

Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа

В. Н. Архипова, С. В. Дзяевич, О. Н. Щувайло, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская, Н. Жафрезик-Рено¹, Г. Жафрезик¹, К. Мартле¹

Институт молекулярной биологии и генетики НАНаук Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Эколь Централь
Лион, Франция

Предложена и описана концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ингибиторного ферментного анализа и показана принципиальная возможность его создания. Для разработки такой системы использовали два типа преобразователей, а именно — потенциометрические рН-чувствительные полевые транзисторы и кондуктометрические тонкопленочные гребенчатые электроды, а также три фермента: уреазы, ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. Данные, полученные в ходе измерений, обработаны с использованием математического аппарата: дискриминантного функционального анализа и метода искусственных нейронных сетей. Предложена полная процедура определения токсичных веществ и описаны ее преимущества.

Введение. С каждым днем проблема охраны и соответственно контроля состояния окружающей среды становится все более острой. Устойчивые к распаду токсичные соединения и остатки широко используемых в сельском хозяйстве фосфорорганических пестицидов, имеющие очень высокую степень проникновения [1], попадают в различные продукты питания людей и сельскохозяйственных животных. Это, как и наличие ионов тяжелых металлов, может привести к ухудшению общего состояния здоровья и возникновению различных заболеваний. Поэтому необходим быстрый, надежный и дешевый анализ сточных вод вблизи возможных источников загрязнения, а также продуктов питания и питьевой воды [2].

Классические методы, существующие для определения этих типов токсичных веществ, — ультрафиолетовая спектрофотометрия, газовая хрома-

тография, массспектрометрия и другие [3], — включают в себя высокоточное и достаточно дорогое оборудование, требуют длительного времени анализа, а также наличия высококвалифицированного персонала для работы и обслуживания.

В последние 10—15 лет разработан ряд биосенсоров для определения различных токсичных веществ в водных растворах. Применяли ионо-селективные и рН-чувствительные стеклянные и металлические электроды [4, 5], сенсоры на основе рН-чувствительных полевых транзисторов [6] и кондуктометрических электродов [7].

Однако упомянутые биосенсоры способны определять лишь один тип токсичных веществ, в то время как в любом исследуемом образце может находиться их смесь. Эту проблему можно решить путем создания мультисенсора — датчика, на котором расположено сразу несколько преобразователей с различными биоселективными мембранами, с помощью которого можно определять сразу несколько веществ.

В литературе уже были описаны мультибиосенсоры на основе полупроводниковых структур

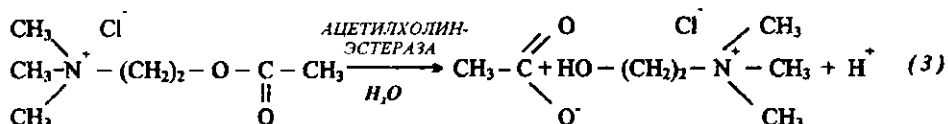
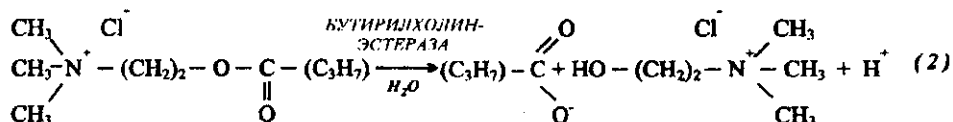
© В. Н. АРХИПОВА, С. В. ДЗЯЕВИЧ, О. Н. ЩУВАЙЛО,
А. П. СОЛДАТКИН, А. В. ЕЛЬСКАЯ, Н. ЖАФРЕЗИК-РЕНО,
Г. ЖАФРЕЗИК, К. МАРТЛЕ, 2001

для одновременного определения концентраций глюкозы и мочевины в физиологических жидкостях [8, 9]. Аналогичный мультисенсор для определения глюкозы, мочевины и ионов калия на основе тонкопленочных электродов описан в работе [10]. Известны также химические мультисенсоры, так называемые «электронные языки» и «электронные носы», используемые для определения качества вина и других пищевых продуктов [11]. Однако все эти мультисенсоры являются либо ферментными сенсорами для прямого определения сразу нескольких субстратов, либо чисто химическими газовыми или жидкостными сенсорами с малоселективными мембранами.

В данной работе предложена концепция мультисенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа и показана принципиальная возможность его создания.

В основу создания концепции мультисенсора положены предварительные результаты по разработке ферментных сенсоров для анализа пестицидов и тяжелых металлов в водных средах. Мы остановили свой выбор на следующих ферментах: уреазе, ацетил- и бутирилхолинэстеразе. Эти ферменты имеют примерно одинаковые кинетические характеристики и ингибируются различными классами токсичных веществ.

