стабільними впродовж 18 місяців.

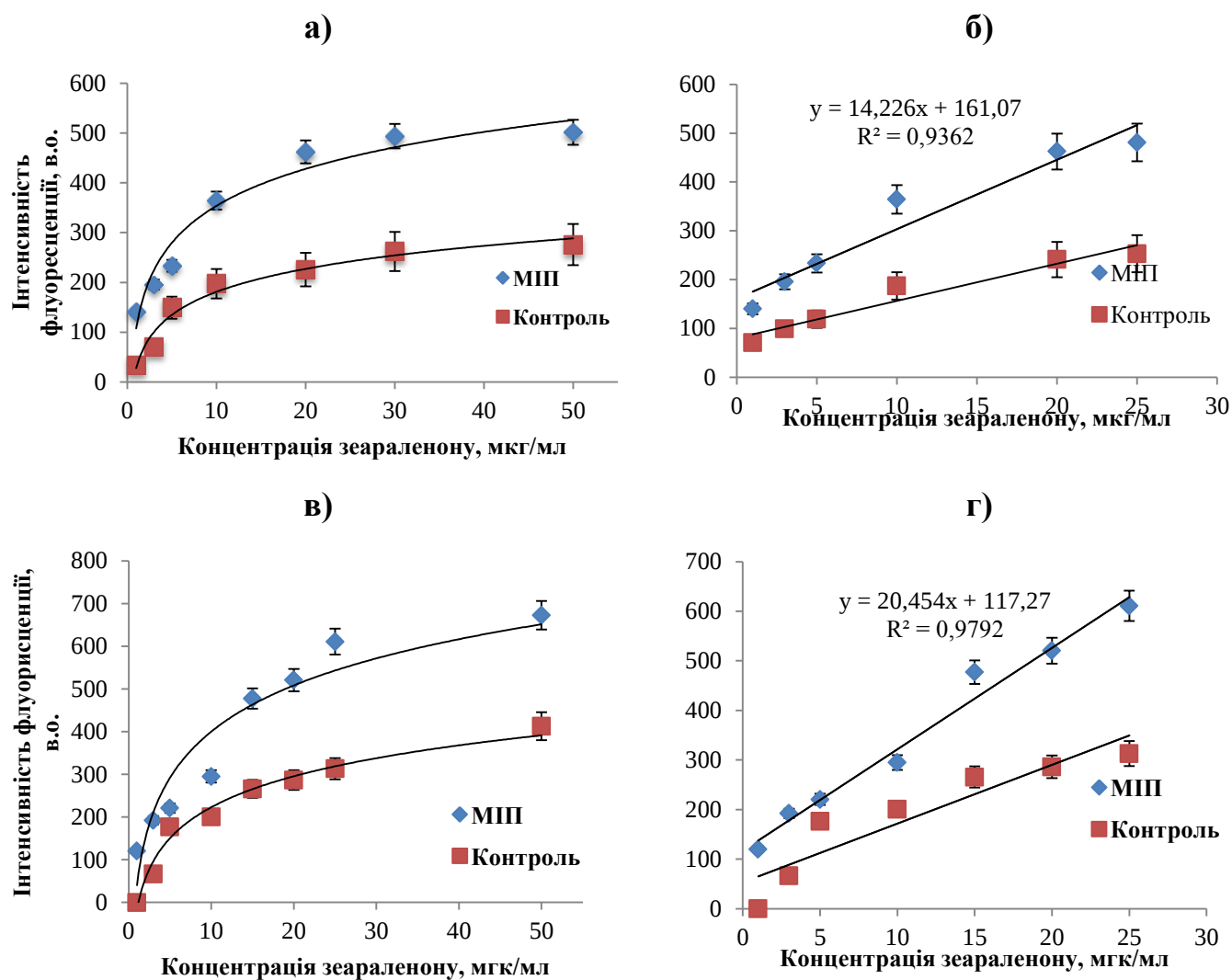


Рис. 4.3. Типові калібрувальні графіки оптичної біосенсорної системи для виявлення ЗОН: а – залежність інтенсивності флуоресценції ЕГМФ-вмісних МІП та контрольних мембран після інкубування у розчинах ЗОН (1–50 мкг/мл, 20 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 7,0, 10% ацетонітрилу) від концентрації токсину; б – лінійна ділянка калібрувальної кривої для сенсорної системи на основі ЕГМФ-вмісних МІП мембран після інкубування у розчинах ЗОН (1–25 мкг/мл); в – залежність інтенсивності флуоресценції 1-АЛП-вмісних МІП та контрольних мембран після інкубування у розчинах з ЗОН (1–50 мкг/мл, 20 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 6,0, 150 мМ NaCl, 10% ацетонітрилу) від концентрації токсину; г – лінійна ділянка калібрувальної кривої для біосенсорної системи на основі 1-АЛП-вмісних МІП мембран після інкубування у розчинах ЗОН (1–25 мкг/мл). Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

4.2.2. Дослідження селективності біосенсорних систем на основі МІП мембран для визначення ЗОН. Для визначення селективності пропонованих чутливих елементів на основі МІП мембран використовували низку структурних аналогів ЗОН: його метаболіт – α -зеараленол (ЗОЛ), 17- β -естрадіол, бісфенол А (БФА) та резорцинол. Крім того, досліджували можливість ЗОН-селективних МІП мембран зв'язувати інші мікотоксини: АФВ1 та ОхА. На рис. 4.4 представлено графік, який ілюструє результати визначення селективності біосенсорної системи на основі ЕГМФ- та 1-АЛП-вмісних МІП мембран.

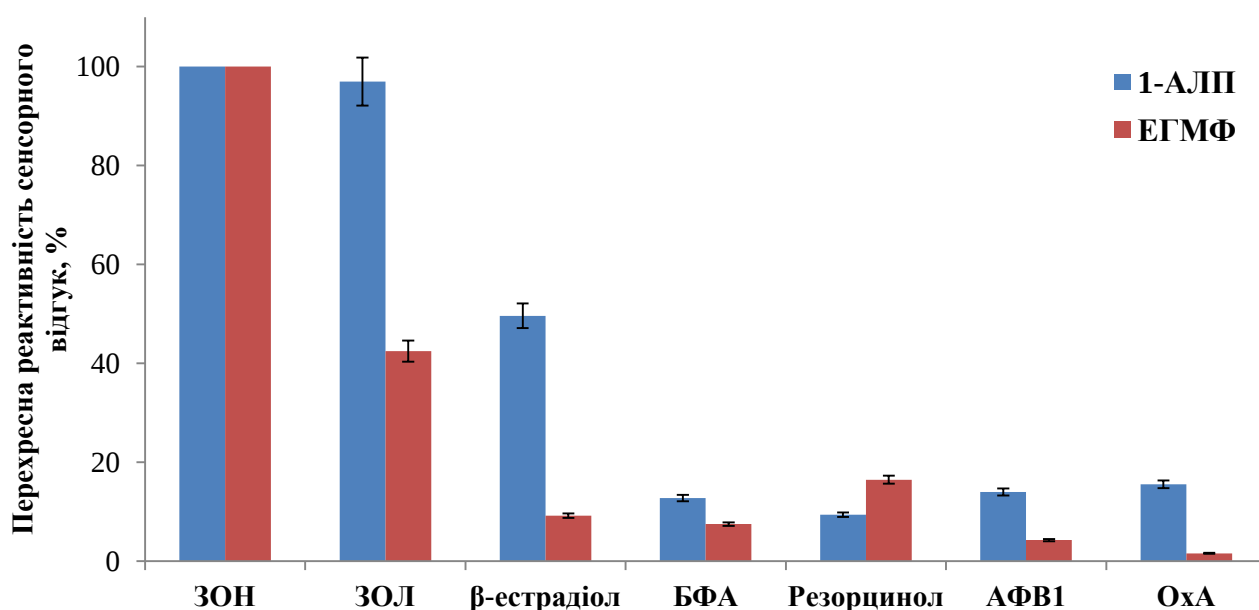


Рис. 4.4. Перехресна реактивність сенсорних відгуків біосенсорних систем на основі ЕГМФ- та 1-АЛП-вмісних МІП мембран, у відповідь на додавання 20 мкг/мл ЗОН, його структурних аналогів та інших мікотоксинів (ЗОЛ, 17- β -естрадіолу, БФА, резорцинолу, АФВ1 та ОхА). За 100% вважали відгук сенсорної системи на основі ЕГМФ- та 1-АЛП-вмісних МІП мембран у відповідь на додавання 20 мкг/мл ЗОН. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Біосенсорні системи, створені на основі 1-АЛП- та ЕГМФ-вмісних МІП мембран демонстрували високі значення сенсорних відгуків у відповідь на додавання з ЗОН у порівнянні з його структурними аналогами та деякими

іншими мікотоксинами. Як можна побачити (див. рис. 4.4), рівень перехресної реактивності сенсорних відгуків у відповідь на додавання метаболіту ЗОН – ЗОЛ було 42% для ЕГМФ-вмісних МІП. Проте, 1-АЛП-вмісні МІП мембрани демонстрували високі рівні перехресної реактивності сенсорних відгуків у відповідь на додавання як ЗОН, так і ЗОЛ (97 %). Як вже зазначалось, ЗОЛ – основний метаболіт ЗОН, який можна виявити в організмі людей та тварин після вживання їжі, забрудненої зеараленоном. Тому, розроблені чутливі елементи на основі МІП мембран, які було синтезовано з використанням функціонального мономеру 1-АЛП можуть успішно використовуватись не тільки для високоселективного виявлення ЗОН в продуктах харчування, а й для моніторингу стану здоров'я та виявлення метаболітів ЗОН – α -зеараленолу, зокрема, у біологічних рідинах [212]. Крім того, для цих МІП мембран виявлено також високу перехресну реактивність сенсорного відгуку у відповідь на додавання 17- β -естрадіолу – 50%. В той же час для ЕГМФ-вмісних МІП зв'язування 17- β -естрадіолу не перевищувало 10% порівняно зі 100% для ЗОН. Загалом обидва типи МІП мембран демонстрували низькі значення перехресної реактивності сенсорних відгуків з близькими структурними аналогами ЗОН – БФА, резорцинолом та іншими мікотоксинами – АФВ1, ОхА. Величина сенсорних відгуків у відповідь на додавання зазначених інтерферентів становила менше 20% для 1-АЛП- та ЕГМФ-вмісних МІП мембран, відповідно) порівняно до відгуків, які спостерігались після додавання цільового мікотоксину – зеараленону.

Отже, розроблені біосенсорні системи на основі ЕГМФ- та 1-АЛП-вмісних МІП мембран – високоселективні щодо виявлення цільового мікотоксину – ЗОН, на відміну від його близьких структурних аналогів. Крім того, МІП мембрани, синтезовані на основі функціонального мономеру 1-АЛП можуть з високою селективністю виявляти метаболіт ЗОН – α -зеараленол. Тому, такі чутливі елементи можуть бути використані як основа простих біосенсорних пристроїв на основі смартфонів для щоденного контролю ЗОН не тільки в продуктах харчування, а й для діагностики мікотоксикозів та моніторингу стану здоров'я.

4.3. Розробка біосенсорних систем на основі МПП мембран та смартфона для визначення мікотоксинів

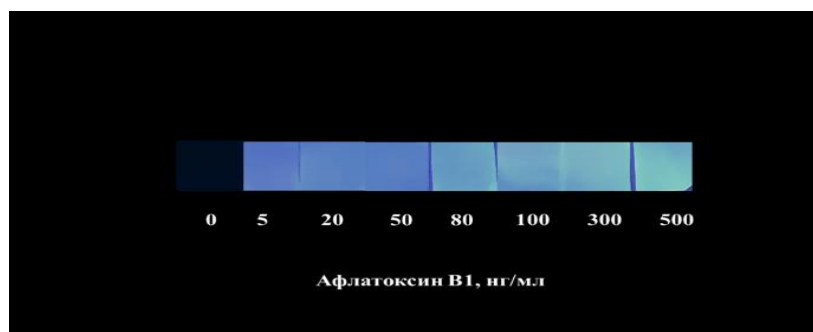
Створені АФВ1- та ЗОН-селективні МПП мембрани оптимізованого складу були використані як чутливі елементи лабораторних прототипів оптичних біосенсорних систем на основі смартфона. У цьому випадку для візуалізації природньої флуоресценції АФВ1 або ЗОН на поверхні відповідних МПП мембран, їх опромінювали УФ світлом ($\lambda=365$ нм) впродовж однієї хвилини. Після чого, для детекції флуоресценції АФВ1 або ЗОН використовували смартфон (Meizu 16), обладнаний камерою високої роздільної здатності, зі встановленим комерційно доступним мобільним застосунком Spotxel® Reader, 2.1.5 (Sicasys Software GmbH, Гейдельберг, Німеччина). В результаті в режимі реального часу можливо отримати калібрувальні графіки інтенсивності флуоресценції МПП мембран від концентрації токсинів в зразку.

4.3.1. Визначення АФВ1 за допомогою оптичної біосенсорної системи на основі МПП мембран та смартфона. На рис. 4.5.a наведено фотографії флуоресценції МПП мембран, після інкубування у розчинах з різними концентраціями АФВ1. Це дозволяє не тільки візуалізувати, а й кількісно оцінити рівень взаємодії АФВ1 з МПП мембраною. Використовуючи мобільний застосунок Spotxel® Reader, 2.1.5 для системи Android було отримано калібрувальні криві залежності інтенсивності флуоресценції мікотоксину на поверхні мембрани від його концентрації в зразках (рис. 4.5.б).

Межа визначення АФВ1 за допомогою запропонованого прототипу біосенсорної системи на основі смартфона становить 15 нг/мл, лінійний динамічний діапазон – 15–300 нг/мл (рис. 4.5.б). Крім того, процедура аналізу за допомогою смартфона – значно простіша за традиційні аналітичні методи

визначення мікотоксинів та не вимагає використання високовартісного лабораторного обладнання [199].

а)



б)

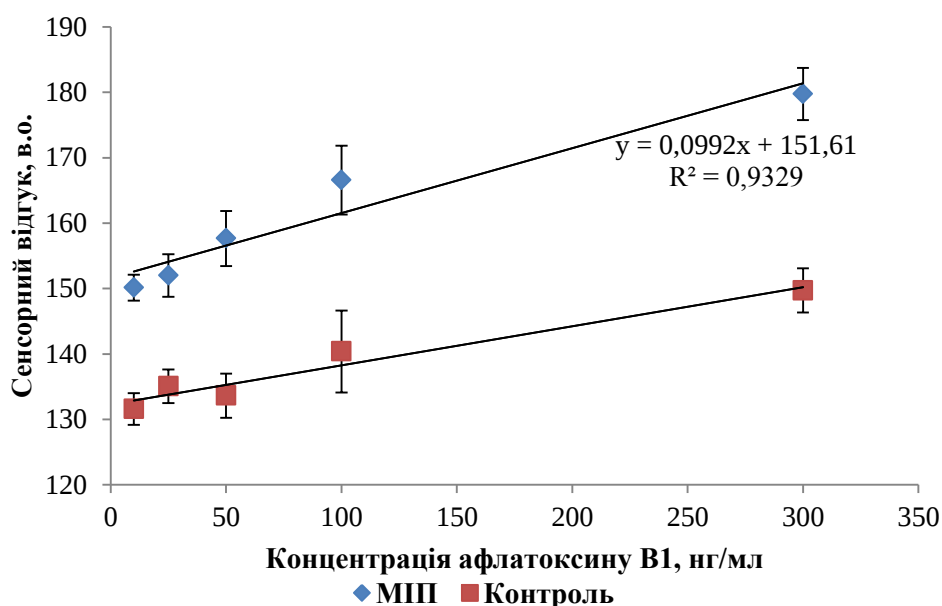
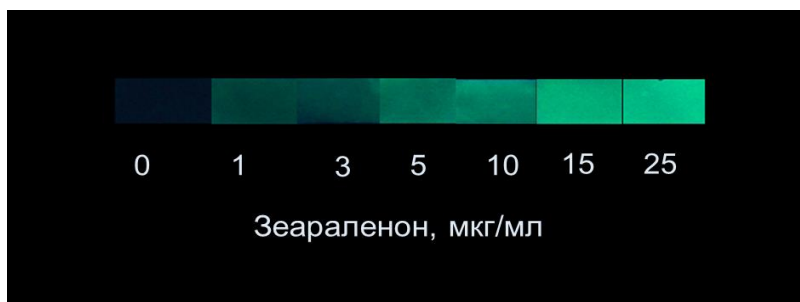


Рис. 4.5. Типовий калібрувальний графік оптичної біосенсорної системи для виявлення АФВ1 на основі полімерів-біоміметиків та смартфона: а – флуоресценція МІП мембран після інкубування у розчинах АФВ1 у концентраціях 5–500 нг/мл; б – залежність сенсорного відгуку від концентрації АФВ1 у зразку (отримано за допомогою додатку для смартфона Spotxel® Reader, 2.1.5)

Отже, розроблено альтернативний підхід визначення харчового мікотоксину – АФВ1. За допомогою створених МІП мембран та смартфона можливий простий, дешевий та високочутливий аналіз АФВ1 з межею визначення 15 нг/мл.

4.3.2. Визначення ЗОН за допомогою оптичної біосенсорної системи на основі МПІ мембран та смартфона. Візуалізація інтенсивності флуоресценції МПІ мембран за різної концентрації ЗОН за допомогою камери смартфона наведено на рис. 4.6.а. Типовий калібрувальний графік оптичної біосенсорної системи на основі смартфона для визначення ЗОН представлено на рис. 4.6.б.