Соответствующие выбранным ферментам базовые реакции выглядят следующим образом:



В ходе этих реакций происходит поглощение (1) или генерация (2, 3) протонов, что приводит к изменению как pH, так и проводимости раствора внутри мембраны. Это позволяет использовать как

кондуктометрический, так и потенциометрический метод измерений [12, 13].

Материалы и методы. В работе использовали следующие ферменты: уреазу из бобов сои производства фирмы «Fluka» (Германия) с активностью 31 ед. акт./мг; ацетилхолинэстеразу (АХЭ) из органа электрического угря производства фирмы «Sigma» — «Aldrich Chemie GmbH» (Германия) с активностью 292 ед. акт./мг; бутирилхолинэстеразу (БуХЭ) из сыворотки крови лошади производства фирмы «Sigma» — «Aldrich Chemie GmbH» с активностью 13 ед. акт./мг.

Субстратами служили: мочевина, хлорид ацетилхолина (АцХ) и хлорид бутирилхолина (БуХ) фирмы «Sigma» — «Aldrich Chemie GmbH».

Бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Boehringer Mannheim» (Австрия), 25 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) фирмы «Serva» (Германия).

Для инактивации ферментов использовали токсичные вещества: трихлорфон [(диметил-2,2,2-трихлор-1-гидроксиэтил)-фосфонат] — фосфорорганический пестицид фирмы «Riedel-de-Haen» (Швейцария); карбофуран (2,3-дигидро-2,2-диметилбензофуран-7-ил-N-метилкарбамат) — карбаматный пестицид фирмы «Riedel-de-Haen»; водные растворы солей тяжелых металлов $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и AgNO_3 фирмы «Merck» (Германия).

Как буфер использовали 5 мМ калий-фосфатный раствор (KH_2PO_4 - NaOH) фирмы «Merck». Дру-

гие реактивы были отечественного и импортного производства квалификации «ос. ч.» и «х. ч.».

В работе использованы кондуктометрические преобразователи производства Киевского радиоза-

вода [14] и pH-чувствительные полевые транзисторы производства Киевского завода «Микроприбор» [15].

Для образования биоселективных мембран готовили смесь фермента и БСА в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, с конечной концентрацией каждого 50 мг/мл. В нее добавляли глицерин до конечной концентрации 10 % для стабилизации фермента при иммобилизации, а также для предотвращения преждевременного высыхания раствора и улучшения адгезии мембраны к поверхности преобразователя. Каплю смеси фермент—БСА наносили на поверхность одной пары электродов. На поверхность другой пары наносили аналогичную смесь, содержащую 10 %-й раствор БСА без фермента (эта пара была датчиком сравнения). Для полимеризации мембран датчики помещали в атмосферу насыщенных паров ГА на 30 мин, потом подсушивали на воздухе в течение 20—30 мин.

Перед измерениями сенсоры вымачивали некоторое время в 5 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до получения стабильного базового сигнала. Измерения проводили с использованием модельных растворов субстратов и ингибиторов при комнатной температуре в открытом объеме с интенсивным перемешиванием. Концентрацию субстратов и ингибиторов изменяли, добавляя определенные аликваты их концентрированных растворов.

Степень инактивации ферментов и соответственно концентрации токсичных веществ определяли таким образом:

— сенсор помещали в буферный раствор и регистрировали выходной сигнал (базовая линия);

— получали отклик на эквимоллярную смесь субстратов (2 мМ) и принимали его за 100 %, затем сенсор 2—3 раза отмывали буферным раствором;

— сенсор помещали в анализируемый раствор токсичного(ых) веществ(а) на 20 мин (процесс ингибирования) и после этого датчик отмывали рабочим буферным раствором от несвязанных с ферментом ингибиторов;

— величину отклика сенсора на добавление той же концентрации эквимоллярной смеси субстратов определяли повторно.

Степень ингибирования определяли по уменьшению отклика сенсора после ингибирования.

Измерения осуществляли с помощью портативного кондуктометра [16] и потенциометра [17], сконструированных и изготовленных совместно с лабораторией биоэлектроники Киевского Университета им. Тараса Шевченко. В обоих случаях использовали дифференциальную схему измерений [16, 17].

Результаты и обсуждение. При создании мультисенсора можно применять стандартный протокол измерений, используемый обычно при ингибиторном анализе [7]. Однако в этом случае процедура измерений должна быть комплексной, т. е. необходимо проводить определение отклика сенсора для каждой пары субстрат—фермент (этот сигнал будет принят за 100 % в каждом случае), затем ингибирование и снова определение отклика сенсора для каждой пары субстрат—фермент и их сравнение. Чтобы сократить время такого анализа, было предложено использовать эквимоллярную смесь субстратов. Но сначала нужно было установить, как реагирует каждый фермент на такую смесь специфичных и неспецифичных ему субстратов, нет ли неспецифического влияния на параллельно используемые ферменты и можно ли ее применять для работы с мультисенсором.

Типичный вид кинетических кривых для кондуктометрического уреазного сенсора представлен на рис. 1.

Видно, что отклика уреазного сенсора на неспецифические субстраты АцХ и БуХ не наблюдается, происходит лишь небольшой скачок проводимости в момент внесения субстрата, который через 2—3 с отрабатывается благодаря дифференциальной схеме измерений. Отклики же уреазного биосенсора на добавление мочевины и эквимоллярной

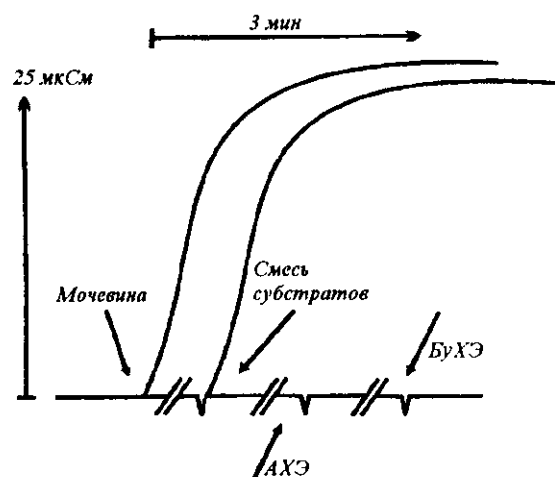


Рис. 1. Типичный вид откликов кондуктометрического уреазного биосенсора на добавление различных субстратов и их эквимоллярной смеси. Измерения проводили в 5 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, концентрация субстратов 2 мМ

смеси субстратов практически одинаковы. При потенциометрическом методе измерений результаты подобны, а неспецифических откликов не наблюдается вовсе.

В ингибиторном анализе, как правило, используются оптимальные концентрации субстратов, поэтому были изучены зависимости величин откликов биосенсоров от концентрации субстратов. Калибровочные кривые потенциометрического и кондуктометрического уреазных сенсоров представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, в случае потенциометрических измерений калибровки по основному субстрату и тестовой смеси практически совпадают. При кондуктометрических же измерениях наблюдается некоторое уменьшение отклика на добавление эквимольной смеси субстратов по сравнению с откликом на основной субстрат. Это объясняется тем, что при внесении в ячейку хлоридов ацетил- и бутирилхолина увеличивается ионная сила раствора, что и приводит к уменьшению отклика сенсора [18]. Динамический диапазон работы потенциометрического и кондуктометрического уреазных сенсоров почти совпадает и его верхний предел не превышает 3 мМ.

В случае же биосенсоров на основе холинэстераз картина значительно отличается. Калибровки по различным субстратам и их смеси для потенциометрических биосенсоров на основе АХЭ и БуХЭ приведены на рис. 3.

Из рисунков хорошо видно, что ни АХЭ-, ни БуХЭ-сенсоры не являются абсолютно специфичными по отношению к своим основным субстратам. АХЭ — истинная холинэстераза — катализирует не только гидролиз АцХ (100 %), но также в небольшой степени и гидролиз БуХ (около 15 %). Но скорость последней реакции при этом гораздо медленней. Поэтому при внесении эквимольной смеси субстратов начинается конкуренция ацетилхолина и бутирилхолина за связывание с активным центром фермента. В результате того, что некоторая часть активных центров занята бутирилхолином, гидролизующегося значительно медленнее, отклик сенсора на смесь субстратов уменьшается.

БуХЭ же относится к псевдохолинэстеразам и катализирует гидролиз как БуХ (100 %), так и АцХ (около 35 %). При использовании их смеси происходит гидролиз обоих субстратов, и отклик на добавление смеси также уменьшается по сравнению с основным субстратом, но не так сильно, как в случае АХЭ, поскольку скорость гидролиза АцХ не намного меньше, чем БуХ.