а)



б)

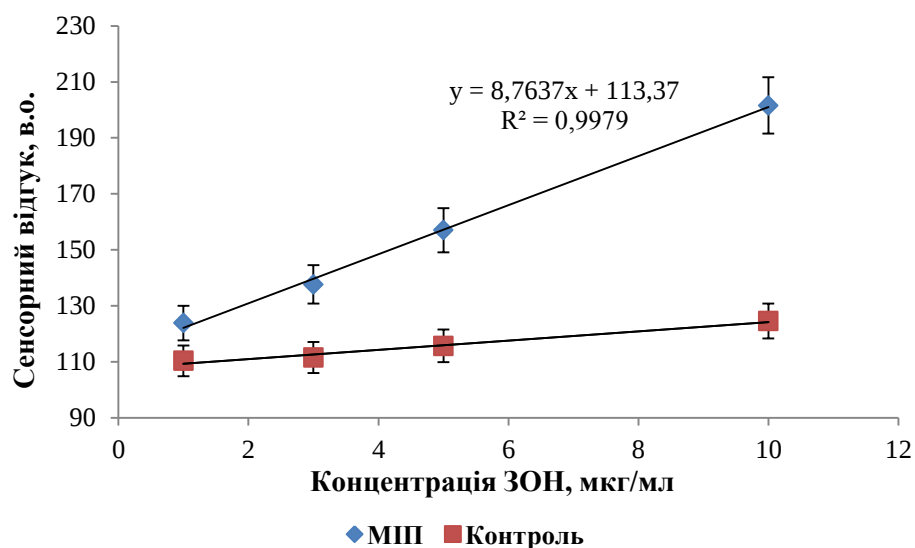


Рис. 4.7. Типовий калібрувальний графік оптичної біосенсорної системи для виявлення ЗОН на основі полімерів-біоміметиків та смартфона: а – фотографія флуоресценції МПІ мембран, після інкубування у розчинах ЗОН з концентраціями 1–25 мкг/мл; б – залежність сенсорного відгуку від концентрації ЗОН у зразку (отримано за допомогою додатку для смартфона Spotxel® Reader, 2.1.5 (Sicasys Software GmbH, Гейдельберг, Німеччина).

За допомогою створеного лабораторного прототипу флуориметричної біосенсорної системи на основі МІП мембран та смартфона можлива високочутлива детекція зеараленону. Межа визначення ЗОН становить 1 мкг/мл, а лінійний динамічний діапазон роботи пристрою – 1–10 мкг/мл.

Таким чином, розроблена біосенсорна система на основі МІП мембран та смартфона здатна забезпечити чутливий (межа визначення 1 мкг/мл), надійний, дешевий, недорогий та швидкий аналіз зеараленону в продуктах харчування, на відміну від більш вартісних та складніших традиційних методів визначення ЗОН.

4.4. Висновки до розділу

Визначено основні робочі аналітичні характеристики біосенсорних систем для визначення АФВ1 та ЗОН на основі токсин-селективних МІП мембран оптимізованого складу. За допомогою біосенсорної системи на основі АА-вмісних МІП мембран можливо виявляти АФВ1 з межею визначення 10 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон становить 10–500 нг/мл. Стабільність біосенсорної системи для виявлення АФВ1 за зберігання при кімнатній температурі становить 18 місяців. Розроблена біосенсорна система – високоселективна і не чутлива до наявності у зразку близьких структурних аналогів цільового аналіту: АФГ2 та ОхА. ЗОН-селективні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків здатні виявляти цей мікотоксин з межею визначання 1 мкг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення ЗОН складає 1–25 мкг/мл. Встановлено, що обидві біосенсорні системи, як на основі функціонального мономеру ЕГМФ, так і 1-АЛП, здатні до високоселективного виявлення ЗОН, на відміну від його близьких структурних аналогів та інших мікотоксинів. Більше того, 1-АЛП-вмісні МІП мембрани демонстрували високі рівні взаємодії з метаболітом ЗОН – α -зеараленолом, що може бути корисним

для подальшого розроблення методів персоналізованої діагностики на основі смарт-сенсорів.

Створено лабораторні прототипи оптичних біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків та смартфона для детекції харчових мікотоксинів АФВ1 та ЗОН. АФВ1-селективні біосенсорні системи на основі смартфона мають межу визначення 15 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення становить 15–300 нг/мл. Встановлено, що біосенсорна система на основі МІП мембран та смартфона здатна виявляти ЗОН з межею визначення 1 мкг/мл та лінійним динамічним діапазоном – 1–10 мкг/мл.

Результати, представлені у розділі, опубліковані у наукових працях [190, 199, 202, 213, 204, 205, 211, 208].

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ РОБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРІВ-БІОМІМЕТИКІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МІКОТОКСИНІВ

Розробка високочутливих експрес методів аналізу – один з найважливіших напрямків біосенсорики, коли необхідно виявляти наднизькі рівні аналітів: визначення метаболітів, контроль якості дитячих продуктів харчування. Сьогодні можна виокремити два основних підходи, які використовують з метою покращення аналітичних характеристик оптичних біосенсорів для визначення мікотоксинів. Перший підхід, більш традиційний, полягає у використанні додаткових флуоресцентних маркерів, та виявленні цільових мікотоксинів у конкурентному варіанті аналізу [170, 214–216]. Другий підхід, більш сучасний та універсальний, зосереджений на пошуку шляхів підсилення флуоресценції мікотоксинів та збільшенні чутливості розроблених біосенсорів [184, 185]. Як вже зазначалось, з метою підсилення флуоресценції можливо використати плазмонні властивості наночастинок срібла (AgНЧ), які здатні покращувати оптичні характеристики флуорофору в безпосередній близькості від себе [187, 188]. Тому, даний розділ присвячений розробці підходів для покращення аналітичних характеристик біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків для визначення мікотоксинів за допомогою флуоресцентного маркера, а також явища плазмонного підсилення флуоресценції з використанням AgНЧ, вбудованих у структуру полімеру.

5.1. Розробка біосенсорної системи на основі МІП мембран для виявлення ЗОН з використанням флуоресцентного маркера

З метою забезпечення можливості більш чутливого (нг/мл) та надійного визначення зеараленона у біологічних рідинах та харчових продуктах, призначених для дітей (20–50 мкг/кг), необхідно знизити межу визначення ЗОН запропонованою біосенсорною системою [217, 218]. Досліджено можливість підвищення чутливості створеної флуоресцентної біосенсорної системи на основі МІП мембран для визначення ЗОН у конкурентному варіанті аналізу з використанням флуоресцентного маркера. Принцип такого підходу полягає у використанні в конкурентному варіанті аналізу високофлуоресцентного близького структурного аналогу ЗОН, який протягом аналізу конкурує з зеараленоном за зв'язування з ЗОН-селективними рецепторними сайтами у структурі полімера-біоміметика. Групою науковців на чолі Navaro-Villoslada F. було досліджено різні флуоресцентні маркери, близькі за структурою до ЗОН та псевдоматриці (циклододецил-2-4-дигідроксибензоат – ЦДГБ), які вони використали для розробки методу визначення ЗОН на основі ВЕРХ з флуоресцентною детекцією, де в якості стаціонарної фази використовували частинки молекулярно-імпринтованого полімеру розміром 25–50 мкм [197]. Згідно отриманих цими дослідниками даних найбільш ефективним флуоресцентним маркером є (2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоат (ПАРА), який був отриманий шляхом кон'югації 2,4-дигідробензоату та піренкарбоксилової кислоти (рис. 5.1). Тому, саме цей маркер використовували для створення біосенсорної системи на основі МІП мембран для високочутливого виявлення ЗОН.

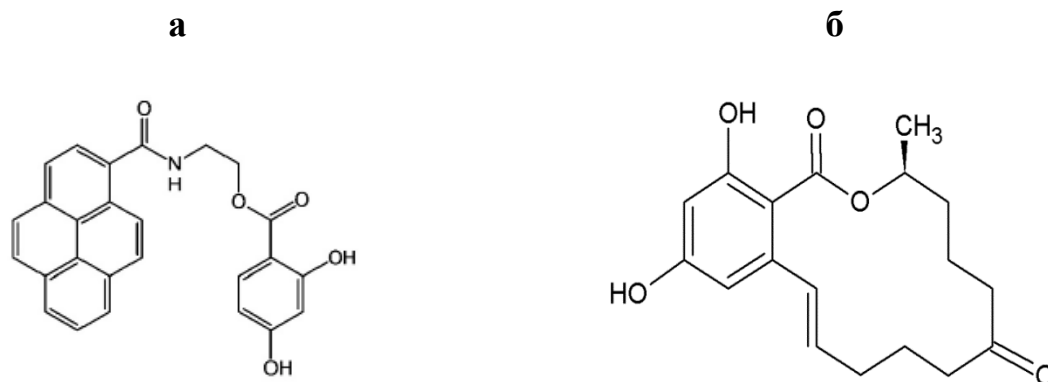


Рис. 5.1. Структурні формули ПАРА (а) та зеараленону (б).

Показано, що флуоресцентний маркер може селективно зв'язуватись штучними рецепторними сайтами, утвореними у структурі МПП мембран, а виявити його можна, ініціюючи власну флуоресценцію маркера УФ світлом. Якщо аналізований зразок міститиме ЗОН та флуоресцентну мітку, вони конкуруватимуть за сайти зв'язування у структурі МПП мембран. В результаті, ЗОН займе токсин-селективні сайти зв'язування, що призведе до зменшення інтенсивності флуоресценції, яка є обернено пропорційною до концентрації токсину в зразку. На рис. 5.2 представлено калібрувальний графік виявлення зеараленону за допомогою флуоресцентної біосенсорної системи на основі МПП мембран у конкурентному варіанті аналізу.

Проведення аналізу у конкурентному варіанті із застосуванням високофлуоресцентного аналогу зеараленону ПАРА як маркера забезпечило істотне зниження межі виявлення ЗОН порівняно до розроблених раніше (див. розділ 4) біосенсорних систем в 100 разів. Встановлено, що межа виявлення ЗОН дорівнює 10 нг/мл, лінійний динамічний діапазон 10–100 нг/мл [190].

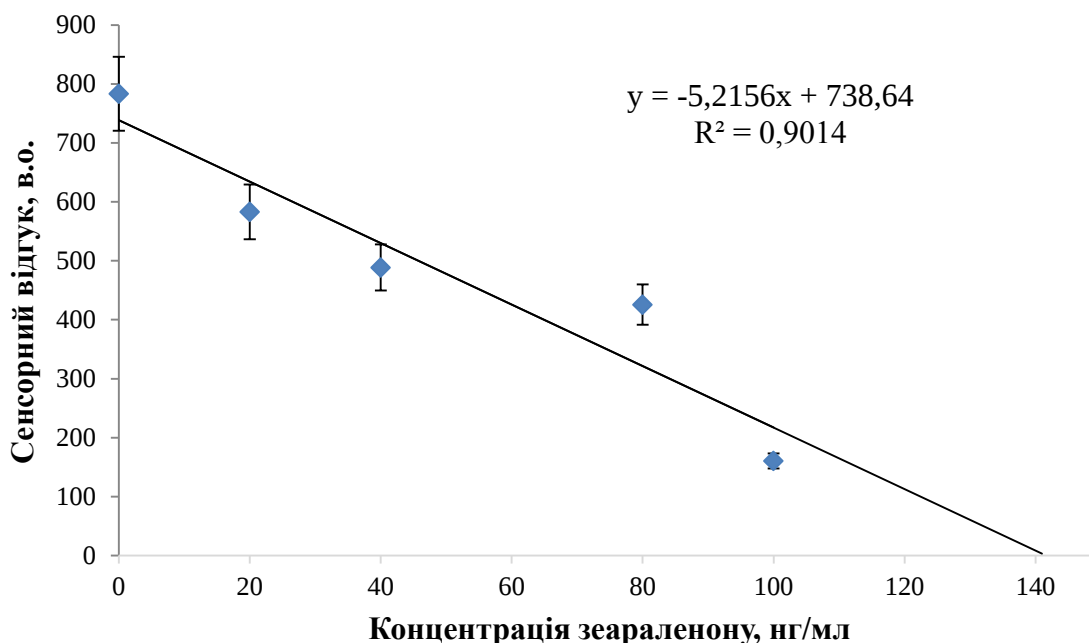


Рис. 5.2. Калібрувальний графік флуоресцентної біосенсорної системи для виявлення ЗОН з використанням флуоресцентного маркера – ПАРА. Залежність інтенсивності флуоресценції МІП мембран, синтезованих з використанням функціонального мономеру 1-АЛП, після інкубування в розчинах, які містили 40 нг/мл ПАРА та різні концентрації ЗОН. Спектрофлуориметр PerkinElmer LS 55. Планки похибок – стандартна похибка, $n=5$.

Отже, використання флуоресцентного маркера є досить ефективним підходом, який забезпечує суттєве покращення аналітичних характеристик біосенсора на основі МІП мембран. Проте, такий підхід має і ряд недоліків, а саме: пошук флуоресцентного аналогу та розроблення методу його синтезу, необхідність додаткового часу інкубування з маркером. Найважливіший недолік цього підходу – його неуніверсальність, оскільки не для всіх аналітів можливо синтезувати флуоресцентний аналог. Зважаючи на це, ми зосередились на розробці підходу, який би був універсальним для покращення чутливості біосенсорів на основі МІП мембран для визначення аналітів різної структури, яким властива природна флуоресценція.

5.2. Використання методу плазмонного підсилення флуоресценції для покращення аналітичних характеристик біосенсорів на основі МІП мембран для визначення мікотоксинів

Для підвищення чутливості біосенсорних систем на основі МІП мембран запропоновано використати срібні наночастинки (AgНЧ), які здатні виконувати роль підсилювачів флуоресцентного сигналу завдяки явищу плазмонного підсилення флуоресценції. AgНЧ було отримано *in situ* з нітрату срібла (I) під час синтезу МІП мембран шляхом відновлення на стадії нагрівання мономерних сумішей та їхньої подальшої полімеризації, ініційованої ультрафіолетовим світлом. Нітрат срібла (I) у вигляді розчину у диметилформаміді додавали в мономерні суміші для синтезу МІП та контрольних мембран, склад яких був оптимізований раніше (див. розділи 3–4). Отримані у такий спосіб МІП-AgНЧ мембрани використовували для визначення АФВ1 та ЗОН з водних розчинів і оцінювали здатність AgНЧ підсилювати сенсорний відгук флуоресцентних сенсорів.

5.2.1. Визначення оптимальної кількості нітрату срібла (I) для ефективного підсилення флуоресцентного сигналу. З метою визначення оптимальної кількості нітрату срібла (I) для утворення у структурі МІП мембран наночастинок срібла, здатних ефективно підсилювати флуоресцентний сенсорний сигнал, у вихідні мономерні суміші додавали розчини AgNO_3 до кінцевих концентрацій, які варіювали від 0,6 мМ до 291 мМ.

Результати визначення АФВ1 за допомогою сенсорних чипів на основі МІП мембран, синтезованих з мономерних сумішей, які містять різні концентрації нітрату срібла (I), представлені на рис. 5.3. Встановлено, що МІП мембрани, які містили 1,5 мМ AgNO_3 , демонстрували значно вищі сенсорні відгуки в порівнянні з контрольною МІП мембраною, яка була синтезована без додавання нітрату срібла (I).

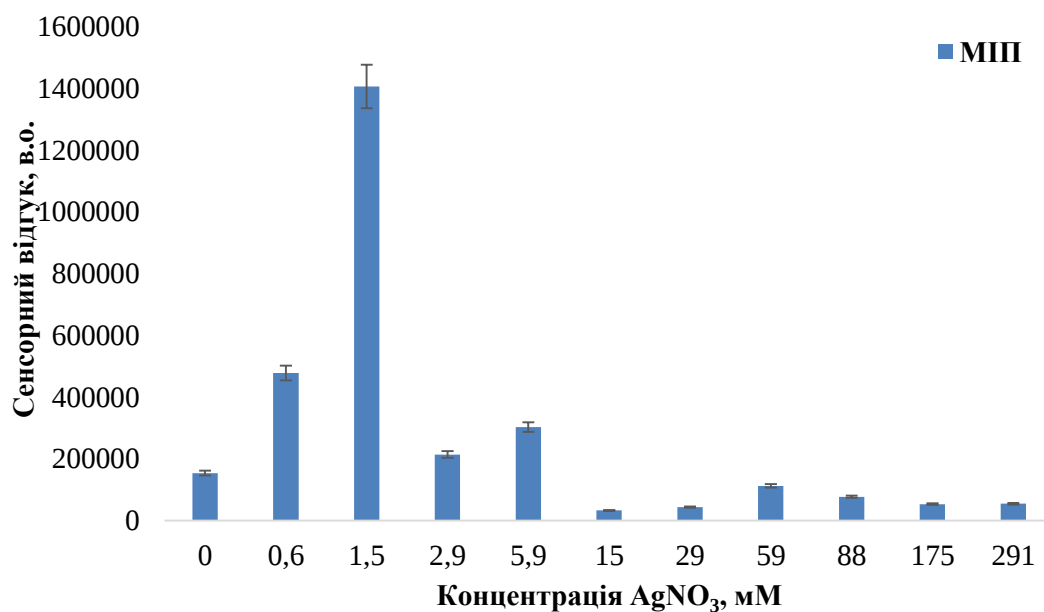


Рис. 5.3. Флуоресцентні сенсорні відгуки сенсорів на основі МІП мембран, синтезованих з використанням нітрату срібла (I), у відповідь на додавання 100 нг/мл АФВ1. Виміри проводили за допомогою спектрофлуориметра Fluoromax_PLUS_PR928P. Планки похибок = стандартна похибка, n=5.

Для МІП мембран, синтезованих з мономерної суміші, яка містила 1,5 мМ нітрату срібла (I), спостерігали (див. рис. 5.3) збільшення флуоресцентного сенсорного відгуку у 14 разів порівняно з сенсорними елементами на основі МІП мембран, синтезованих без додавання нітрату срібла (I). Додавання більших (2,9 та 5,9 мМ) та менших (0,6 мМ) концентрацій нітрату срібла (I) в мономерну композицію призводило до значно меншого ефекту підсилення флуоресценції (у 2,1–4,5 рази). Для МІП мембран, синтезованих з мономерних сумішей, які містили більше 15 мМ нітрату срібла (I) спостерігали гасіння флуоресценції АФВ1. Тому, МІП мембрани, синтезовані з додаванням 1,5 мМ нітрату срібла (I) були використанні для подальших експериментів.

На рис. 5.4 представлено результати визначення здатності МІП мембран розпізнавати ЗОН та впливу вмісту нітрату срібла (I) у мономерній суміші для синтезу біоміметика на інтенсивність флуоресценції мікотоксину.