Оба сенсора калибруются по смеси субстратов, имеют такой же динамический диапазон работы и

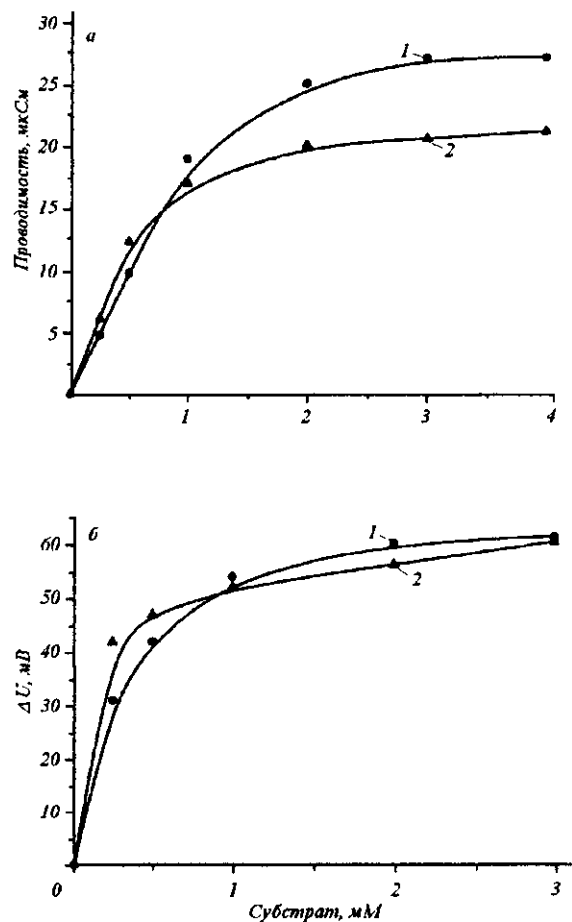


Рис. 2. Зависимость отклика кондуктометрического (а) и потенциометрического (б) уреазных сенсоров от концентрации мочевины и эквимольной смеси субстратов. Измерения проводились в 5 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4

зависимость от основных факторов среды (рН, буферная емкость, ионная сила), как и их основные субстраты.

Таким образом, в дальнейшей работе по определению токсичных веществ с помощью биосенсора на основе ферментного ингибиторного анализа использовали эквимольную смесь субстратов.

Ферменты АХЭ, БуХЭ и уреазы по-разному ингибируются различными видами токсичных веществ. На рис. 4 приведены типичные калибровочные кривые ингибирования используемых ферментов фосфорорганическим пестицидом трихлорфеном, а в таблице — первичные данные по их ингибированию различными концентрациями других токсичных веществ.

Из данных, приведенных на рис. 4 и в таблице,

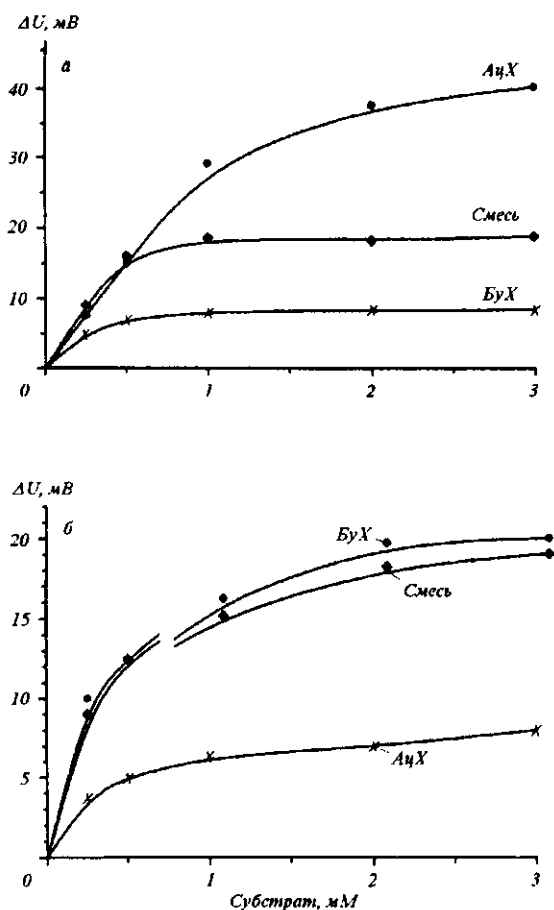


Рис. 3. Зависимость отклика потенциметрических биосенсоров на основе ацетилхолинэстеразы (а) и бутирилхолинэстеразы (б) от концентрации субстратов и их эквимольной смеси. Измерения проводили в 5 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4

следует, что холинэстеразы ингибируются одинаковыми концентрациями пестицидов (трихлорфона и карбофурана) в разной степени, а уреазы не ингибируется вообще. В то же время происходит значительное ингибирование уреазы ионами ртути (таблица). Обратная картина наблюдается для БуХЭ. Фермент сохраняет полную активность при воздействии на него ионами ртути и серебра в концентрации 50 мкМ, но ингибируется трихлорфоном. Подобное явление отмечается и для других пестицидов и тяжелых металлов при взаимодействии с этими ферментами [6, 7, 14]. Таким образом, имея всего лишь два датчика, уже можно ориентировочно дифференцировать состав исследуемого образца: при содержании пестицидов теряет активность Бу-

Степень ингибирования ферментов разными токсинами (%)

Токсин	Уреаза	БуХЭ	АХЭ
10 мкМ трихлорфон	0	50	5
50 мкМ трихлорфон	0	70	25
1 мМ трихлорфон	0	100	85
100 мкМ карбофуран	0	100	50
100 мкМ Ag ⁺	0	3	25
50 мкМ Ag ⁺	10	7	70
50 мкМ Hg ²⁺	15	3	10
10 мкМ Hg ²⁺	40	7	70
Смесь №*			
1	20	100	30
3	95	100	90
4	100	100	100
2	30	100	35

*Содержание токсинов в смесях: № 1 — 10 мкМ Ag⁺ + 10 мкМ Hg²⁺ + 10 мкМ трихлорфон + 10 мкМ карбофуран; № 3 — 50 мкМ Ag⁺ + 20 мкМ Hg²⁺ + 50 мкМ трихлорфон + 20 мкМ карбофуран; № 4 — 50 мкМ Ag⁺ + 50 мкМ Hg²⁺ + 50 мкМ трихлорфон + 50 мкМ карбофуран; № 2 — условно неизвестная смесь токсичных веществ.

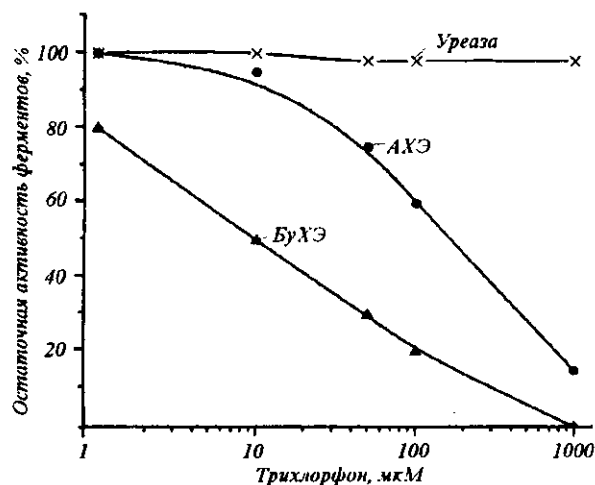


Рис. 4. Калибровочные кривые ингибирования разных ферментов фосфорорганическим пестицидом трихлорфоном. Время ингибирования 20 мин, измерения проводили в 5 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, эквимольная концентрация смеси субстратов 2 мМ

ХЭ, при наличии в растворе ионов тяжелых металлов — уреазы.

Какие именно тяжелые металлы присутствуют

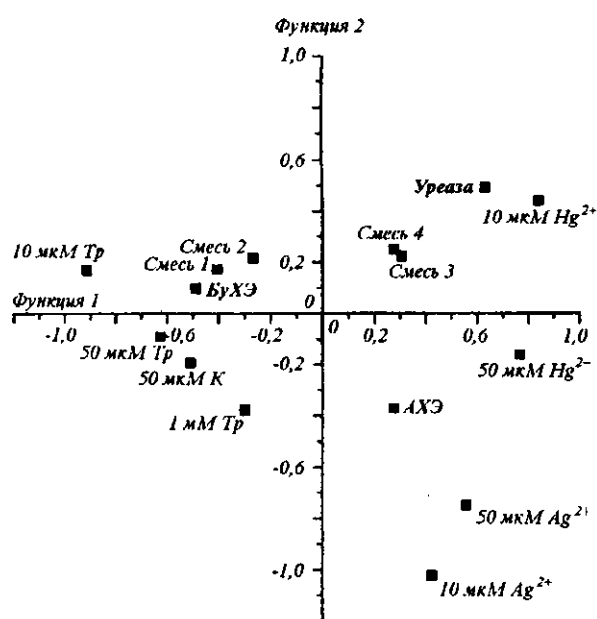


Рис. 5. Нормализация данных таблицы с помощью дискриминантных функций (Tr — трихлорфон; K — карбофуран)

в пробе, можно определить при сравнении степени ингибирования уреазы и АХЭ. Например, Ag^+ ингибирует уреазу в меньшей степени, чем Hg^{2+} , а АХЭ — наоборот. Пестициды можно классифицировать, сравнивая степень ингибирования БуХЭ- и АХЭ-сенсоров. Например, АХЭ более устойчива к воздействию карбофурана (концентрация пестицида 100 мкМ, ингибирование 50%), нежели БуХЭ (100 %-е ингибирование). Итак, имея всего три датчика с различными ферментами, мы уже можем не только качественно распознать тип токсичного вещества, находящегося в анализируемом образце, но и приблизиться к некоторому полуколичественному анализу.