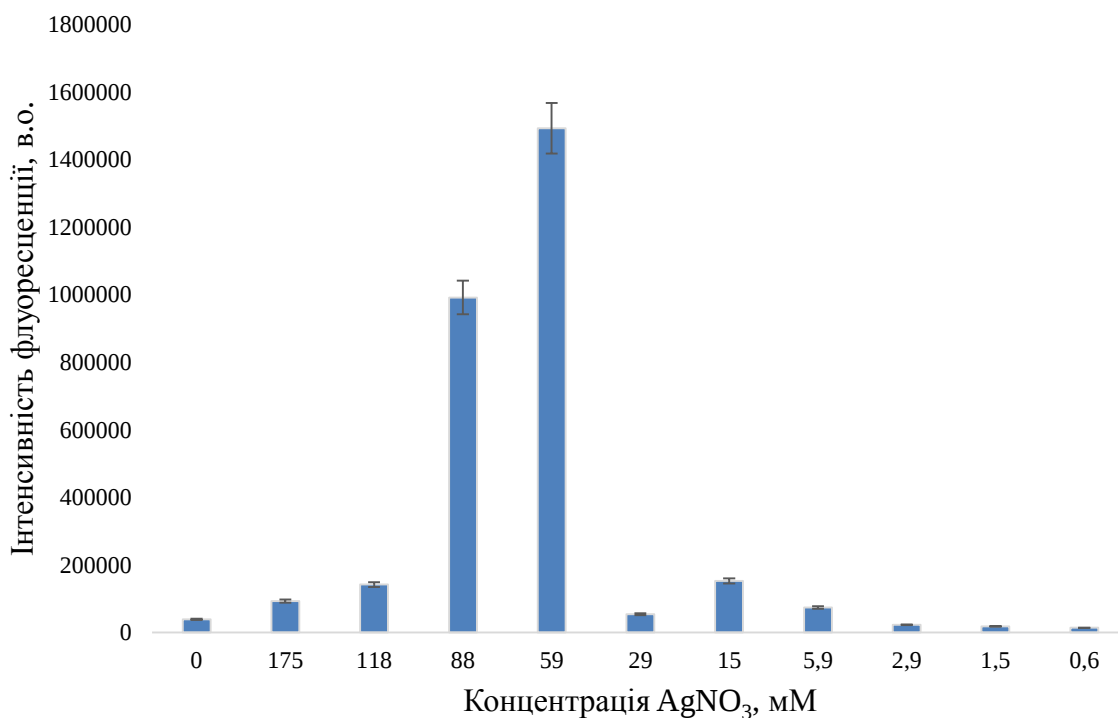


Рис. 5.4. Флуоресцентні сенсорні відгуки сенсорів на основі МІП мембран, синтезованих з різними концентраціями нітрату срібла (І), у відповідь на додавання 10 мкг/мл ЗОН. Виміри проводили за допомогою спектрофлуориметра Fluoromax_PLUS_PR928P. Планки похибок = стандартна похибка, $n=5$.

Відповідно до отриманих результатів, за додавання низьких концентрацій нітрату срібла (І) (0,6–2,9 мМ) в мономерну суміш спостерігали або гасіння флуоресценції ЗОН або отриманий сигнал відповідав контролю. Вищі концентрації нітрату срібла (І) (5,9–29 мМ), додані до складу МІП мембран, забезпечували незначний ефект підсилення флуоресценції ЗОН (у 1,9–3,9 рази). Суттєве підвищення флуоресцентного сенсорного відгуку в порівнянні з контролем, спостерігали для МІП мембран, які було синтезовано з додаванням 59 мМ нітрату срібла (І). Відповідно до отриманих результатів, для цих МІП мембран спостерігали флуоресцентні сенсорні відгуки у 39 разів вищі в порівнянні з сенсорними відгуками, отриманими з поверхні контрольних полімерів. За подальшого збільшення концентрації нітрату срібла (І) в мономерній суміші (88–175 мМ) спостерігали незначні ефекти підсилення

флуоресцентного сигналу, які поступово знижувались зі збільшенням вмісту нітрату срібла (I), у відповідь на додавання ЗОН.

Отже, визначено оптимальні концентрації нітрату срібла (I), за яких у структурі полімеру відбувається утворення AgHЧ , здатних до підсилення флуоресценції відповідних мікотоксинів. Для сенсорних чипів на основі МПП мембран, які містили 1,5 та 59 мМ нітрату срібла (I), було продемонстровано суттєве збільшення величини флуоресцентних сенсорних відгуків у відповідь на додавання АФВ1 та ЗОН (у 14 та 39 разів), відповідно.

5.2.2. Дослідження морфології AgHЧ , утворених в структурі МПП мембран. Використовуючи метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) було досліджено розміри та морфологію срібних наночастинок, утворених в структурі МПП мембран з оптимізованим вмістом нітрату срібла (I). На рис. 5.5 наведено фотографії AgHЧ , які вбудовані в структуру АФВ1- та ЗОН-селективних МПП мембран, синтезованих з додаванням 1,5 мМ та 59 мМ нітрату срібла (I), відповідно.

Встановлено, що в результаті процесу відновлення AgNO_3 під час синтезу АФВ1-чутливих МПП мембран, в їхній структурі сформувались AgHЧ переважно сферичної форми, розміром 30–70 нм, які забезпечують підсилення флуоресценції АФВ1 (рис. 5.5.а, 5.5.б). Також, спостерігали наночастинки інших форм: прямокутної, гексагональної тощо.

В структурі ЗОН-селективних МПП мембран з оптимізованим вмістом нітрату срібла (I) (синтезовані з мономерної композиції, до якої було додано 59 мМ AgNO_3) утворились AgHЧ сферичної форми, розміром 20–30 нм (рис. 5.5.в та 5.5.г).

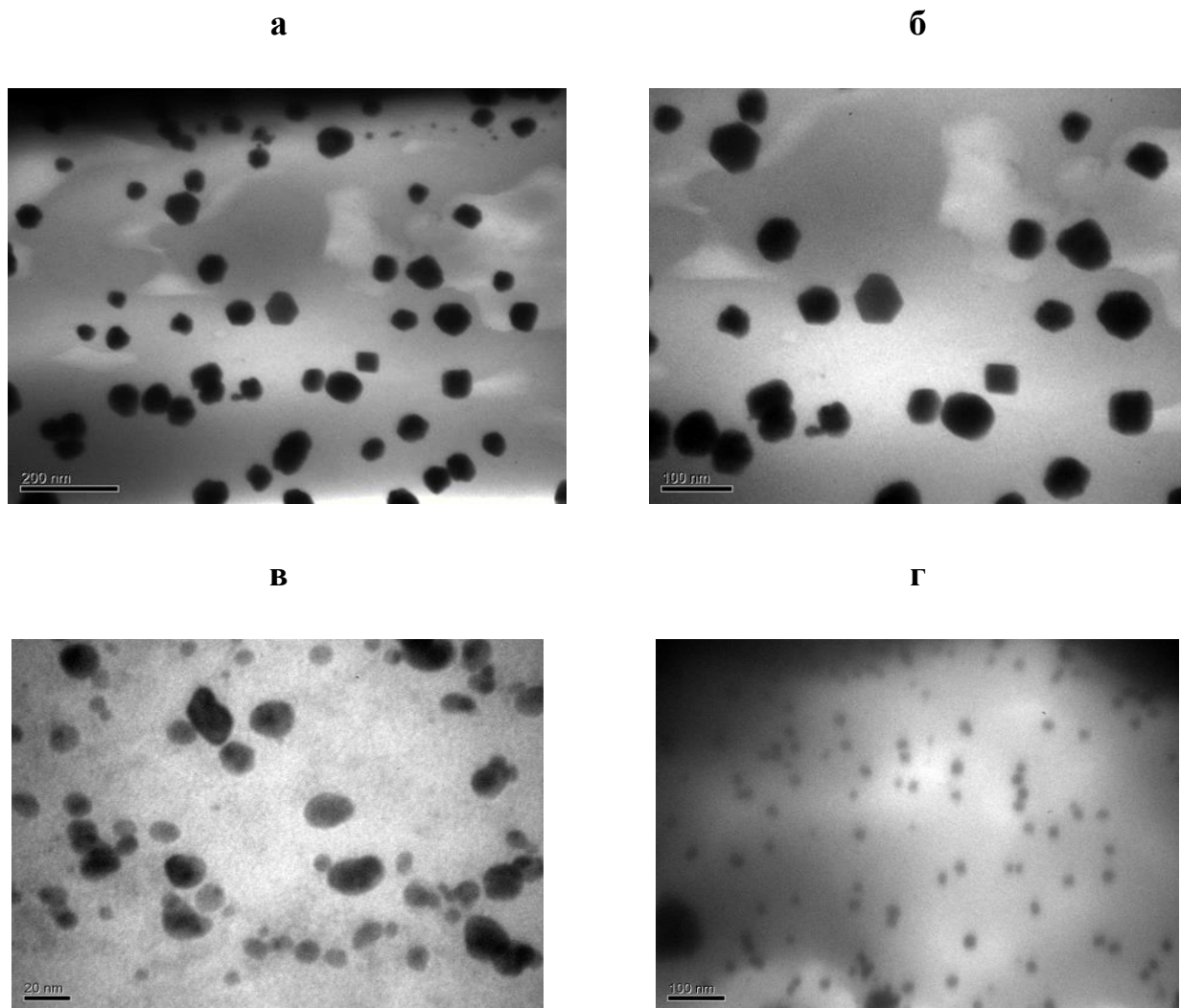


Рис. 5.5. ТЕМ зображення AgNC , які сформувались в структурі МІП мембран, за різного збільшення: а, б – AgNC утворені в структурі АФВ1-селективних МІП мембран, які містили 1,5 мМ нітрату срібла (І); в, г – AgNC в структурі ЗОН-селективних МІП мембран синтезованих з мономерної композиції, до якої було додано 59 мМ нітрату срібла (І).

В обох випадках, утворені срібні наночастинки були рівномірно розподілені в структурі полімеру.

Отже, в результаті відновлення нітрату срібла (І) у структурі мікотоксин-селективних МІП мембран утворювались AgNC сферичної форми, розміром 30–70 нм та 20–30 нм, які здатні до підсилення флуоресцентного сенсорного відгуку у відповідь на додавання АФВ1 та ЗОН, відповідно.

5.2.3. Калібрувальні графіки для визначення мікотоксинів за допомогою сенсорних елементів на основі МП-АгНЧ мембран. Типові калібрувальні криві для оптичних сенсорних систем на основі оптимізованих МП-АгНЧ сенсорних чипів наведено на рис. 5.6 та рис. 5.7.

Встановлено, що межа визначення АФВ1 для такого сенсора становить 0,3 нг/мл. Порівняно з межею визначення сенсорів на основі немодифікованих МП мембран (10 нг/мл), межа визначення АФВ1 зменшилась в 33 рази для сенсорів на основі МП-АгНЧ чипів за рахунок використання явища плазмонного підсилення флуоресценції.

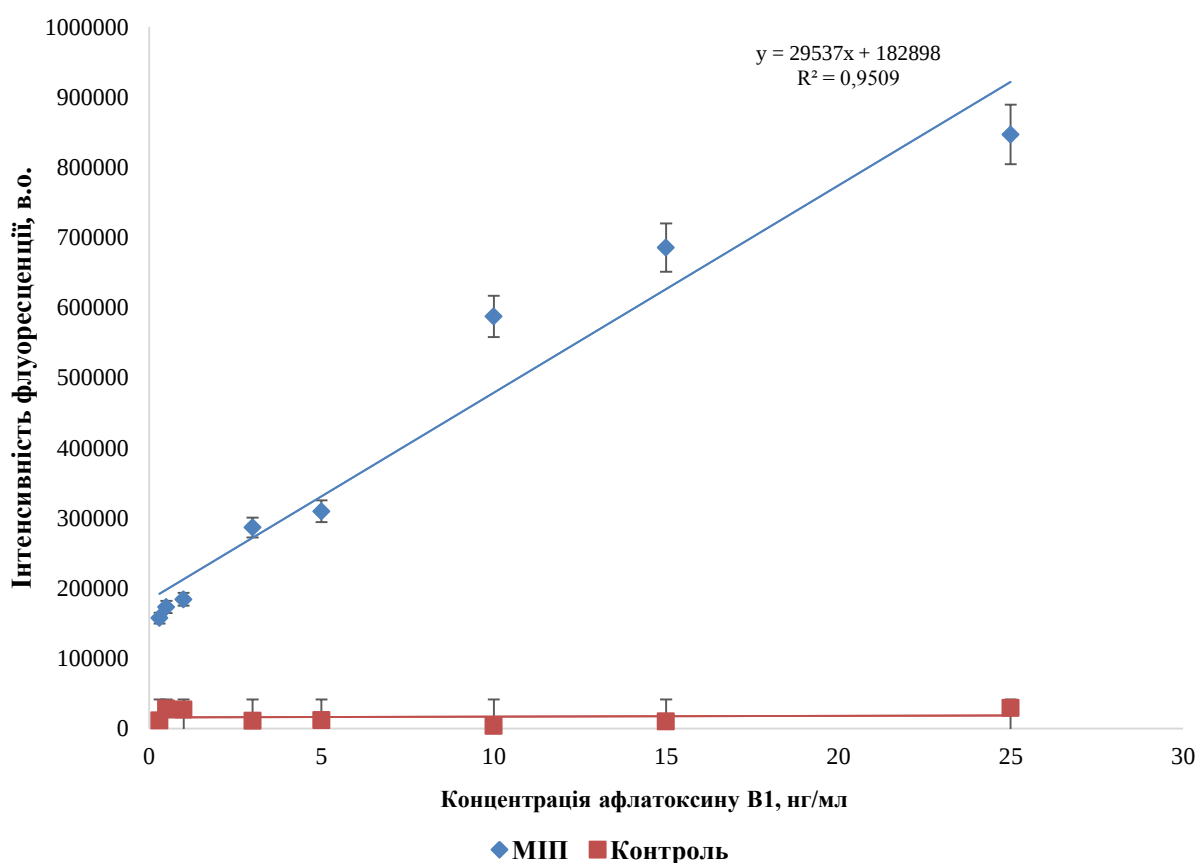


Рис. 5.6. Типовий калібрувальний графік флуоресцентної сенсорної системи на основі МП-АгНЧ мембран для визначення АФВ1. Флуоресценція АА-вмісних МП мембран, іммобілізованих на скляних поверхнях, які синтезували з додаванням 1,5 мМ нітрату срібла (I), у відповідь на додавання різних концентрацій АФВ1. Спектрофлуориметр Fluoromax_PLUS_PR928P. Планки похибок = стандартна похибка, n = 5.

Лінійний динамічний діапазон визначення АФВ1 за допомогою сенсора на основі МІП-AgНЧ мембран становить 0,3–25 нг/мл. В порівнянні з сенсорними відгуками, отриманими з поверхні немодифікованих МІП мембран, мембрани, синтезовані з додаванням нітрату срібла (І), демонстрували сенсорні відгуки, вищі на 40–80 % за абсолютною величиною.

На рис. 5.7 представлені лінійні ділянки типових калібрувальних графіків флуоресцентної біосенсорної системи на основі ЗОН-чутливих МІП-AgНЧ мембран. Встановлено, що межа визначення ЗОН дорівнює 5 нг/мл, що у 200 разів краще, ніж для біосенсорної системи на основі МІП мембран, синтезованих без додавання нітрату срібла (І). Як видно з графіку, лінійний динамічний діапазон визначення ЗОН за допомогою сенсорів на основі таких чутливих елементів становить 5 нг/мл – 25 мкг/мл.

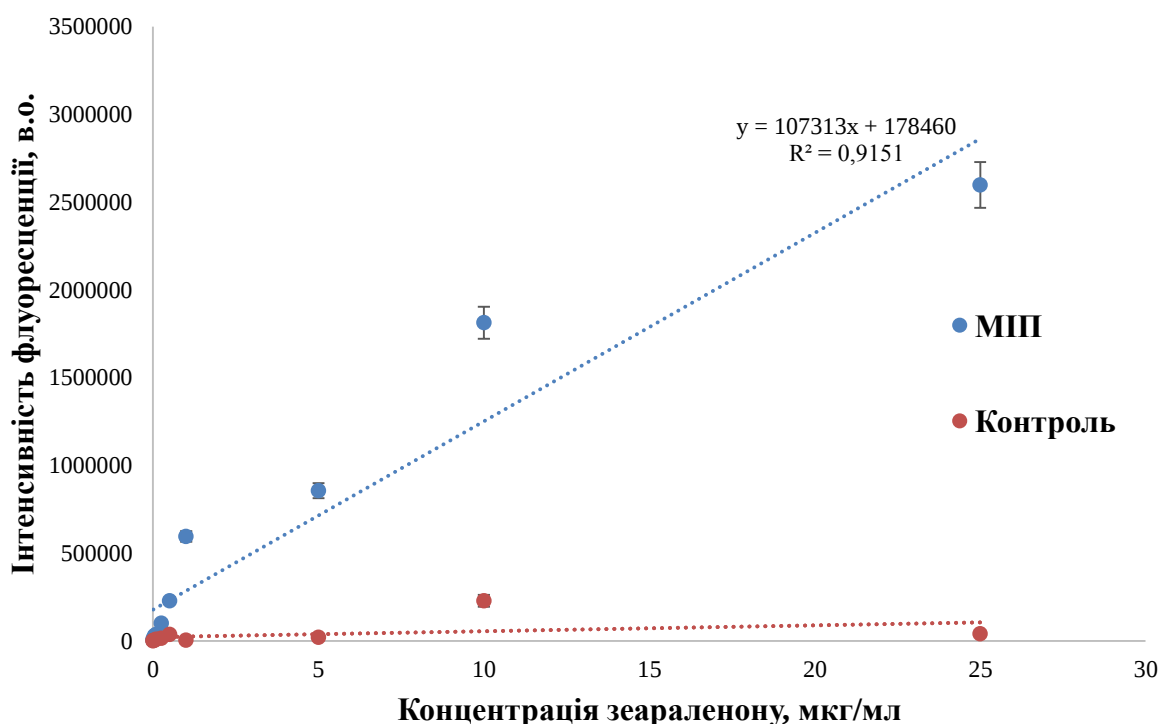


Рис. 5.7. Залежність інтенсивності флуоресценції ЕГМФ-вмісних МІП та контрольних полімерних мембран, синтезованих з додаванням 59 мМ нітрату срібла (І) та іммобілізованих на скляних поверхнях, від концентрації ЗОН в аналізованому зразку. Прилад Fluoromax_PLUS_PR928P. Планки похибок = стандартна похибка, $n=5$.