Для количественного определения смеси токсических веществ в исследуемой пробе использовали дискриминантный функциональный анализ [19] и метод искусственных нейронных сетей [20]. В этом случае предварительно проводили эксперименты по ингибированию ферментов не только отдельными токсическими веществами, но и различными их смесями. Полученные в ходе экспериментов результаты вносили в таблицу-матрицу (таблица), содержащую данные по степени ингибирования ферментов различными токсичными веществами и их смесями. Переменными для математической

обработки в этом случае являются ферменты. Сначала требуется нормализовать данные. Для этого используется дискриминантная функция — линейная комбинация векторов признаков, характеризующих объект, и наилучшим образом разделяющая совокупность выбранных точек. Применяли специальный математический пакет компьютерных программ для дискриминантного анализа Sirius 6.0 for Windows (Pattern Recognition Systems A/S, Norway) и получили дискриминантные функции как линейные суперпозиции независимых переменных. На рис. 5 приведены нормализованные данные, пересчитанные и построенные из нашей таблицы. В этих координатах хорошо видно влияние разных токсических веществ и их смесей на активность ферментов.

Из рисунка следует, что смесь 2 по своему составу близка к смеси 1. На самом же деле она действительно состояла из: 30 мкМ Ag^+ , 10 мкМ Hg^{2+} , 20 мкМ трихлорфона и 10 мкМ карбофурана, т. е. по составу действительно была близка к смеси 1. Как видно, несмотря на столь небольшое количество реперных точек для каждого токсичного вещества и их смесей, данный метод позволяет провести полуколичественный анализ неизвестной по своему составу пробы с достаточно большой достоверностью. Безусловно, при большем количестве разных сенсоров (ферментов) и большем количестве реперных точек для каждого из них точность и качество представления данных возрастает.

Наиболее точное количественное определение состава смеси получается при использовании самообучающегося метода искусственных нейронных сетей. В этом случае совокупность исходных параметров (входные нормализованные данные) поступает на специальные устройства обработки (искусственные нейроны), осуществляющие сравнение и нормализацию входных данных с использованием специальных функций, постоянно адаптируемых в процессе работы (обучения) и суммирования взвешенных значений. После этого с помощью активационной функции формируется выходной сигнал нейрона. Выходные сигналы всех нейронов, формирующих слой, служат входными сигналами каждого нейрона следующего слоя. После обработки образуется выходной слой с количеством нейронов, соответствующим количеству определяемых токсических веществ. Используя такой метод, можно проводить точный расчет состава смеси.

Закключение. Таким образом, в данной работе предложена концепция мультимбиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа и показана принципиальная возможность его создания. Имея