Крім того, розроблені сенсорні елементи на основі модифікованих МІП- AgHCl можна використовувати як у формі мембран, синтезованих без підкладінок так і у вигляді мембран, іммобілізованих на скляних поверхнях. В останньому випадку, такі сенсорні елементи зручніше зберігати та використовувати. Більше того, такі МІП мембрани можуть бути використані як сенсорні чипи для портативних флуориметрів [190].

Отже, отримано калібрувальні графіки флуоресцентних сенсорних систем на основі МІП- AgHCl мембран для визначення АФВ1 та ЗОН. Завдяки явищу плазмонного підсилення флуоресценції вдалося суттєво знизити межі визначення цільових мікотоксинів (в 33 та 200 разів для АФВ1 та ЗОН, відповідно) та розширити лінійні динамічні діапазони їхнього визначення. Також, використання та зберігання МІП- AgHCl мембран у іммобілізованій на скляних поверхнях формі – зручніше, ніж МІП мембран, синтезованих без додаткових підкладінок.

5.2.4. Дослідження селективності біосенсорних систем на основі МІП- AgHCl мембран для визначення мікотоксинів. Визначено селективність МІП мембран, синтезованих з додаванням нітрату срібла (І) в порівнянні з селективністю, звичайних МІП мембран, які не мали в своїй структурі AgHCl . Отримані результати представлено на рис. 5.8 та 5.9.

Показано, що сенсорні системи на основі МІП- AgHCl мембран високоселективні до цільового аналіту – АФВ1 та практично не зв'язують його структурні аналоги (рис. 5.8). Рівень перехресної реактивності сенсорних відгуків біосенсорної системи на основі немодифікованих МІП мембран у відповідь на додавання структурних аналогів АФВ1 не перевищував 35%.

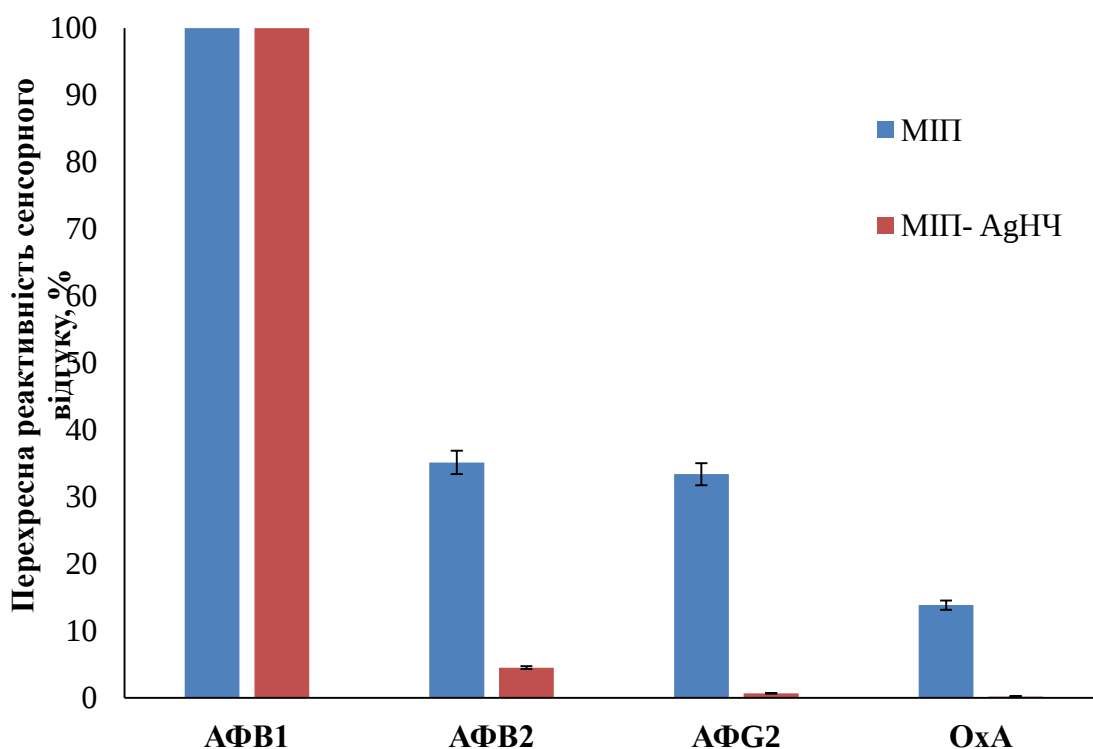


Рис. 5.8. Перехресна реактивність сенсорних відгуків біосенсорної системи на основі немодифікованих МІП мембран (МІП) та МІП мембран, синтезованих з додаванням 1,5 мМ AgNO_3 (МІП-АгНЧ) іммобілізованих на скляних поверхнях у відповідь на додавання 15 нг/мл АФВ1 та його структурних аналогів (використовували розчини афлатоксинів В1, В2, G2 та ОхА). За 100% вважали відгук сенсорної системи на основі АА-вмісних МІП-АгНЧ мембран на додавання 15 нг/мл АФВ1. Планки похибок = стандартна похибка, $n=5$.

В той же час, для біосенсорної системи на основі АА-вмісних МІП-АгНЧ мембран рівень перехресної реактивності сенсорних відгуків у відповідь на додавання АФВ2 становив 4% та менше 1% у випадку АФГ2 та ОхА. Таким чином, сенсорна система на основі модифікованих срібними наночастинками МІП мембран демонструє вищу селективність в порівнянні з сенсорною системою на основі немодифікованих МІП (див. рис. 5.8).

Аналогічне дослідження було проведено щодо оцінки селективності ЗОН-чутливих сенсорів на основі як немодифікованих МІП мембран, так і МІП мембран з вбудованими АгНЧ. Обидва типи мембран демонстрували ефективне

зв'язування цільового мікотоксину у порівнянні з його структурними аналогами та іншими мікотоксинами.

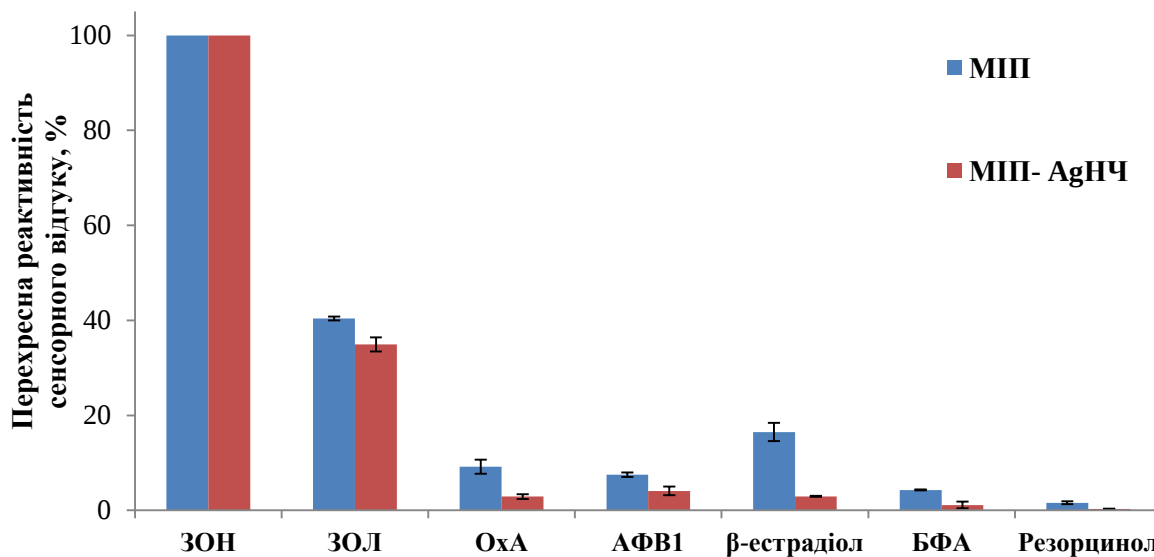


Рис. 5.9. Перехресна реактивність сенсорних відгуків біосенсорної системи на основі немодифікованих МІП мембран (МІП) та МІП мембран, синтезованих з додаванням 59 мМ AgNO_3 (МІП- AgNCH) іммобілізованих на скляних поверхнях у відповідь на додавання ЗОН та його структурних аналогів (у адсорбційних експериментах використовували розчини ЗОН, ЗОЛ, 17-β-естрадіолу, БФА, резорцинолу, АФВ1 та ОхА з концентрацією 20 нг/мл, які містили 10% ацетонітрилу). За 100% вважали відгук сенсорної системи на основі ЕГМФ-вмісних МІП- AgNCH мембран у відповідь на додавання 20 нг/мл ЗОН. Планки похибок = стандартна похибка, $n=5$.

Більше того, відповідно до отриманих результатів, створені чутливі елементи не виявляють близькі структурні аналоги ЗОН – 17-β-естрадіол, ЗОЛ, БФА, резорцинол чи інші мікотоксини – АФВ1 та ОхА. В той же час, рівень перехресної реактивності сенсорних відгуків у відповідь на додавання метаболіту ЗОН – ЗОЛ не перевищував 40 % для обох типів сенсорних елементів.

Отже, відповідно до отриманих результатів дослідження селективності, створені МІП-AgНЧ мембрани - високоселективні до цільових аналітів – АФВ1 та ЗОН. Більше того, МІП-AgНЧ сенсорні елементи демонстрували значно вищу селективність щодо цільових аналітів, у порівнянні з селективністю сенсорів на основі немодифікованих МІП мембран.

5.3. Висновки до розділу

Показано можливість створення біосенсорної системи для високочутливого виявлення ЗОН у конкурентному варіанті аналізу. За допомогою додаткового флуоресцентного маркеру ПАРА вдалося у 100 разів покращити чутливість біосенсорної системи на основі МІП мембран, межа виявлення ЗОН дорівнює 10 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон 10–100 нг/мл.

Розроблено універсальну методику отримання срібних наночастинок у структурі МІП мембран під час їхнього синтезу в результаті відновлення нітрату срібла (I). Включення срібних наночастинок в структуру МІП мембран дозволило отримати високочутливі та селективні МІП-AgНЧ мембрани для визначення АФВ1 та ЗОН завдяки феномену плазмонного підсилення флуоресценції. Показано, що за підсилення флуоресценції АФВ1 відповідають сферичні AgНЧ, розміром 30–70 нм, які рівномірно розподілені в структурі полімеру. Межа визначення АФВ1 за допомогою біосенсорної системи на основі МІП-AgНЧ мембран дорівнює 0,3 нг/мл, лінійний динамічний діапазон визначення 0,3–25 нг/мл, що в 33 разів менше, ніж для біосенсорної системи на основі немодифікованих МІП мембран. Наночастинки срібла, які забезпечують підсилення флуоресценції ЗОН, мали сферичну форму та розмір 20–30 нм. Розроблені сенсорні системи здатні виявляти ЗОН з межею визначення 5 нг/мл,

що у 200 разів краще, ніж для біосенсорної системи на основі МПІ мембран, синтезованих без додавання нітрату срібла (I), в діапазоні 5 нг/мл – 25 мкг/мл. На додачу до всього вищевикладеного, використання МПІ-AgНЧ мембран у іммобілізований на скляних поверхнях формі, є зручнішим, ніж вільних МПІ мембран.

Результати, представлені у розділі, опубліковані у наукових працях [190, 219–222].

РОЗДІЛ 6

АПРОБАЦІЯ СТВОРЕНИХ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ

6.1. Визначення АФВ1 у зразках харчових продуктів та тваринних кормів.

Розроблені оптичні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків були апробовані для аналізу АФВ1 у реальних зразках харчових продуктів (борошно) та кормів (мелена кукурудза). Отримані результати представлені в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Визначення афлатоксину В1 в зразках борошна

Зразок	Додано	Визначено ^а	R ^б , %	RSD ^в , %
пшеничне борошно, ТОВ «КиївМлин», Київ, Україна	20 нг/мл	20,3 ± 2,15 нг/мл	101,7	18,1
кукурудзяне борошно, ТОВ «Лавка Традицій», Львів, Україна	90 нг/мл	84,3 ± 1,5 нг/мл	93,7	3,1
пшеничне борошно, ТОВ «Хуторок», Зміїв, Україна	60 нг/мл	56,7 ± 1,4 нг/мл	94,4	4,1
кукурудзяне борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	40 нг/мл	41,7 ± 1,4 нг/мл	104,2	5,7

Продовження таблиці 6.1

Зразок	Додано	Визначено ^а	R ^б , %	RSD ^в , %
пшеничне борошно, ТОВ «Аро», Київ, Україна	80 нг/мл	82,7 ± 0,5 нг/мл	103,3	1,1
пшеничне борошно, ТОВ «Зерновіта», Озерянка, Україна	40 нг/мл	38,5 ± 1,9 нг/мл	96,3	4,9
житнє борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	60 нг/мл	66,3 ± 6,5 нг/мл	110,6	9,8
кукурудзяне борошно, ТОВ «Альта- Віста», Київ, Україна	80 нг/мл	85,3 ± 6,9 нг/мл	106,7	8,0
пшеничне борошно «ЕуроМіл», Бориспіль, Україна	90 нг/мл	93,5 ± 11,2 нг/мл	103,9	12,0
пшеничне борошно ТОВ «Хуторок», Зміїв, Україна	150 нг/мл	143,9 ± 19,8 нг/мл	96,0	13,7
пшеничне борошно ТОВ «Зернарі», Олександрія, Україна	250 нг/мл	259,2 ± 21,3 нг/мл	103,7	8,2
Стандартний контрольний зразок: афлатоксини в кукурудзі (CSSMY013)	7 мкг/кг	6,1 ± 0,52 мкг/кг	87,0	7,0

Примітка: ^а Результат представлено середнім значенням ± стандартна похибка (n=15); ^б Вилучення (Recovery (R)) = (виявлена концентрація/концентрація АФВ1 у зразку) × 100%; ^в Відносне стандартне відхилення розраховували згідно рівняння: $RSD = 100\% \times SD / \text{середнє значення}$;

Для підтвердження можливості виявлення АФВ1 у зразках різного складу, було обрано вільне від мікотоксинів пшеничне, кукурудзяне та житнє борошно, в які додавали відому кількість АФВ1 (20–250 нг/мл). Крім того, використовували стандартні контрольні зразки природно забрудненої меленої кукурудзи з відомою концентрацією АФВ1, охарактеризовані виробником за

допомогою стандартного методу визначення мікотоксинів – рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (див. розділ Матеріали та методи).

Відомо, що збіжність аналітичних методів є задовільною, коли середні значення ступеню вилучення R (recovery) становлять 70–120% і відносне стандартне відхилення $\leq 20\%$ [223, 224]. Розроблений нами метод визначення АФВ1 має задовільну точність, оскільки значення відносного стандартного відхилення в усіх випадках є нижчими за 18,1% (значення коливались від 1,1% до 18,1%) (див. табл. 6.1).

Отже, згідно з отриманими результатами, запропонована біосенсорна система на основі високочутливих МІП мембран – надійний метод аналізу АФВ1 в харчових продуктах з хорошим ступенем вилучення і задовільною точністю [205]. У порівнянні з більшістю традиційних методів, аналіз за допомогою біосенсорних систем на основі МІП мембран займає менше часу та має меншу вартість. Крім того, розроблена нами методика визначення АФВ1 була успішно апробована та затверджена ДП «Укрметртестстандарт» (додаток Б) [225].

6.2. Визначення ЗОН у зразках харчових продуктів та тваринних кормів

Результати визначення ЗОН в реальних зразках за допомогою створеної оптичної біосенсорної системи на основі МІП мембран представлені в таблиці 6.2. Як і в попередньому випадку використовували два типи зразків: вільне від мікотоксинів борошно, з доданою концентрацією ЗОН (1–50 мкг/мл) та природно забруднені ЗОН контрольні зразки меленої кукурудзи (див. розділ Матеріали та методи).

Таблиця 6.2

Визначення зеараленону в зразках борошна

Зразок	Додано	Визначено ^а	RSD ^б , %	R ^в , %
пшеничне борошно ТОВ «Зернарі», Олександрія, Україна	1 мкг/мл	1,5 ± 0,24 мкг/мл	12,05	150
пшеничне борошно ТОВ «Хуторок», Зміїв, Україна	5 мкг/мл	4,8 ± 0,5 мкг/мл	10,5	96
пшеничне борошно «EuroMill», Бориспіль, Україна	10 мкг/мл	10,5 ± 0,7 мкг/мл	7,03	105
кукурудзяне борошно, ТОВ «Лавка Традицій», Львів, Україна	25 мкг/мл	23,7 ± 1,8 мкг/мл	7,8	94,7
кукурудзяне борошно, ТОВ «Альта-Віста», Київ, Україна	50 мкг/мл	50,1 ± 0,5 мкг/мл	1,07	100,1
кукурудзяне борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	1 мкг/мл	1,9 ± 0,4 мкг/мл	21,1	190,0
пшеничне борошно, ТОВ «КиївМлин», Київ, Україна	3 мкг/мл	4 ± 0,5 мкг/мл	12,5	133,3
житнє борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	5 мкг/мл	5 ± 0,5 мкг/мл	10,0	110,0
Стандартний контрольний зразок, Зеараленон в борошні, Romer Labs-Check-Sample-Survey CSSMY012-M17161DZ	114,2 мкг/кг	113,2 ± 7,8 мкг/кг	6,9	99,1

Примітка: ^а Результат представлено середнім значенням ± стандартна похибка (n=15); ^б Відносне стандартне відхилення розраховували згідно рівняння: $RSD = 100\% \times SD / \text{середнє значення}$; ^в Вилучення (Recovery (R)) = (виявлена концентрація/додана концентрація) × 100%.

Отримані результати демонструють, що запропонована біосенсорна система для визначення ЗОН має гарну відтворюваність та збіжність – значення ступеню вилучення (R) становлять 94,7–190%. Крім того, точність аналітичного методу в одиницях відносного стандартного відхилення становить <20% що є задовільним показником згідно загальноприйнятих стандартів [224]. Отримані результати доводять, що виявлення зеараленону за допомогою створеної біосенсорної системи є надійним та відтворюваним.

Отже, створена біосенсорна система на основі МПП мембран дозволяє з високою точністю та відтворюваністю визначати ЗОН у реальних зразках борошна, про що свідчать отримані результати. Спільно з ДП «Укрметртестстандарт» проведено повний комплекс метрологічних досліджень розробленої нами біосенсорної системи та затверджено методику визначення ЗОН у зразках харчових продуктів (додаток В) [226].

6.3. Апробація сенсорів на основі МПП-AgHЧ мембран для визначення АФВ1 та ЗОН

Створені сенсори на основі МПП-AgHЧ мембран були апробовані з метою визначення цільових мікотоксинів в реальних зразках харчових продуктів. Для цього були використанні два типи реальних зразків, природно та штучно контамінованих АФВ1 та ЗОН (див. розділ Матеріали і методи).

Результати апробації біосенсорної системи на основі МПП-AgHЧ мембран для визначення афлатоксину В1 у реальних зразках наведено таблиці 6.3. Показано, що АФВ1-чутливі сенсорні елементи на основі МПП-AgHЧ мембран здатні з високою чутливістю та надійністю виявляти цільовий токсин в зразках

реальних харчових продуктів. Ступінь вилучення (R) запропонованого методу коливається в межах 90–109 %, тоді як значення RSD варіює від 23,1 до 4,02.

Таблиця 6.3

Визначення афлатоксину В1 за допомогою флуориметричної біосенсорної системи на основі МІП- AgНЧ мембран

Зразок	Додано	Визначено ^а	RSD ^б , %	R ^в , %
Матеріал контролю якості, Афлатоксини в кукурудзі (CSSMY013 – M17411A, Romer Labs)	7 мкг/кг	6,4 ± 3,2 мкг/кг	22,9	109
Матеріал контролю якості Афлатоксини в кукурудзі, низький рівень (Romer Labs)	4,2 ± 1,7 мкг/кг	4,5 ± 2 мкг/кг	23,1	93
Матеріал контролю якості Афлатоксини в кукурудзі, середній рівень (Romer Labs)	7,3 ± 2,9 мкг/кг	7,7 ± 0,9 мкг/кг	4,02	94
Кукурудзяне борошно, ТОВ «Лавка Традицій», Львів, Україна	1 нг/мл	1,9 ± 0,9 нг/мл (0,8 мкг/кг)	12,04	90
Кукурудзяне борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	5 нг/мл	5,4 ± 0,8 нг/мл (2 мкг/кг)	15,5	93

Примітка: ^а Результат представлено середнім значенням ± стандартна похибка (n=5); ^б Відносне стандартне відхилення розраховували згідно рівняння: $RSD = 100\% \times SD / \text{середнє значення}$; ^в Вилучення (Recovery (R)) = (виявлена концентрація/додана концентрація) × 100%.

Також, створені сенсори на основі МІП-AgНЧ мембран були протестовані щодо визначення ЗОН в реальних зразках харчових продуктів (табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Визначення зеараленону за допомогою флуориметричної біосенсорної системи на основі МІП- AgНЧ чипів

Зразок	Додано	Визначено ^а	RSD ^б , %	R ^в , %
Матеріал контролю якості Зеараленон в кукурудзі, середній рівень (Romer Labs)	293 ± 59 мкг/кг	278,3 ± 5,5 мкг/кг	1,5	105
Матеріал контролю якості Зеараленон в кукурудзі, низький рівень (Romer Labs)	55 ± 15 мкг/кг	53,2 ± 1,4 мкг/кг	5,8	103
кукурудзяне борошно, ТОВ «Лавка Традицій», Львів, Україна	25 нг/мл	24,6 ± 2,8 мкг/кг	12,8	102
кукурудзяне борошно, ТОВ «Лавка Традицій», Львів, Україна	25 мкг/мл	23,4 ± 2,1 мкг/мл	11,8	107
кукурудзяне борошно, ТОВ «ДобродіяФудз», Київ, Україна	50 нг/мл	50,8 ± 0,7 нг/мл	3,4	98
пшеничне борошно, ТОВ «Хуторок», Зміїв, Україна	5 мкг/мл	4,9 ± 1,2 мкг/мл	5,4	102

Примітка: ^а Результат представлено середнім значенням ± стандартна похибка (n=5); ^б Відносне стандартне відхилення розраховували згідно рівняння: $RSD = 100\% \times SD / \text{середнє значення}$. ^в Вилучення (Recovery (R)) = (виявлена концентрація/додана концентрація) × 100%;

Визначення ЗОН за допомогою створених сенсорних елементів на основі модифікованих МІП-AgНЧ мембран відбувається з задовільною точністю та

збіжністю. Показано (див. табл. 6.4), що значення ступеню вилучення коливається в межах 98–107 %. Значення відносного стандартного відхилення не перевищували 12,8 % ($RSD = 1,5 \% - 12,8 \%$).

Отже, розроблені сенсорні елементи на основі МІП мембран з вбудованими в їхню структуру $AgHCl$ здатні надійно та точно виявляти цільові мікотоксини (АФВ1 та ЗОН) у реальних зразках харчових продуктів з високою чутливістю.

6.4. Висновки до розділу

За допомогою розроблених біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків вдалося успішно виявляти цільові мікотоксини у реальних зразках харчових продуктів та тваринних кормів. Пропонований метод аналізу характеризується високою вітворюваністю, точністю та збіжністю отриманих результатів. Крім того, визначення мікотоксинів за допомогою біосенсорних систем на основі МІП мембран займає менше часу та має меншу вартість у порівнянні з традиційними методами визначення АФВ1 чи ЗОН в продуктах харчування та тваринних кормах. Розроблені методики визначення АФВ1 та ЗОН у зразках харчових продуктів та тваринних кормах були успішно апробовані та затверджені спільно з ДП «Укрметртестстандарт».

Також, було показано, що сенсорні елементи на основі МІП мембран з вбудованими в їхню структуру $AgHCl$ здатні з високою точністю та чутливістю виявляти цільові мікотоксини (АФВ1 та ЗОН) у реальних зразках харчових продуктів та тваринних кормах.

Результати, представлені у розділі, опубліковані у наукових працях [199, 202, 207, 208, 213, 219–222].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Мікотоксини – афлатоксин В1 (АФВ1) та зеараленон (ЗОН) – небезпечні харчові токсини природнього походження, які можуть забруднювати продукти харчування та тваринні корма на основі зернових. Вживання забруднених продуктів несе загрозу як для здоров'я людей, так і для тварин. Тому, з метою попередження розвитку мікотоксикозів, дуже важливим є вчасне виявлення цих мікотоксинів в зернових продуктах харчування та тваринних кормах. Для цього існують різноманітні методи визначення мікотоксинів. Проте, сучасні тенденції розвитку аналітичних технологій вимагають створення надійних, швидких та простих методів. Одним з найбільш актуальних підходів до створення нових методів визначення згаданих мікотоксинів – розробка та створення біосенсорів на основі полімерів-біоміметиків та смартфонів.

З метою забезпечення надійного, високочутливого та селективного аналізу, у пропонованих біосенсорних системах полімери-біоміметики, синтезовані у вигляді молекулярно-імпринтованих полімерних (МІП) мембран, використали як чутливі елементи. Мікотоксин-селективні сенсорні елементи отримували згідно принципів молекулярного імпринтингу, що передбачало формування у структурі МІП мембран високочутливих штучних рецепторних сайтів зв'язування цільових мікотоксинів. Утворені штучні рецепторні сайти за своєю селективністю не поступаються своїм природнім аналогам – біологічним рецепторам, антитілам. Проте, за рахунок стабільності полімерних матеріалів, забезпечують надійний, високочутливий аналіз впродовж тривалого часу. Крім того, сенсорні елементи на основі МІП мембран – мають простий та дешевий метод синтезу, а також є легко інтегрованими у біосенсорний пристрій, їм властива нескладна реєстрація сенсорних відгуків. Оскільки, згадані

мікотоксини здатні до флуоресценції, після зв'язування з штучними рецепторними сайтами біоміметиків, їх можна виявляти після опромінення ультрафіолетовим світлом. Це ініціює флуоресценцію мікотоксинів на поверхні МПП мембран, інтенсивність якої відповідає концентрації токсину в зразку. Такі оптичні сенсорні відгуки реєструються або за допомогою стандартного лабораторного спекрофлуориметра або смартфона. У цьому випадку, смартфон виконує роль детектора та аналізатора оптичних сенсорних відгуків: флуоресценція мікотоксинів на поверхні МПП мембран реєструється за допомогою камери смартфона, а отримані зображення – аналізуються в мобільному застосунку Spotxel® Reader, 2.1.5. Таким чином, використання смартфона в якості детектора забезпечує швидкий та простий аналіз афлатоксину В1 та зеараленону у продуктах харчування та тваринних кормах, доступний будь-якому користувачу смартфона.

На першому етапі роботи, були оптимізовані та синтезовані сенсорні елементи у вигляді МПП мембран. З метою отримання АФВ1- та ЗОН-селективних штучних рецепторних сайтів у структурі полімерів-біоміметиків, під час синтезу МПП використовували псевдоматриці – етил-2-оксоциклопентан-карбонову кислоту (структурний аналог АФВ1) та циклододецилдигідробензоат (структурний аналог ЗОН). Після синтезу псевдоматриці видалялись, а на їхньому місці лишались сайти зв'язування відповідних мікотоксинів зі збереженими формою та розташуванням функціональних груп, що створювало можливість зв'язування цільових аналітів. Більше того, на відміну від мікотоксинів, псевдоматриці безпечні для людини, дешевші та не здатні до флуоресценції, що попереджає отримання псевдопозитивних результатів під час аналізу та підвищує чутливість розроблених біосенсорних систем.

Використовуючи результати комп'ютерного моделювання та данні літератури, було обрано низку потенційних функціональних мономерів для синтезу відповідних МПП мембран та визначено найкращі функціональні мономерні. Для синтезу АФВ1-селективних МПП були використані

функціональні мономери аліламін, ДЕАЕМ, МБА, АА та АМПСК, а для ЗОН-селективних МІП – ЕГМФ, ІК, МК, МБА, 1-АЛП, 4-ВП, ДЕАЕМ та ГЕМА. За використанням модельних розчинів АФВ1 та ЗОН було визначено здатність синтезованих МІП мембран зв'язувати цільові мікотоксини. Показано, що найвищі значення диференційних сенсорних відгуків (ДСВ) у відповідь на наявність АФВ1 у дослідному зразку виявляли МІП мембрани, синтезовані з використанням функціонального мономера акриламід (АА) з мономерної суміші з молярним співвідношенням псевдоматриця: АА 1:2. Для ЗОН-селективних МІП мембран найкращі розпізнавальні властивості щодо цільового аналіту були продемонстровані для МІП мембран, які синтезовані з використанням функціональних мономерів ЕГМФ та 1-АЛП з молярними співвідношеннями псевдоматриця: функціональний мономер 1:2 та 1:4. Отримані результати з оптимізації функціональних мономерів відповідали результатам комп'ютерного моделювання та підтверджують результати, отримані іншими авторами (зокрема, представленими Urraka J.L. зі співавторами [131 197] щодо ефективності 1-АЛП-вмісних МІП у формі полімерних частинок для аналізу ЗОН у високоефективній рідинній хроматографії).

Для МІП мембран оптимізованого складу також було досліджено вплив різних умов аналізованого розчину (рН, концентрація буфера та солі) на їхні розпізнавальні властивості. Найвищі величини ДСВ створених МІП у відповідь на додавання АФВ1 спостерігали за рН аналізованого розчину 6,0 у 20 мМ натрій-фосфатному буфері. Більше того, присутність 5–150 мМ хлориду натрію у зразку не впливала на величини сенсорних відгуків АА-вмісних МІП мембран. Подібну ситуацію спостерігали також для ЗОН-чутливих МІП мембран. Найвищі показники ДСВ отримували за аналізу в нейтральних розчинах (20 мМ натрій-фосфатний буфер з рН 6,0–7,0). Зростання іонної сили аналізованого розчину не впливало на здатність штучних рецепторних сайтів у складі ЕГМФ-вмісних МІП мембран розпізнавати ЗОН, але для 1-АЛП-вмісних МІП найвищі показники ДСВ були зафіксовані за концентрації хлориду натрію 150 мМ.

Після оптимізації пропонованих сенсорних елементів, було досліджено робочі характеристики біосенсорних систем створених на основі МІП мембран. Біосенсорна система на основі АА-вмісних МІП мембран здатна виявляти АФВ1 з межею визначення 10 нг/мл, лінійний динамічний діапазон становить 10–500 нг/мл. Розроблена біосенсорна система – високоселективна і не виявляє у зразку близькі структурні аналоги АФВ1: АФГ2 та ОхА. Біосенсорна система на основі ЗОН-чутливих біоміметиків виявляє цільовий мікотоксин з межею визначення 1 мкг/мл, лінійний динамічний діапазон визначення ЗОН складає 1–25 мкг/мл. Обидві ЗОН-чутливі біосенсорні системи (на основі ЕГМФ- і 1-АЛП-вмісних МІП мембран) здатні до високоселективного виявлення цільового аналіту, на відміну від його близьких структурних аналогів та інших мікотоксинів. Ба більше, для 1-АЛП-вмісних МІП мембран було продемонстровано високі рівні взаємодії з метаболітом ЗОН – α -зеараленолом. Ця властивість 1-АЛП-вмісних МІП мембран може бути використана для розроблення методів персоналізованої діагностики на основі смарт-сенсорів. До того ж за умови зберігання за кімнатної температури, стабільність біосенсорних систем на основі розроблених полімерів-біоміметиків для виявлення АФВ1 та ЗОН становить 18 місяців.

Розроблені полімери-біоміметики були використані для створення лабораторних прототипів оптичних біосенсорних систем на основі смартфонів для виявлення харчових мікотоксинів – АФВ1 та ЗОН. Показано, що АФВ1-селективні біосенсорні системи на основі смартфона мають межу визначення 15 нг/мл, лінійний динамічний діапазон визначення становить 15–100 нг/мл. Біосенсорна система на основі ЗОН-чутливих МІП мембран та смартфона виявляє ЗОН з межею визначення 1 мкг/мл та лінійним динамічним діапазоном – 1–10 мкг/мл.

Зважаючи на потенційну необхідність визначати згадані мікотоксини у продуктах харчування призначених для дітей, проведено роботу з покращення робочих характеристик пропонованих біосенсорних систем. Для цього було

розроблено та досліджено два підходи до підвищення чутливості аналізу за допомогою МІП мембран. По-перше, створено біосенсорну систему для високочутливого виявлення ЗОН у конкурентному варіанті аналізу з використанням додаткового флуоресцентного маркеру. Використовуючи флуоресцентний маркер (ПАРА) вдалося у 100 разів покращити чутливість біосенсорної системи на основі МІП мембран, межа виявлення ЗОН становить 10 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон 10–100 нг/мл. По-друге, розроблено універсальну методику підвищення чутливості біосенсорного аналізу на основі полімерів-біоміметиків за допомогою срібних наночастинок та явища плазмонного підсилення флуоресценції. Для цього розроблено методику отримання срібних наночастинок (AgНЧ) у структурі МІП мембран *in situ* під час їхнього синтезу в результаті відновлення нітрату срібла (I) та отримано високочутливі та селективні МІП-AgНЧ мембрани для визначення АФВ1 та ЗОН. Досліджено, що підсилення флуоресценції АФВ1 зумовлене сферичними AgНЧ, розміром 30–70 нм, які рівномірно розподілені в структурі полімеру. Межа визначення АФВ1 за допомогою біосенсорної системи на основі МІП-AgНЧ мембран – 0,3 нг/мл, лінійний динамічний діапазон визначення 0,3–25 нг/мл. Отримані значення межі визначення в 33 разів менше, ніж для біосенсорної системи на основі немодифікованих МІП мембран. Наночастинки срібла, які відповідають за підсилення флуоресценції ЗОН, мали також сферичну форму та розмір 20–30 нм. Розроблені ЗОН-чутливі біосенсорні системи виявляють аналіт з межею визначення 5 нг/мл – це у 200 разів краще, ніж для біосенсорної системи на основі МІП мембран, синтезованих без додавання нітрату срібла (I). Лінійний динамічний діапазон визначення ЗОН становив 5 нг/мл – 25 мкг/мл. Використання ж МІП-AgНЧ мембран у іммобілізованій на скляних поверхнях формі – зручніше та простіше, ніж МІП мембран, синтезованих за відсутності підкладінок.

Наостанок розроблені оптичні біосенсорні системи були успішно апробовані для виявлення цільових мікотоксинів у реальних зразках харчових продуктів та тваринних кормів. Доведено, що отримані результати збіжні та

високоточні. До того ж, якщо порівняти з традиційними методами визначення АФВ1 та ЗОН, аналіз мікотоксинів за допомогою розроблених біосенсорних систем достатньо швидкий та дешевий. Пропоновані методики визначення АФВ1 та ЗОН у зразках харчових продуктів та тваринних кормах були успішно апробовані та затверджені ДП «Укрметртестстандарт».

Також, досліджено можливість виявлення цільових мікотоксинів у реальних зразках за допомогою біосенсорних систем на основі МПП-AgНЧ. Показано, що ці сенсорні системи з високою точністю та чутливістю виявляють цільові мікотоксини (АФВ1 та ЗОН) у реальних зразках харчових продуктів та тваринних кормах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нові підходи до створення оптичних біосенсорних систем на основі мікотоксин-селективних полімерів-біоміметиків та смартфонів для визначення харчових токсинів: афлатоксину В1 та зеараленону.

1. Використовуючи технологію молекулярного імпринтингу, отримано високочутливі, високоселективні та високостабільні сенсорні елементи оптичних біосенсорів у вигляді МІП мембран зі штучними рецепторними сайтами зв'язування АФВ1 та ЗОН.