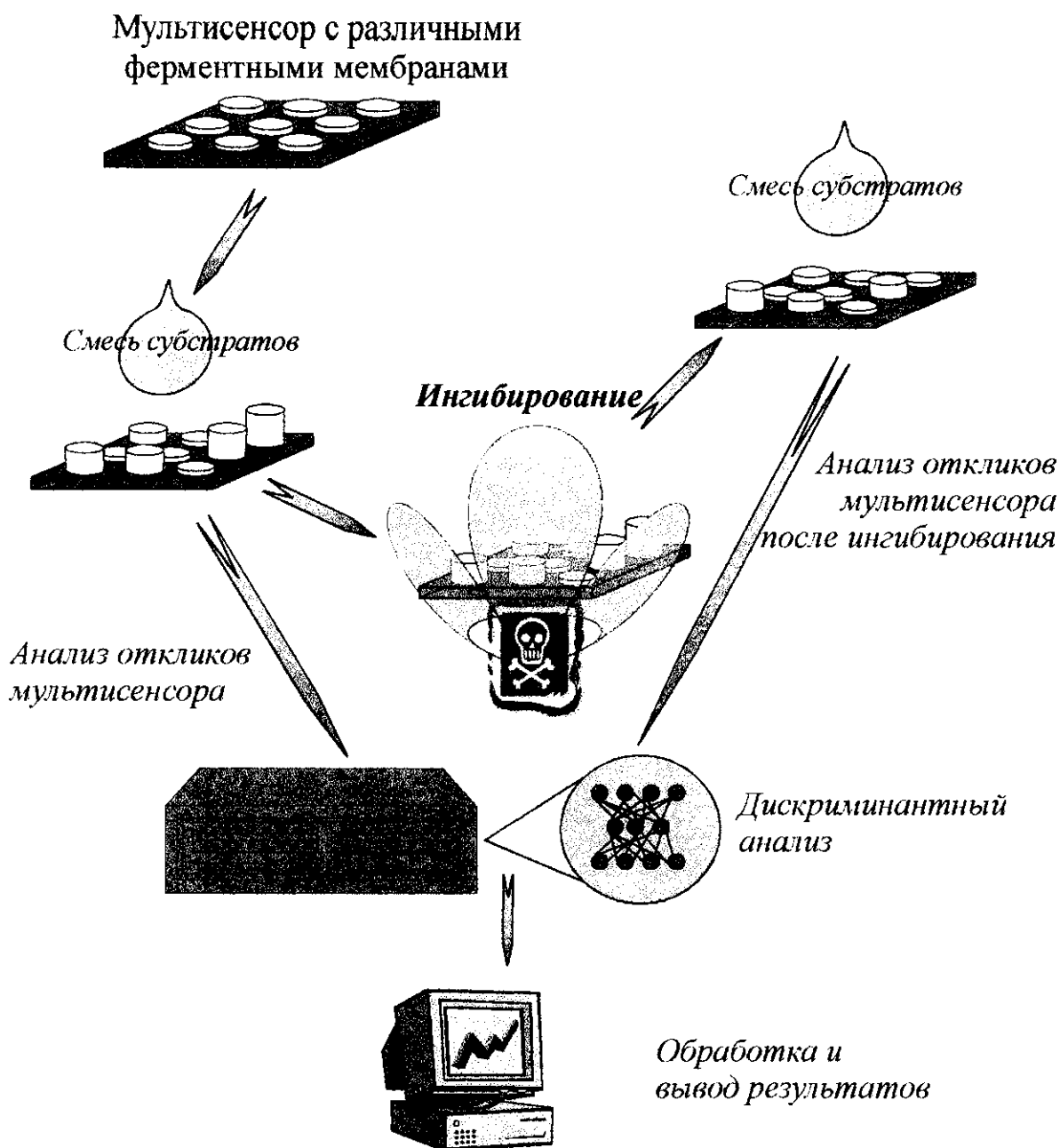


Рис. 6. Обобщенная схема определения токсичных веществ с помощью мультибиосенсора на основе ферментного ингибиторного анализа

структуры с несколькими преобразователями (больше четырех) и используя разработанный протокол измерений и предложенную математическую обработку данных, можно проводить качественный

и полуколичественный анализ токсичных веществ в растворе. Процедуру такого определения токсичных веществ можно проиллюстрировать схемой, приведенной на рис. 6.

Преимущества представленной системы состоят в ее приспособляемости (обучение, самоорганизация, генерация внутренних сигналов и тренинг), толерантности к шумам и ошибкам, наличию ассоциативной памяти, а самое главное, — в применимости к реальным задачам мониторинга окружающей среды.

V. N. Arkhipova, S. V. Dzyadevich, O. N. Schuvailo, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya, N. Jaffrezic-Renault, H. Jaffrezic, C. Martelet

Conception of multibiosensor for determination of different toxic substances based on the enzyme inhibitor analysis

Summary

A conception of an enzyme multisensor for the determination of toxic substances based on the enzyme inhibitor analysis has been proposed and a principal possibility of its creation has been shown. For the development of such system two types of transducers, such as potentiometric pH-sensitive field-effect transistors and conductometric thin-films interdigitated electrodes, and three enzymes, namely urease, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase have been used. The experimental data have been treated by the multivariate data processing based on the discriminant function analysis and artificial neural net. The full procedure of the toxic components determination has been proposed and its advantages have been discussed.