2. Встановлено, що високоселективні рецепторні сайти розпізнання АФВ1 формуються у структурі акриламід-вмісних полімерів-біоміметиків за умови молярного співвідношення псевдоматриця: акриламід у мономерній суміші для синтезу полімеру 1:2. Високоселективні рецепторні сайти розпізнавання ЗОН у полімерах-біоміметиках формуються при використанні функціональних мономерів 1-алілпіперазину та етиленглікольметакрилатфосфату, за співвідношень псевдоматриця: функціональний мономер у вихідній мономерній суміші 1:4 та 1:2, відповідно.

3. Визначено оптимальні умови розпізнання АФВ1 та ЗОН штучними рецепторними сайтами, які утворені в структурі полімерів-біоміметиків. Найкраще розпізнавання АФВ1 та ЗОН за допомогою акриламід- та етиленглікольметакрилатфосфат-вмісних МІП мембран спостерігали за нейтральних значень рН аналізованого розчину (6,0 та 7,0, відповідно) у 20 мМ натрій-фосфатному буфері. Найвищі значення сенсорних відгуків для 1-алілпіперазин-вмісних МІП мембран у відповідь на додавання ЗОН реєстрували за рН аналізованого розчину 6,0, концентрації натрій-фосфатного буфера 20 мМ та концентрації хлориду натрію 150 мМ.

4. Використовуючи АФВ1- та ЗОН-селективні МП мембрани оптимізованого складу, створено лабораторні прототипи високоселективних біосенсорних систем на основі смартфона та визначено їхні аналітичні характеристики: межа визначення (15 нг/мл та 1 мкг/мл для АФВ1 та ЗОН, відповідно), лінійний динамічний діапазон (15–300 нг/мл та 1–10 мкг/мл для АФВ1 та ЗОН, відповідно), стабільність за зберігання – 18 місяців.

5. Розроблено підходи для покращення аналітичних характеристик біосенсорних систем на основі МП мембран для визначення мікотоксинів за допомогою флуоресцентного маркера у конкурентному варіанті аналізу, та наночастинок срібла і явища плазмонного підсилення флуоресценції. Використання флуоресцентного маркера (2-[пірен-1-карбоніл)аміно]етил 2,4-дигідрооксибензоат) у конкурентному варіанті аналізу забезпечило зменшення межі визначення зеараленону у 100 разів (до 10 нг/мл), лінійний динамічний діапазон роботи сенсора становив 10–100 нг/мл.

6. Вперше розроблено метод синтезу наночастинок срібла *in situ* у структурі АФВ1- та ЗОН-селективних МП мембран. Використання явища плазмонного підсилення флуоресценції у МП-AgНЧ мембранах забезпечило істотне покращення робочих характеристик біосенсорів на їхній основі: зниження меж визначення АФВ1 та ЗОН у 33 та 200 разів, відповідно, порівняно до сенсорів на основі немодифікованих МП мембран. Межі визначення афлатоксину В1 та зеараленону становили 0,3 нг/мл та 5 нг/мл, відповідно.

7. Всі розроблені оптичні біосенсорні системи на основі полімерів-біоміметиків були успішно апробовані для визначення АФВ1 та ЗОН в реальних зразках харчових продуктів та тваринних кормах, розроблені методики визначення цільових мікотоксинів апробовано та затверджено ДП «Укрметртестстандарт».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Eskola , M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2773-2789.
2. Zingales, V., Taroncher, M., Martino, P. A., Ruiz, M. J., & Caloni, F. (2022). Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. *Toxins*, 14(7), 445.
3. World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56.
4. Biomin (2021). BIOMIN World Mycotoxin Survey 2021. Available online: <https://www.biomin.net/science-hub/world-mycotoxin-survey-impact-2021/>
5. Mahato, D. K., Devi, S., Pandhi, S., Sharma, B., Maurya, K. K., Mishra, S., ... & Kumar, P. (2021). Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. *Toxins*, 13(2), 92.
6. López-García, R. (2022). Mycotoxin management: an international challenge. In *Ensuring Global Food Safety* (pp. 213–219). Academic Press.
7. Babu, D., & Muriana, P. M. (2014). Sensitive quantification of aflatoxin B1 in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and real-time immunoquantitative-PCR. *Toxins*, 6(12), 3223–3237.
8. Liang, Y., Baker, M. E., Yeager, B. T., & Denton, M. B. (1996). Quantitative analysis of aflatoxins by high-performance thin-layer chromatography utilizing a

- scientifically operated charge-coupled device detector. *Analytical Chemistry*, 68(22), 3885–3891.
9. Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2010). Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. *Food additives & contaminants: part a*, 27(12), 1683–1693.
 10. Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237–247.
 11. Younis, Y. M., & Malik, K. M. (2003). TLC and HPLC assays of aflatoxin contamination in Sudanese peanuts and peanut products. *Kuwait J Sci Eng*, 30(1), 79–93.
 12. Singh, K., & Kumari, A. (2022). Extraction, Characterization, and Analysis of Mycotoxins. In *Mycotoxins and Mycotoxicoses* (pp. 145–153). Springer, Singapore.
 13. Azri, F. A., Sukor, R., Selamat, J., Abu Bakar, F., Yusof, N. A., & Hajian, R. (2018). Electrochemical immunosensor for detection of aflatoxin B1 based on indirect competitive ELISA. *Toxins*, 10(5), 196.
 14. Ertekin, Ö., Öztürk, S., & Öztürk, Z. Z. (2016). Label free QCM immunobiosensor for AFB1 detection using monoclonal IgA antibody as recognition element. *Sensors*, 16(8), 1274.
 15. Sun, L., Wu, L., & Zhao, Q. (2017). Aptamer based surface plasmon resonance sensor for aflatoxin B1. *Microchimica Acta*, 184(8), 2605–2610.
 16. Wei, T., Ren, P., Huang, L., Ouyang, Z., Wang, Z., Kong, X., ... & He, Q. (2019). Simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance. *Food chemistry*, 300, 125176.
 17. Sergeyeva, T. A., Gorbach, L. A., Piletska, E. V., Piletsky, S. A., Brovko, O. O., Honcharova, L. A., ... & El'skaya, A. V. (2013). Colorimetric test-systems for

- creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes. *Analytica chimica acta*, 770, 161–168.
18. Sergeyeva, T. A., Chelyadina, D. S., Gorbach, L. A., Brovko, O. O., Piletska, E. V., Piletsky, S. A., ... & El'skaya, A. V. (2014). Colorimetric biomimetic sensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes for highly-selective detection of phenol in environmental samples. *Biopolymers and Cell*.
 19. Sergeyeva, T.A., Satyr, A.V., Piletska, E.V., Gorbach, L.A., Brovko, O.O., El'skaya, A.V. (2016). Biosensor system for detection of bisphenol A in aqueous solutions. *Polym. J.*, 38(3), 261–266.
 20. Sergeyeva, T.A., Piletska, O.V., Gorbach, L.A., Ivanova, A.V., Brovko, O.O., El'ska, H.V. (2015). Sensor system for sulfamethoxazole detection based on molecularly imprinted polymer membranes. *Scientif. News Natl. Techn. Univ. Ukraine Kyiv Polytechnic Inst.*, 3, 61–67.
 21. Liu, J., Geng, Z., Fan, Z., Liu, J., & Chen, H. (2019). Point-of-care testing based on smartphone: The current state-of-the-art (2017–2018). *Biosensors and Bioelectronics*, 132, 17–37.
 22. Lu, Y., Shi, Z., & Liu, Q. (2019). Smartphone-based biosensors for portable food evaluation. *Current Opinion in Food Science*, 28, 74–81.
 23. Zangheri, M., Di Nardo, F., Calabria, D., Marchegiani, E., Anfossi, L., Guardigli, M., ... & Roda, A. (2021). Smartphone biosensor for point-of-need chemiluminescence detection of ochratoxin A in wine and coffee. *Analytica Chimica Acta*, 1163, 338515.
 24. Zhang, L., Zhang, Z., Tian, Y., Cui, M., Huang, B., Luo, T., ... & Wang, H. (2021). Rapid, simultaneous detection of mycotoxins with smartphone recognition-based immune microspheres. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(14), 3683–3693.

25. Choi, S. W., Chang, H. J., Lee, N., & Chun, H. S. (2011). A surface plasmon resonance sensor for the detection of deoxynivalenol using a molecularly imprinted polymer. *Sensors*, 11(9), 8654–8664.
26. Lowdon, J. W., Diliën, H., Singla, P., Peeters, M., Cleij, T. J., van Grinsven, B., & Eersels, K. (2020). MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays—An overview of the current status quo. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 325, 128973.
27. Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi chemical society*, 15(2), 129–144.
28. Huffman, J., Gerber, R., & Du, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93(9), 764–776.
29. Calado, T., Fernández-Cruz, M. L., Verde, S. C., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. *Food chemistry*, 240, 463–471.
30. Gacem, M. A., Ould El Hadj-Khelil, A., Boudjemaa, B., & Gacem, H. (2020). Mycotoxins Occurrence, Toxicity and Detection Methods. In *Sustainable Agriculture Reviews 40* (pp. 1–42). Springer, Cham.
31. Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., & Manyes, L. (2020). Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111161.
32. Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., & Pavlović, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754.
33. Jafarzadeh, S., Hadidi, M., Forough, M., Nafchi, A. M., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). The control of fungi and mycotoxins by food active packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19.

34. Alam, S., Nisa, S., & Daud, S. (2022). Mycotoxins in Environment and Its Health Implications. In *Hazardous Environmental Micro-pollutants, Health Impacts and Allied Treatment Technologies* (pp. 289–318). Springer, Cham.
35. Mata, A. T., Ferreira, J. P., Oliveira, B. R., Batoréu, M. C., Crespo, M. B., Pereira, V. J., & Bronze, M. R. (2015). Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. *Food chemistry*, 176, 455–464.
36. Zhang, L., Dou, X. W., Zhang, C., Logrieco, A. F., & Yang, M. H. (2018). A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. *Toxins*, 10(2), 65.
37. Maragos, C. (2010). Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3(4), 369–383.
38. Khodaei, D., Javanmardi, F., & Khaneghah, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: A three-year survey. *Current Opinion in Food Science*, 39, 36–42.
39. Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., & Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(3), 2332–2381.
40. Ates, E., Mittendorf, K., Stroka, J., & Senyuva, H. (2013). Determination of Fusarium mycotoxins in wheat, maize and animal feed using on-line clean-up with high resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1), 156–165.
41. Contreras-Medina, L. M., Espinosa-Calderon, A., Duarte-Galvan, C., Fernandez-Jaramillo, A. A., Muñoz-Huerta, R. F., Millan-Almaraz, J. R., ... & Torres-Pacheco, I. (2013). Characteristics of mycotoxin analysis tools for tomorrow. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, 289–295.
42. Espinosa-Calderón, A., Contreras-Medina, L. M., Muñoz-Huerta, R. F., Millán-Almaraz, J. R., González, R. G. G., & Torres-Pacheco, I. (2011). Methods for

- detection and quantification of aflatoxins. *Aflatoxins: detection, measurement and control*. New York: InTech, 109–128.
43. Agag, B. I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds: 1-aflatoxins. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res*, 7(1), 173–205.
 44. Chandra, P. (2021). Aflatoxins: Food Safety, Human Health Hazards and Their Prevention. In *Aflatoxins-Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*. IntechOpen.
 45. Wild, C. P., & Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471–481.
 46. Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33(1), 65–73.
 47. Bbosa, G. S., Kitya, D., & Ogwal-Okeng, J. (2013). Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis.
 48. Zhang, G. L., Feng, Y. L., Song, J. L., & Zhou, X. S. (2018). Zearalenone: A mycotoxin with different toxic effect in domestic and laboratory animals' granulosa cells. *Frontiers in Genetics*, 9, 667.
 49. Poór, M., Kunsági-Máté, S., Sali, N., Kőszegi, T., Szenté, L., & Peles-Lemli, B. (2015). Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 151, 63–68.
 50. Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., & Golinski, P. (2008). Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 209–220.

- 51.Fink-Gremmels, J., & Malekinejad, H. J. A. F. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 326–341.
- 52.Parveen, M., Zhu, Y., & Kiyama, R. (2009). Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. *FEBS letters*, 583(14), 2377–2384.
- 53.Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental toxicology and pharmacology*, 48, 141–149.
- 54.D'mello, J. P. F., Placinta, C. M., & Macdonald, A. M. C. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal feed science and technology*, 80(3–4), 183–205.
- 55.Khosrokhavar, R., Rahimifard, N., Shoeibi, S., Hamedani, M. P., & Hosseini, M. J. (2009). Effects of zearalenone and α -Zearalenol in comparison with Raloxifene on T47D cells. *Toxicology mechanisms and methods*, 19(3), 246–250.
- 56.Dees, C., Foster, J. S., Ahamed, S., & Wimalasena, J. (1997). Dietary estrogens stimulate human breast cells to enter the cell cycle. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 3), 633–636.
- 57.Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., & Bacha, H. (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in vitro*, 18(4), 467–474.
- 58.Massart, F., & Saggese, G. (2010). Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International journal of andrology*, 33(2), 369–376.

59. Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., & Jakowicki, J. (1998). Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekologia polska*, 69(5), 363–366.
60. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., & Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, 45(1), 1–18.
61. Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101–134.
62. Yang, J., Li, J., Jiang, Y., Duan, X., Qu, H., Yang, B., ... & Sivakumar, D. (2014). Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(1), 64–83.
63. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2), 137.
64. Oliveira, I. S., da Silva Junior, A. G., de Andrade, C. A. S., & Oliveira, M. D. L. (2019). Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *Current opinion in food science*, 29, 64–79.
65. Chen, X., Wu, H., Tang, X., Zhang, Z., & Li, P. (2021). Recent Advances in Electrochemical Sensors for Mycotoxin Detection in Food. *Electroanalysis*.
66. He, B., & Yan, X. (2019). A “signal-on” voltammetric aptasensor fabricated by hcPt@ AuNFs/PEI-rGO and Fe₃O₄NRs/rGO for the detection of zearalenone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 290, 477–483.
67. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458.

68. Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L., & Palleschi, G. (2007). A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica chimica acta*, 605(2), 111–129.
69. Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Gorniak, L., Stela, M., & Bijak, M. (2021). The existing methods and novel approaches in mycotoxins' detection. *Molecules*, 26(13), 3981.
70. Tang, J., Huang, Y., Cheng, Y., Huang, L., Zhuang, J., & Tang, D. (2018). Two-dimensional MoS₂ as a nano-binder for ssDNA: Ultrasensitive aptamer based amperometric detection of Ochratoxin A. *Microchimica Acta*, 185(3), 1–8.
71. He, B., & Yan, X. (2019). An amperometric zearalenone aptasensor based on signal amplification by using a composite prepared from porous platinum nanotubes, gold nanoparticles and thionine-labelled graphene oxide. *Microchimica Acta*, 186(6), 1–10.
72. Liu, N., Nie, D., Tan, Y., Zhao, Z., Liao, Y., Wang, H., ... & Wu, A. (2017). An ultrasensitive amperometric immunosensor for zearalenones based on oriented antibody immobilization on a glassy carbon electrode modified with MWCNTs and AuPt nanoparticles. *Microchimica Acta*, 184(1), 147–153.
73. Shrivastava, A., & Sharma, R. K. (2022). Biosensors for the detection of mycotoxins. *Toxin Reviews*, 41(2), 618–638.
74. Chauhan, R., Bhardwaj, R., Bharadwaj, S. K., Kaushik, A., Karpoomath, R., & Basu, T. (2021). Current Trends of Electrochemical Sensing for Mycotoxins. In *Biosensors in Agriculture: Recent Trends and Future Perspectives* (pp. 275–323). Springer, Cham.
75. Montagut, Y., Garcia, J., Jiménez, Y., March, C., Montoya, Á., & Arnau, A. (2011). QCM technology in biosensors. *Biosensors-Emerging Materials and Applications*, 153–178.

76. Tang, Y., Tang, D., Zhang, J., & Tang, D. (2018). Novel quartz crystal microbalance immunodetection of aflatoxin B1 coupling cargo-encapsulated liposome with indicator-triggered displacement assay. *Analytica chimica acta*, 1031, 161–168.
77. Karczmarczyk, A., Haupt, K., & Feller, K. H. (2017). Development of a QCM-D biosensor for Ochratoxin A detection in red wine. *Talanta*, 166, 193–197.
78. Moez, E., Brice, S., & Didier, M. (2021). Biosensor and Aptamer: New in Mycotoxins Detection. In *Mycotoxins in Food and Beverages Innovations and Advances Part I* (pp. 260–290). CRC Press.
79. Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review. *Analyst*, 145(5), 1605–1628.
80. Peltomaa, R., Glahn-Martínez, B., Benito-Peña, E., & Moreno-Bondi, M. C. (2018). Optical biosensors for label-free detection of small molecules. *Sensors*, 18(12), 4126.
81. Nabok, A., Al-Jawdah, A. M., Gémes, B., Takács, E., & Székács, A. (2021). An optical planar waveguide-based immunosensors for determination of Fusarium mycotoxin zearalenone. *Toxins*, 13(2), 89.
82. Jia, M., Liao, X., Fang, L., Jia, B., Liu, M., Li, D., ... & Kong, W. (2021). Recent advances on immunosensors for mycotoxins in foods and other commodities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, 116193.
83. Majdinasab, M., Ben Aissa, S., & Marty, J. L. (2020). Advances in colorimetric strategies for mycotoxins detection: Toward rapid industrial monitoring. *Toxins*, 13(1), 13.
84. Li, W., Powers, S., & Dai, S. Y. (2014). Using commercial immunoassay kits for mycotoxins: ‘joys and sorrows’?. *World Mycotoxin Journal*, 7(4), 417–430.

85. Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M. N., Bricklebank, N., Sharrack, B., & Gardiner, P. (2018). Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, 10(1), 18–33.
86. Njumbe Ediage, E., Di Mavungu, J. D., Goryacheva, I. Y., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2012). Multiplex flow-through immunoassay formats for screening of mycotoxins in a variety of food matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 265–278.
87. Nolan, P., Auer, S., Spehar, A., Elliott, C. T., & Campbell, K. (2019). Current trends in rapid tests for mycotoxins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5), 800–814.
88. Yang, Y., Li, G., Wu, D., Liu, J., Li, X., Luo, P., ... & Wu, Y. (2020). Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in food science & Technology*, 96, 233–252.
89. Wu, J., Zeng, L., Li, N., Liu, C., & Chen, J. (2019). A wash-free and label-free colorimetric biosensor for naked-eye detection of aflatoxin B1 using G-quadruplex as the signal reporter. *Food chemistry*, 298, 125034.
90. Li, W., Li, Y., Liu, Z., Lin, B., Yi, H., Xu, F., ... & Yao, S. (2016). Insight into G-quadruplex-hemin DNzyme/RNzyme: adjacent adenine as the intramolecular species for remarkable enhancement of enzymatic activity. *Nucleic acids research*, 44(15), 7373–7384.
91. Setlem, K., Mondal, B., Shylaja, R., & Parida, M. (2020). Dual Aptamer-DNzyme based colorimetric assay for the detection of AFB1 from food and environmental samples. *Analytical biochemistry*, 608, 113874.
92. Seok, Y., Byun, J. Y., Shim, W. B., & Kim, M. G. (2015). A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of an aptamer/split DNzyme. *Analytica Chimica Acta*, 886, 182–187.

93. Hof, M., Hutterer, R., & Fidler, V. (Eds.). (2004). *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
94. Girigoswami, K., & Akhtar, N. (2019). Nanobiosensors and fluorescence based biosensors: An overview. *International Journal of Nano Dimension*, 10(1), 1–17.
95. Prieto-Simón, B., Karube, I., & Saiki, H. (2012). Sensitive detection of ochratoxin A in wine and cereals using fluorescence-based immunosensing. *Food chemistry*, 135(3), 1323–1329.
96. Pascale, M. N. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (117), 15–25.
97. Gémes, B., Takács, E., Gádoros, P., Barócsi, A., Kocsányi, L., Lenk, S., ... & Székács, A. (2021). Development of an immunofluorescence assay module for determination of the mycotoxin zearalenone in water. *Toxins*, 13(3), 182.
98. Sergeyeve, T., Yarynka, D., Piletska, E., Lyytik, R., Zaporozhets, O., Brovko, O., ... & El'skaya, A. (2017). Fluorescent sensor systems based on nanostructured polymeric membranes for selective recognition of Aflatoxin B1. *Talanta*, 175, 101–107.
99. Liu, G., Huang, X., Li, L., Xu, X., Zhang, Y., Lv, J., & Xu, D. (2019). Recent advances and perspectives of molecularly imprinted polymer-based fluorescent sensors in food and environment analysis. *Nanomaterials*, 9(7), 1030.
100. Zhu, Y., Xia, X., Deng, S., Yan, B., Dong, Y., Zhang, K., ... & He, Q. (2019). Label-free fluorescent aptasensing of mycotoxins via aggregation-induced emission dye. *Dyes and Pigments*, 170, 107572.
101. Li, C., Mi, T., Oliveri Conti, G., Yu, Q., Wen, K., Shen, J., ... & Wang, Z. (2015). Development of a screening fluorescence polarization immunoassay for the simultaneous detection of fumonisins B1 and B2 in maize. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(20), 4940–4946.

102. Zhang, X., Eremin, S. A., Wen, K., Yu, X., Li, C., Ke, Y., ... & Wang, Z. (2017). Fluorescence polarization immunoassay based on a new monoclonal antibody for the detection of the zearalenone class of mycotoxins in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(10), 2240–2247.
103. Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: springer US.
104. Reyes-De-Corcuera, J. I., Olstad, H. E., & García-Torres, R. (2018). Stability and stabilization of enzyme biosensors: the key to successful application and commercialization. *Annual review of food science and technology*, 9, 293–322.
105. Ozcelikay, G., Kaya, S. I., Ozkan, E., Cetinkaya, A., Nemutlu, E. M. İ. R. H. A. N., Kır, S., & Ozkan, S. A. (2022). Sensor-based MIP technologies for targeted metabolomics analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 146, 116487.
106. Madikizela, L. M., Nomngongo, P. N., & Pakade, V. E. (2022). Synthesis of molecularly imprinted polymers for extraction of fluoroquinolones in environmental, food and biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 208, 114447.
107. Wulff, G., Sarhan A. (1972). The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angrew. Chem. Internat. Edit.*, 11(4), 341.
108. Mosbach, K., & Ramström, O. (1996). The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/technology*, 14(2), 163–170.
109. Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical reviews*, 100(7), 2495–2504.
110. Ramström, O., & Ansell, R. J. (1998). Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. *Chirality*, 10(3), 195–209.

111. Sergeyeva, T. A., Brovko, O. O., Piletska, E. V., Piletsky, S. A., Goncharova, L. A., Karabanova, L. V., ... & El'Skaya, A. V. (2007). Porous molecularly imprinted polymer membranes and polymeric particles. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 311–319.
112. Wang, C., Qi, L., & Liang, R. (2021). A molecularly imprinted polymer-based potentiometric sensor based on covalent recognition for the determination of dopamine. *Analytical Methods*, 13(5), 620–625.
113. Uzun, L., & Turner, A. P. (2016). Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 131–144.
114. Komiyama, M., Mori, T., & Ariga, K. (2018). Molecular imprinting: materials nanoarchitectonics with molecular information. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 91(7), 1075–1111.
115. Nezhadali, A., Pirayesh, S., & Shadmehri, R. (2013). Computer-assisted sensor design and analysis of 2-aminobenzimidazole in biological model samples based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 17–23.
116. Wulff, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angewandte chemie international edition in English*, 34(17), 1812–1832.
117. Saylan, Y., Yilmaz, F., Özgür, E., Derazshamshir, A., Yavuz, H., & Denizli, A. (2017). Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications. *Sensors*, 17(4), 898.
118. Sibrian-Vazquez, M., & Spivak, D. A. (2004). Molecular imprinting made easy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(25), 7827–7833.
119. Refaat, D., Aggour, M. G., Farghali, A. A., Mahajan, R., Wiklander, J. G., Nicholls, I. A., & Piletsky, S. A. (2019). Strategies for molecular imprinting and the

- evolution of MIP nanoparticles as plastic antibodies—Synthesis and applications. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6304
120. Haupt, K., Medina Rangel, P. X., & Bui, B. T. S. (2020). Molecularly imprinted polymers: Antibody mimics for bioimaging and therapy. *Chemical reviews*, 120(17), 9554–9582.
 121. Canfarotta, F., Poma, A., Guerreiro, A., & Piletsky, S. (2016). Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nature protocols*, 11(3), 443–455.
 122. Zhang, Y., Li, S., Ma, X. T., He, X. W., Li, W. Y., & Zhang, Y. K. (2020). Carbon dots-embedded epitope imprinted polymer for targeted fluorescence imaging of cervical cancer via recognition of epidermal growth factor receptor. *Microchimica Acta*, 187(4), 1–11.
 123. Zahedi, P., Ziaee, M., Abdouss, M., Farazin, A., & Mizaikoff, B. (2016). Biomacromolecule template-based molecularly imprinted polymers with an emphasis on their synthesis strategies: a review. *Polymers for advanced technologies*, 27(9), 1124–1142.
 124. Prabhakaran, P., & Lee, K. S. (2019). Photo-polymerization. *Journal: Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series Functional Polymers*, 1–52.
 125. Yan, H., & Row, K. H. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular Sciences*, 7(5), 155–178.
 126. Schneider, F., Piletsky, S., Piletska, E., Guerreiro, A., & Ulbricht, M. (2005). Comparison of thin-layer and bulk MIPs synthesized by photoinitiated in situ crosslinking polymerization from the same reaction mixtures. *Journal of applied polymer science*, 98(1), 362–372.
 127. Sergeyeva, T. A., Piletsky, S. A., Piletska, E. V., Brovko, O. O., Karabanova, L. V., Sergeeva, L. M., ... & Turner, A. P. (2003). In situ formation of porous molecularly imprinted polymer membranes. *Macromolecules*, 36(19), 7352–7357.

128. Arreguin-Campos, R., Jiménez-Monroy, K. L., Diliën, H., Cleij, T. J., van Grinsven, B., & Eersels, K. (2021). Imprinted polymers as synthetic receptors in sensors for food safety. *Biosensors*, 11(2), 46.
129. Yao, T., Gu, X., Li, T., Li, J., Li, J., Zhao, Z., ... & She, Y. (2016). Enhancement of surface plasmon resonance signals using a MIP/GNPs/rGO nano-hybrid film for the rapid detection of ractopamine. *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 96–100.
130. Ali, W. H., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C., Lépine, O., Bayouth, S., ... & Pichon, V. (2010). Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217(43), 6668–6673.
131. Urraca, J. L., Marazuela, M. D., Merino, E. R., Orellana, G., & Moreno-Bondi, M. C. (2006). Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 127–134.
132. Maier, N. M., Buttinger, G., Welhartizki, S., Gavioli, E., & Lindner, W. (2004). Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 103–111.
133. Chen, R. N., Kang, S. H., Li, J., Lu, L. N., Luo, X. P., & Wu, L. (2021). Comparison and recent progress of molecular imprinting technology and dummy template molecular imprinting technology. *Analytical Methods*, 13(39), 4538–4556.
134. Serheieva, T. A., Pilets'ka, O. V., Honcharova, L. A., Brovko, O. O., Pilets'kyi, S. A., & Iel's'ka, H. V. (2008). Sensor system based on molecular-imprinted polymer membranes for the selective recognition of aflatoxin B1. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal (1999)*, 80(3), 84–93.
135. Urraca, J. L., Marazuela, M. D., & Moreno-Bondi, M. C. (2006). Molecularly imprinted polymers applied to the clean-up of zearalenone and α -zearalenol from cereal and swine feed sample extracts. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(7), 1155–1161.

136. Piletska, E., Karim, K., Coker, R., & Piletsky, S. (2010). Development of the custom polymeric materials specific for aflatoxin B1 and ochratoxin A for application with the ToxiQuant T1 sensor tool. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2543–2547.
137. Radi, A. E., Eissa, A., & Wahdan, T. (2020). Molecularly imprinted impedimetric sensor for determination of mycotoxin zearalenone. *Electroanalysis*, 32(8), 1788–1794.
138. Radi, A. E., Eissa, A., & Wahdan, T. (2021). Impedimetric sensor for deoxynivalenol based on electropolymerised molecularly imprinted polymer on the surface of screen-printed gold electrode. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 101(15), 2586–2597.
139. Sergeyeva, T. A., Piletsky, S. A., Brovko, A. A., Slinchenko, E. A., Sergeeva, L. M., & El'Skaya, A. V. (1999). Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection. *Analytica Chimica Acta*, 392(2–3), 105–111.
140. Turan, E., & Şahin, F. (2016). Molecularly imprinted biocompatible magnetic nanoparticles for specific recognition of Ochratoxin A. *Sensors and actuators B: chemical*, 227, 668–676.
141. Fang, G., Fan, C., Liu, H., Pan, M., Zhu, H., & Wang, S. (2014). A novel molecularly imprinted polymer on CdSe/ZnS quantum dots for highly selective optosensing of mycotoxin zearalenone in cereal samples. *Rsc Advances*, 4(6), 2764–2771.
142. Lucci, P., Derrien, D., Alix, F., Pérolhier, C., & Bayoudh, S. (2010). Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. *Analytica Chimica Acta*, 672(1–2), 15–19.
143. Munawar, H., Garcia-Cruz, A., Majewska, M., Karim, K., Kutner, W., & Piletsky, S. A. (2020). Electrochemical determination of fumonisin B1 using a

- chemosensor with a recognition unit comprising molecularly imprinted polymer nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 321, 128552.
144. Valderrama, W. B., Dudley, E. G., Doores, S., & Cutter, C. N. (2016). Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1519–1531.
 145. Drain, P. K., Hyle, E. P., Noubary, F., Freedberg, K. A., Wilson, D., Bishai, W. R., ... & Bassett, I. V. (2014). Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *The Lancet infectious diseases*, 14(3), 239–249.
 146. Waller, A. W., Toc, M., Rigsby, D. J., Gaytán-Martínez, M., & Andrade, J. E. (2019). Development of a paper-based sensor compatible with a mobile phone for the detection of common iron formulas used in fortified foods within resource-limited settings. *Nutrients*, 11(7), 1673.
 147. Zhang, D., & Liu, Q. (2016). Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 273–284.
 148. Rezazadeh, M., Seidi, S., Lid, M., Pedersen-Bjergaard, S., & Yamini, Y. (2019). The modern role of smartphones in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 548–555.
 149. Pumpa, K., Lacorn, M., Mättner, M., Steinmann, D., & Wolf, J. (2021). Next generation of LFD testing—Smartphone-based Mycotoxin analysis with RIDA® SMART APP. *Journal of AOAC International*, 104(1), 49–52.
 150. Madrid, R. E., Ashur Ramallo, F., Barraza, D. E., & Chaile, R. E. (2022). Smartphone-Based Biosensor Devices for Healthcare: Technologies, Trends, and Adoption by End-Users. *Bioengineering*, 9(3), 101.
 151. Zhang, M., Cui, X., & Li, N. (2022). Smartphone-based mobile biosensors for the point-of-care testing of human metabolites. *Materials Today Bio*, 100254.

152. Li, X., Yang, F., Wong, J. X., & Yu, H. Z. (2017). Integrated smartphone-app-chip system for on-site parts-per-billion-level colorimetric quantitation of aflatoxins. *Analytical chemistry*, 89(17), 8908–8916.
153. Chen, Y., Fu, Q., Li, D., Xie, J., Ke, D., Song, Q., ... & Wang, H. (2017). A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(28), 6567–6574.
154. Liu, Z., Hua, Q., Wang, J., Liang, Z., Li, J., Wu, J., ... & Li, X. (2020). A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals. *Biosensors and Bioelectronics*, 158, 112178.
155. Yang, T., Luo, Z., Bewal, T., Li, L., Xu, Y., Jafari, S. M., & Lin, X. (2022). When smartphone enters food safety: A review in on-site analysis for foodborne pathogens using smartphone-assisted biosensors. *Food Chemistry*, 133534.
156. Capoferri, D., Álvarez-Diduk, R., Del Carlo, M., Compagnone, D., & Merkoçi, A. (2018). Electrochromic molecular imprinting sensor for visual and smartphone-based detections. *Analytical chemistry*, 90(9), 5850–5856.
157. Zhao, W., Huang, L., Liu, K., Guo, J., & Guo, J. (2022). Optical Biosensors. In *Handbook of Biochips* (pp. 891–906). Springer, New York, NY.
158. Wang, W., Gong, Z., Yang, S., Xiong, T., Wang, D., & Fan, M. (2020). Fluorescent and visual detection of norfloxacin in aqueous solutions with a molecularly imprinted polymer coated paper sensor. *Talanta*, 208, 120435.
159. Kuşçuoğlu, C. K., Güner, H., Söylemez, M. A., Güven, O., & Barsbay, M. (2019). A smartphone-based colorimetric PET sensor platform with molecular recognition via thermally initiated RAFT-mediated graft copolymerization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296, 126653.

160. Kailasa, S. K., Park, T. J., Singhal, R. K., & Basu, H. (2020). Nanoparticle-integrated electrochemical devices for identification of mycotoxins. In *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry* (pp. 275–296). Elsevier.
161. Akgönüllü, S., Yavuz, H., & Denizli, A. (2020). SPR nanosensor based on molecularly imprinted polymer film with gold nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin B1. *Talanta*, 219, 121219.
162. Sharma, A., Khan, R., Catanante, G., Sherazi, T. A., Bhand, S., Hayat, A., & Marty, J. L. (2018). Designed strategies for fluorescence-based biosensors for the detection of mycotoxins. *Toxins*, 10(5), 197.
163. Geddes, C. D., & Lakowicz, J. R. (2002). Metal-enhanced fluorescence. *Journal of fluorescence*, 12(2), 121–129.
164. Wang, B., Chen, Y., Wu, Y., Weng, B., Liu, Y., Lu, Z., ... & Yu, C. (2016). Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB1. *Biosensors and Bioelectronics*, 78, 23–30.
165. Zhang, J., Fu, Y., & Lakowicz, J. R. (2007). Enhanced Förster resonance energy transfer (FRET) on a single metal particle. *The journal of physical chemistry C*, 111(1), 50–56.
166. Anfossi, L., Di Nardo, F., Cavallera, S., Giovannoli, C., Spano, G., Speranskaya, E. S., ... & Baggiani, C. (2018). A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles. *Microchimica Acta*, 185(2), 1–10.
167. Wu, S., Duan, N., Ma, X., Xia, Y., Wang, H., Wang, Z., & Zhang, Q. (2012). Multiplexed fluorescence resonance energy transfer aptasensor between upconversion nanoparticles and graphene oxide for the simultaneous determination of mycotoxins. *Analytical chemistry*, 84(14), 6263–6270.