V. M. Архипова, С. В. Дзядевич, О. М. Щувайло, О. П. Солдаткин, Г. В. Ельська, Н. Жафрезик-Рено, Г. Жафрезик, К. Мартле

Концепція мультибіосенсора для визначення різних токсичних речовин на основі ферментного інгібіторного аналізу

Резюме

Запропоновано та описано концепцію мультибіосенсора для визначення різних токсичних речовин на основі інгібіторного ферментного аналізу та показано принципову можливість його створення. Для розробки такої системи було використано два типи перетворювачів, а саме — потенціометричні рН-чутливі польові транзистори та кондуктометричні тонкоплівчасті гребінчасті електроди, а також три ферменти: уреаза, ацетилхолінестераза та бутирилхолінестераза. Отримані в ході вимірювань дані було оброблено за допомогою математичного апарату: дискримінантного функціонального аналізу та методу штучних нейронних сіток. Запропоновано повну процедуру визначення токсичних речовин та описано її переваги.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Verscheuren K.* Handbook of environmental data on organic chemicals, 2nd ed.—New York: Van Nostrand Reinhold, 1983.—673 p.
2. *Verordnung uber Trinkwasser und uber Wasser fur Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung—TrinkwV) // Bundesgesetzblatt, Jahrganag.—1986.—Teil 1.—S. 760.*
3. *Sherma J., Zweig G.* Pesticides // *Anal. Chem.*—1983.—55.—P. 57R.
4. *Durand P., Nicaud J. M., Mallevalle J.* Detection of organophosphorous pesticides with an immobilized cholinesterase electrode // *J. Anal. Toxicol.*—1984.—8.—P. 112—117.
5. *Tran-Minh C., Pandey P. C., Kumaran S.* Studies on acetyl-

choline sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase // *Biosensors and Bioelectronics.*—1990.—5.—P. 461—471.

6. *Soldatkin A. P., Volotovskiy V. V., El'skaya A. V., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.* Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers // *Anal. chim. acta.*—2000.—403.—P. 25—29.
7. *Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V.* Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination // *Sensors and Actuators.*—1995.—24—25.—P. 145—148.
8. *Miyahara Yu., Moritsumi T., Ichimura K.* Integrated enzyme FETs for simultaneous detection of urea and glucose // *Sensors and Actuators.*—1985.—7.—P. 1—10.
9. *Hanazato Y., Nakako M., Shiono S.* Multi-enzyme electrode using hydrogen-ion-sensitive field-effect transistors // *IEEE Transactions on Electron Devices.*—1986.—ED-33.—P. 47—51.
10. *Cullen D. C., Sethi R. S., Lowe C. R.* Multianalyte miniature conductance biosensor // *Anal. chim. acta.*—1990.—231.—P. 33—40.
11. *Winqvist F., Holmin S., Krantz-Rulker C., Wide P., Lundstrom J. A.* hybrid electronic tongue // *Anal. chim. acta.*—2000.—406.—P. 147—157.
12. *Дзядевич С. В., Солдаткин О. П.* Кондуктометричний метод у ферментативному каталізі // *Укр. біохім. журн.*—1994.—66, № 4.—С. 30—42.
13. *Шульга А. А., Стриха В. И.* Современное состояние разработок биосенсоров на основе полупроводниковых структур // *Биотехника — новое направление компьютеризации.*—М.: Наука, 1990.—С. 63—82.
14. *Dzyadevich S. V., Shul'ga A. A., Soldatkin A. P., Nyamsi-Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.* Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides // *Electroanalysis.*—1994.—6.—P. 752—758.
15. *Shul'ga A. A., Netchporouk L. I., Sandrovskiy A. K., Abalov A. A., Frolov O. S., Kononenko Yu. G., Maupas H., Martelet C.* Operation of an ISFET with non-insulated substrate directly exposed to the solution // *Sensors and Actuators.*—1995.—30.—P. 101—105.
16. *Пацковский С. В., Волотовский В. В.* Прибор для кондуктометрических измерений с тонкопленочными планарными электродами // *Приборы и техника эксперимента.*—1996.—№ 4.—С. 168.
17. *Волотовский В. В., Пацковский С. В.* Прибор для измерения затворного потенциала иончувствительного полевого транзистора // *Приборы и техника эксперимента.*—1996.—№ 3.—С. 168.
18. *Shul'ga A. A., Dzyadevich S. V., Soldatkin A. P., Patskovskiy S. V., Strikha V. I.* Conductometric biosensors for glucose and urea based on microfabricated thin-film interdigitated array-electrodes // *Biol. Ital.*—1993.—23, N 6.—P. 40—45.
19. *Gardner J. W., Hines E. L.* Pattern analysis techniques // *Handbook of biosensors and electronic noses.*—Boca Raton: CRC press, 1997.—P. 633—652.
20. *Sanchez M. S., Sarabia L. A.* Efficiency of multi-layered feed-forward neural networks on classification in relation to linear analysis, quadratic discriminant analysis and regularized discriminant analysis // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.*—1995.—28.—P. 287—303.

УДК 577.15; 573.6

Надійшла до редакції 04.10.2000