168. Ma, S., Wang, M., You, T., & Wang, K. (2019). Using magnetic multiwalled carbon nanotubes as modified QuEChERS adsorbent for simultaneous determination of multiple mycotoxins in grains by UPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(28), 8035–8044.
169. Wang, Y., Dostálek, J., & Knoll, W. (2009). Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 2264–2267.
170. Li, S. J., Sheng, W., Wen, W., Gu, Y., Wang, J. P., & Wang, S. (2018). Three kinds of lateral flow immunochromatographic assays based on the use of nanoparticle labels for fluorometric determination of zearalenone. *Microchimica Acta*, 185(4), 1–8.
171. Wang, Y., Li, Z., Li, H., Vuki, M., Xu, D., & Chen, H. Y. (2012). A novel aptasensor based on silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), 76–81.
172. Liu, H., Cheng, S., Shi, X., Zhang, H., Zhao, Q., Dong, H., ... & Sun, X. (2019). Electrochemiluminescence aptasensor for profenofos detection based on silver nanoparticles enhanced luminol luminescence system. *Journal of The Electrochemical Society*, 166(15), B1562.
173. Pang, Y., Rong, Z., Xiao, R., & Wang, S. (2015). " Turn on" and label-free core– shell Ag@ SiO₂ nanoparticles-based metal-enhanced fluorescent (MEF) aptasensor for Hg²⁺. *Scientific reports*, 5(1), 1–8.
174. Díez, I., & Ras, R. H. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 3(5), 1963–1970.
175. Lakowicz, J. R., Koen, P. A., Szmactinski, H., Gryczynski, I., & Kuśba, J. (1994). Emerging biomedical and advanced applications of time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 4(1), 117–136.
176. Li, S., Wang, J., Sheng, W., Wen, W., Gu, Y., & Wang, S. (2018). Fluorometric lateral flow immunochromatographic zearalenone assay by exploiting a quencher

- system composed of carbon dots and silver nanoparticles. *Microchimica Acta*, 185(8), 1–9.
177. Jiang, H., Li, X., Xiong, Y., Pei, K., Nie, L., & Xiong, Y. (2017). Silver nanoparticle-based fluorescence-quenching lateral flow immunoassay for sensitive detection of ochratoxin A in grape juice and wine. *Toxins*, 9(3), 83.
 178. Asselin, J., Viger, M. L., & Boudreau, D. (2014). Metal-enhanced fluorescence and FRET in multilayer core-shell nanoparticles. *Adv. Chem*, 2014(812313.10), 1155.
 179. Zhang, J., Fu, Y., Chowdhury, M. H., & Lakowicz, J. R. (2007). Enhanced Förster resonance energy transfer on single metal particle. 2. Dependence on donor– acceptor separation distance, particle size, and distance from metal surface. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(32), 11784–11792.
 180. Wang, C., Tan, R., & Chen, D. (2018). Fluorescence method for quickly detecting ochratoxin A in flour and beer using nitrogen doped carbon dots and silver nanoparticles. *Talanta*, 182, 363–370.
 181. Wu, X., Gao, S., Wang, J. S., Wang, H., Huang, Y. W., & Zhao, Y. (2012). The surface-enhanced Raman spectra of aflatoxins: spectral analysis, density functional theory calculation, detection and differentiation. *Analyst*, 137(18), 4226–4234.
 182. Lee, K. M., Herrman, T. J., Bisrat, Y., & Murray, S. C. (2014). Feasibility of surface-enhanced Raman spectroscopy for rapid detection of aflatoxins in maize. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4466–4474.
 183. Hong, G., Tabakman, S. M., Welsher, K., Wang, H., Wang, X., & Dai, H. (2010). Metal-enhanced fluorescence of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45), 15920–15923.
 184. Cheng, D., & Xu, Q. H. (2007). Separation distance dependent fluorescence enhancement of fluorescein isothiocyanate by silver nanoparticles. *Chemical communications*, (3), 248–250.

185. Hutter, E., & Fendler, J. H. (2004). Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Advanced materials*, 16(19), 1685–1706.
186. Farcău, C., & Aștilean, S. (2009). Silver half-shell arrays with controlled plasmonic response for fluorescence enhancement optimization. *Applied Physics Letters*, 95(19), 193110.
187. Li, H., Qiang, W., Vuki, M., Xu, D., & Chen, H. Y. (2011). Fluorescence enhancement of silver nanoparticle hybrid probes and ultrasensitive detection of IgE. *Analytical chemistry*, 83(23), 8945–8952.
188. Zhang, J., Fu, Y., Chowdhury, M. H., & Lakowicz, J. R. (2007). Metal-enhanced single-molecule fluorescence on silver particle monomer and dimer: coupling effect between metal particles. *Nano letters*, 7(7), 2101–2107.
189. YuL, S., YuS, L., Magdinets, V. V., Sergeeva, L. M., YuYu, K., Savchenko, T. T., & Vilenskaya, L. N. (1968). Polymers based on polyoxypropyleneglycol, diisocyanate, and monomethacrylic ester of ethyleneglycol. *Vysokomolekulyarnyje Sojedineniya A*, 10(9), 2116–21.
190. Sergeyeva, T., Yarynka, D., Dubey, L., Dubey, I., Piletska, E., Linnik, R., ... & El'skaya, A. (2020). Sensor based on molecularly imprinted polymer membranes and smartphone for detection of Fusarium contamination in cereals. *Sensors*, 20(15), 4304.
191. Sergeyeva, T. A., Gorbach, L. A., Slinchenko, O. A., Goncharova, L. A., Piletska, O. V., Brovko, O. O., ... & Elska, G. V. (2010). Towards development of colorimetric test-systems for phenols detection based on computationally-designed molecularly imprinted polymer membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 30(3), 431–436.
192. Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., & Laganà, A. (2005). Development of a multiresidue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid*

Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 19(14), 2085–2093.

193. Marć, M., & Wieczorek, P. P. (2019). Introduction to MIP synthesis, characteristics and analytical application. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 86, pp. 1–15). Elsevier.
194. Sergeyeva, T., Piletska, O., & Piletsky, S. (2023). Rationally designed molecularly imprinted polymer membranes as antibody and enzyme mimics in analytical biotechnology. *BBA Advances*, 3, 100070.
195. Sales, T. A., & Ramalho, T. C. (2020). Computational design of synthetic receptors for drug detection: interaction between molecularly imprinted polymers and MDMA (3, 4-methylenedioxymethamphetamine). *Theoretical Chemistry Accounts*, 139(2), 31.
196. Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., & Tozzi, C. (2004). Binding properties of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid-imprinted polymers prepared with different molar ratios between template and functional monomer. *Talanta*, 62(5), 1029-1034.
197. Navarro-Villoslada, F., Urraca, J. L., Moreno-Bondi, M. C., & Orellana, G. (2007). Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121(1), 67–73.
198. Sergeyeva, T. A., Piletsky, S. A., Brovko, A. A., Slinchenko, E. A., Sergeeva, L. M., & El'Skaya, A. V. (1999). Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection. *Analytica Chimica Acta*, 392(2-3), 105–111.
199. Sergeyeva, T., Yarynka, D., Piletska, E., Linnik, R., Zaporozhets, O., Brovko, O., ... & El'skaya, A. (2019). Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes. *Talanta*, 201, 204–210.

200. Lemke, S. L., Grant, P. G., & Phillips, T. D. (1998). Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3789–3796.
201. Khalili, F., Henni, A., & East, A. L. (2009). p K a values of some piperazines at (298, 303, 313, and 323) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 54(10), 2914–2917.
202. Yarynka, D., Sergeyeva, T., Piletska, E., Linnik, R., Antonyuk, M., Brovko, O., ... & El'skaya, A. (2021). Validation of aflatoxin B1 MIP membrane-based smartphone sensor system for real sample applications. *Biopolymers and Cell*, 37(5), 346–356
203. Sergeyeva T., Yarynka D., Piletska E., Dubey I., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. (2018, October 24–26). Fluorescent and colorimetric sensor systems for food toxins and endocrine disruptors detection based on molecularly imprinted polymer membranes. Advanced materials and technologies: from idea to market, 10th international conference(Ningbo, China). Catalogue, P. 79.
204. Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. (2019). Smartphone-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Biopolymers and Cell, 35(5), (P. 335) doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A14>
205. Sergeyeva T.A., Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V. (2019, August 27–30). Smartphone sensor system for aflatoxin B1 and zearalenone detection based on nanostructured polymeric membranes. Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO–2019), (Lviv, Ukraine). Publishing Hous, LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2019, P. 312.

206. Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V., Sergeyeva T.A. (2019). Biomimetic-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 and zearalenone. *Медична та клінічна хімія*, 21(3), 294.
207. Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Stepanenko Ye.Yu., Linnik R.P., Antonyuk M.Z., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeyeva T.A. (2021). Rapid mycotoxins monitoring systems in cereals using smartphone based biomimetic sensor. All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. P. 187. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>
208. Яринка Д.В., Пілецька О.В., Линник Р.П., Бровко О.О., Пілецький С.А., Єльська Г.В., Сергеева Т.А. (2021, September 20–24). Апробація флуориметричної сенсорної системи на основі смартфона для визначення афлатоксину В1 у зразках борошна. Тези доповідей, 9-та Міжнародна науково-технічна конференція “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ–9) (Одеса, Україна). Одеса: Астропринт. 2021 (С. 112).
209. Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. (2019, July 6–11). Nanobased fluorescent sensor system for zearalenone detection. 44th FEBS Congress (Krakow, Poland), Abstract notation: P–35-016.
210. Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skay A.V., Sergeyeva T.A. (2019, April 9–10). Optical biosensor system for zearalenone detection based on nanostructured biomimetics. Збірник тез, XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь І Поступ Біології” (Львів, Україна), С. 14–15.
211. Yarynka D., Dubey I., Dubey L., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Brovko O., Piletsky S., El'skaya A., Sergeyeva T. (2020, June 27–28). Detection of zearalenone in cereals using smartphone-based molecularly imprinted polymer

- membrane sensor system. XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна). Електронна збірка тез (С. 5). <http://imbg.org.ua/uk/youngsci/>
212. Belhassen, H., Jiménez-Díaz, I., Arrebola, J. P., Ghali, R., Ghorbel, H., Olea, N., & Hedili, A. (2015). Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. *Chemosphere*, 128, 1–6.
 213. Yarynka, D. V., Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V., Stepanenko, Y., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., & El'skaya, A. V. (2021). Zearalenone-selective biomimetic-based sensor system and its validation for real samples' analysis. *Biopolymers and Cell*, 37(6), 438–446.
 214. Ngundi, M. M., Shriver-Lake, L. C., Moore, M. H., Ligler, F. S., & Taitt, C. R. (2006). Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array. *Journal of food protection*, 69(12), 3047–3051.
 215. Lu, Z., Chen, X., Wang, Y., Zheng, X., & Li, C. M. (2015). Aptamer based fluorescence recovery assay for aflatoxin B1 using a quencher system composed of quantum dots and graphene oxide. *Microchimica Acta*, 182(3), 571–578.
 216. Yugender Goud, K., Hayat, A., Satyanarayana, M., Sunil Kumar, V., Catanante, G., Vengatajalabathy Gobi, K., & Marty, J. L. (2017). Aptamer-based zearalenone assay based on the use of a fluorescein label and a functional graphene oxide as a quencher. *Microchimica Acta*, 184(11), 4401–4408.
 217. Zhang, S., Zhou, S., Gong, Y. Y., Zhao, Y., & Wu, Y. (2020). Human dietary and internal exposure to zearalenone based on a 24-hour duplicate diet and following morning urine study. *Environment International*, 142, 105852.
 218. Mazumder, P. M., & Sasmal, D. (2001). Mycotoxins—limits and regulations. *Ancient science of life*, 20(3), 1.

219. Sergeyeva, T., Yarynka, D., Lytvyn, V., Demydov, P., Lopatynskyi, A., Stepanenko, Y., ... & Chegel, V. (2022). Highly-selective and sensitive plasmon-enhanced fluorescence sensor of aflatoxins. *Analyst*, 147(6), 1135–1143.
220. Yarynka D.V., Chegel V.I., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. (2022, August 25–27). Chip based plasmon-enhanced fluorescence sensor for highly-sensitive zearalenone analysis. Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO–2022), (Lviv, Ukraine). Publishing Hous, LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2022 (P. 312).
221. Yarynka D.V., Chegel V.I. Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Lopatynskyi A.M., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. (2022, June 15–17). Highly selective chip-based fluorescent sensor systems for in-field analysis of mycotoxins. Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation [Internet]; 2022 June 15–17; Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2022. 158 p. Available from: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Confer>.
222. Yarynka, D., Chegel, V., Piletska, E., Piletsky, S., Dubey, L., Dubey, I., Nikolaiev, R., Brovko, O., Sergeyeva, T. (2023). An enhanced fluorescent sensor system based on molecularly imprinted polymer chips with silver nanoparticles for highly-sensitive zearalenone analysis. *Analyst*, 148(11), 2633-2643.
223. Gupta, P. (2015). Method validation of analytical procedures. *PharmaTutor*, 3(1), 32–39.
224. Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, 1(20), 05.
225. Методика вимірювання концентрації афлатоксину В1 у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36/866-19 / Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-

ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

226. Методика вимірювання концентрації зеараленону у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36-4/20489/ Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

1. Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Elsevier, Talanta, 201, 2019, P. 204–210. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.016. **IF 6.057 Q1.** *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран та визначення їхніх сенсорних характеристик, обробка результатів, підготовка статті до друку.*
2. Sensor based on molecularly imprinted polymer membranes and smartphone for detection of Fusarium contamination in cereals / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Dubey L., Dubey I., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Ternovska T., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Sensors 2020, 20, 4304. DOI: 10.3390/s20154304. **IF 3.735 Q1.** *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран та визначення їхніх сенсорних характеристик, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*
3. Validation of aflatoxin B1 MIP membrane-based smartphone sensor system for real sample applications / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V., Linnik, R. P., Antonyuk, M. Z., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skay A. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(5), P. 346–356. DOI: 10.7124/bc.000a60. *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран, валідації методики визначення АФВІ, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку.*
4. Zearalenone-selective biomimetic-based sensor system and its validation for real samples' analysis / **Yarynka, D. V.**, Sergeyeva, T. A., Piletska, E. V.,

Stepanenko, Y., Brovko, O. O., Piletsky, S. A., El'skaya, A. V. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(6), P. 438–446. DOI: 10.7124/bc.000a69. *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран, валідації методики визначення ЗОН, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку.*

5. Highly-selective and sensitive plasmon-enhanced fluorescence sensor of aflatoxins / Sergeyeva T., **Yarynka D.**, Lytvyn V., Demydov P., Lopatynskiy A., Stepanenko Ye., Brovko O., Pinchuk A., Chegel V. // Analyst, 2022, 147(6), P. 1135–1143. DOI: 10.1039/d1an02173g. **IF 5,227 Q1** *Особистий внесок здобувача – синтез АФВІ-селективних МІП мембран з вбудованими срібними наночастинками та визначення їхніх сенсорних характеристик, трансмісійна електронна мікроскопія, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

6. An enhanced fluorescent sensor system based on molecularly imprinted polymer chips with silver nanoparticles for highly-sensitive zearalenone analysis / **Yarynka D.**, Chegel V., Piletska E., Piletsky S., Dubey L., Dubey I. Ya., Brovko O., Nikolaiev R., and Sergeyeva T. // Analyst, 2023, 148(11), P. 2633–2643. DOI: 10.1039/d2an01991d. **IF 5,227 Q1**. *Особистий внесок здобувача – синтез ЗОН-селективних МІП мембран з вбудованими срібними наночастинками та визначення їхніх сенсорних характеристик, трансмісійна електронна мікроскопія, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

Метрологія:

1. Методика вимірювання концентрації афлатоксину В1 у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36/866-19 / Розробники: Кулик С., Сергєєва Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА

ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

2. Методика вимірювання концентрації зеараленону у водних розчинах та способу оцінювання розширеної невизначеності результату вимірювання 36-4/20489/ Розробники: Кулик С., Сергеева Т., Бровко О., Яринка Д. // Розроблено: ДП «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ» (ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»), Київ, 2019.

Тези доповідей:

1. Fluorescent and colorimetric sensor systems for food toxins and endocrine disruptors detection based on molecularly imprinted polymer membranes / Sergeyeva T., Yarynka D., Piletska E., Dubey I., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A. // Advanced materials and technologies: from idea to market, 10th international conference, Catalogue, P. 79 (Ningbo, China, 24–26.10.2018).

2. Optical biosensor system for zearalenone detection based on nanostructured biomimetics / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skay A.V., Sergeyeva T.A. // Збірник тез, XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь І Поступ Біології”, Львів, Україна, 9 – 11.04.2019, – С. 14–15.

3. Smartphone-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Biopolymers and Cell. – 2019. – Vol. 35. – N 5. – P. 335 (P 381–414). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A14>

4. Nanobased fluorescent sensor system for zearalenone detection / Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S., El'skay A., Sergeyeva T. // The 19th FEBS Young Scientists' Forum Krakow, Poland, (3–6 July

2019), Abstract book. – P. 111; 44th FEBS Congress (6–11 July, 2019, Krakow, Poland), Abstract notation: P-35-016.

5. Smartphone sensor system for aflatoxin B1 and zearalenone detection based on nanostructured polymeric membranes / Sergeyeva T.A., Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V. // Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2019), (Ukraine, Lviv, 27–30 august 2019) / Publishing Hous – LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2019. – P. 312.

6. Biomimetic-based sensor system for highly-selective detection of aflatoxin B1 and zearalenone / Yarynka D.V., Piletska E.V., Dubey I.Ya., Linnik R.P., Zaporozhets O.A., Brovko O.O., Piletsky S.A., El'skaya A.V., Sergeyeva T.A. // Медична та клінічна хімія. 2019. – Т.21. – №3. – С.294.

7. Detection of zearalenone in cereals using smartphone-based molecularly imprinted polymer membrane sensor system / Yarynka D., Dubey I., Dubey L., Piletska E., Linnik R., Antonyuk M., Brovko O., Piletsky S., El'skaya A., Sergeyeva T. // XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України, Київ, Україна, 27-28.05.2020, Електронна збірка тез. – С. 5. <http://imbg.org.ua/uk/youngsci/>

8. Rapid mycotoxins monitoring systems in cereals using smartphone based biomimetic sensor / Yarynka D.V., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Piletska E.V., Stepanenko Ye.Yu., Linnik R.P., Antonyuk M.Z., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeyeva T.A. // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. P. – 187 (P 185–244). doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>

9. Апробація флуориметричної сенсорної системи на основі смартфона для визначення афлатоксину В1 у зразках борошна / Яринка Д.В., Пілецька О.В., Линник Р.П., Бровко О.О., Пілецький С.А., Єльська Г.В., Сергєєва Т.А. // Тези

доповідей, 9-та Міжнародна науково-технічна конференція “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ-9), Одеса, Україна, 20–24.09.2021, Одеса: Астропринт. 2021. – 212 с. – С. 112.

10. Highly selective chip-based fluorescent sensor systems for in-field analysis of mycotoxins / Yarynka D.V., Chegel V.I. Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Lopatynskyi A.M., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation [Internet]; 2022 June 15–17; Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine; 2022. 158 p. Available from: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Confer.>

11. Chip based plasmon-enhanced fluorescence sensor for highly-sensitive zearalenone analysis / Yarynka D.V., Chegel V.I., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Stepanenko Ye.Yu., Brovko O.O., Sergeyeva T.A. // 10-та Міжнародна конференція "Нанотехнології та наноматеріали" НАНО-2022 (Львів, Україна, 25–27.08.2022). Abstracts book of the international research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2022), (Ukraine, Lviv, 25–27 august 2022) / Publishing Hous – LLC “Computer-publishing, information center” Kyiv, 2022. – P. 312.