

Потенціометричний біосенсор для визначення глікоалкалоїдів картоплі: керована зміна аналітичних характеристик, порівняння з методом тонкошарової хроматографії

О. А. Назаренко, О. П. Солдаткін, О. Ф. Сосовська, І. В. Бенілова, Я. І. Корпан

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E. mail: ya_korpan@yahoo.com

Щоб спрямовано змінювати аналітичні характеристики біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) та іммобілізованої бутирилхолінестерази (БуХЕ) для визначення стероїдних глікоалкалоїдів картоплі запропоновано використання БуХЕ різного походження та варіювати час іммобілізації ферменту на поверхні потенціометричних перетворювачів. Показано, що застосування етилендіамінтетраацетату (комплексон іонів важких металів) і фосфотриестерази (фермент, який здатний розщеплювати винятково фосфороорганічні пестициди) дозволяє селективно визначати глікоалкалоїди на фоні іонів важких металів та фосфороорганічних пестицидів. За допомогою біосенсора і методу тонкошарової хроматографії протестовано 14 сортів картоплі, які культивуються на території України, та показано, що значення кореляції між даними, отриманими цими методами, складає 0,74.

Ключові слова: біосенсор, глікоалкалоїди, рН-чутливі польові транзистори, бутирилхолінестераза, тонкошарова хроматографія.

Вступ. Картопля є однією з основних сільськогосподарських культур, що вирощується у 80 % країн світу. Багата на крохмаль, вітаміни, білки та органічні кислоти, які визначають її високу харчову цінність [1], вона містить також цілу низку антинутрієнтів різної хімічної природи, у тому числі дуже токсичні глікоалкалоїди (ГА), які спричиняють отруєння людей і численні смертельні випадки серед великої рогатої худоби [1–3].

Відомо, що стероїдні ГА є ембріотоксичними і тератогенними сполуками. Крім цього, існують дані стосовно того, що ГА підвищують ризик захво-

рювання на рак мозку, молочної залози, легень і щитовидної залози.

Усе вищезазначене є особливо суттєвим, коли йдеться про необхідність контролю алкалоїдів у сільському господарстві, харчовій промисловості і охороні здоров'я.

Серед сучасних методів визначення ГА можна виокремити колориметрію [4], тонкошарову [5] і газову хроматографію [6], мас-спектрометрію [7], рідинну хроматографію [8], високоефективну рідинну хроматографію [9, 10], тонкошарову хроматографію з високою роздільною здатністю [11] та імунний аналіз [12]. Потрібно зазначити, що більшість із них мають певні недоліки, зокрема, трива-

лий час підготовки зразка та проведення самого аналізу, дороге обладнання і біологічний матеріал, необхідність обслуговування фаховими аналітиками тощо.

На сьогоднішній день найперспективнішими для аналізу різних токсинів видаються розробки біосенсорів на основі перетворювачів, створених за технологіями мікроелектроніки. Попередні дослідження співробітників нашої лабораторії дозволили зробити висновок щодо можливості застосування біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої бутирилхолінестерази (БуХЕ) для кількісного визначення ГА у модельних розчинах і соку картоплі [13—15].

Головною метою представленої роботи було знайти підходи до управління чутливістю створеного раніше потенціометричного біосенсора та дослідити можливість селективного визначення стероїдних ГА картоплі на фоні іонів деяких важких металів і пестицидів, а також виявити і порівняти вміст стероїдних алкалоїдів у декількох сортах картоплі, що культивуються в Україні, за допомогою біосенсора і методу ТШХ.

Матеріали і методи. У роботі використано ферменти: БуХЕ із сироватки крові коня і людини з активністю 13 і 6,4 од. акт/мг відповідно фірми «Sigma»-«Aldrich Chemie GmbH» (США); субстрат БуХЕ — бутирилхолінхлорид («Sigma»-«Aldrich Chemie GmbH»). Для іммобілізації ферментів застосовували 25 %-й водний розчин глутарового альдегіду фірми «Serva» (Німеччина); для стабілізації біоматриць до них додавали сироватковий альбумін бика (БСА) фірми «Serva».

Для інгібіторного аналізу використовували кристалічні α -соланін та α -чаконін з пагонів *Solanum tuberosum* від «Sigma»-«Aldrich Chemie GmbH».

Матеріалами для тонкошарової хроматографії слугували: а) пластинки з силікагелем як сорбент марки Сорбфіл (Росія); б) хлороформ, метанол, гідроксид амонію, концентрована соляна кислота, 95 %-й етанол та ін., усі вони мали кваліфікацію «ос. ч.» або «х. ч.»; в) хлорид сурми (III) та дихлорметан від «Sigma» (США), які застосовували при проявленні хроматограм; г) картопля 14 сортів (ранні: Повінь, Серпанок, Бородянська рожева; середньоранні: Світанок київський, Водограй, Обрій, Купава, Забава; середньостиглі: Слов'янка, Явір, Луговська та середньопізні: Ракурс, Зарево, Промінь) врожаю 2003 року для дослідів із вивчен-

ня вмісту алкалоїдів, отримана від Інституту картоплярства Української академії аграрних наук.

Реагенти для приготування буферних розчинів і середовищ інкубації мали кваліфікацію «ч. д. а.» та «х. ч.»

Біосенсорний метод вимірювання. Біоселективні мембрани на поверхнях перетворювачів формували зшиванням ферменту з БСА в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду [16]. Суміш 5 % (w/v) ферменту, 5 % (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) наносили крапельним методом на чутливу поверхню одного з перетворювачів, а суміш 10 % (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) — на референтний перетворювач. Потім сенсорний чіп витримували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду упродовж 30 хв (якщо не зазначено інше) і мембрани висушували протягом 15 хв у повітрі за кімнатної температури.

Вимірювання здійснювали при денному світлі і кімнатній температурі (25 °С) у скляній комірці. Сенсорні чіпи занурювали у вимірювальну комірку, заповнену 2 мл 5 мМ фосфатного буфера, який активно перемішували. Сенсори вимочували буферним розчином протягом 15—45 хв, щоб урівноважити мембранну систему.

Після цього виписували базову лінію вихідного сигналу і до комірки вносили субстрат. Диференційний вихідний сигнал між вимірювальним і референтним ІСПТ реєстрували за допомогою лабораторної установки і отримували графічну залежність величини сигналу від концентрації субстрату.

У разі інгібіторного аналізу токсичних речовин на наступному етапі додавали ГА та визначали ступінь інгібування ферменту за рівнем зниження вихідного сигналу біосенсора. Останнє слугувало мірою пригнічення ферменту і було прямо пропорційним концентрації інгібітора в комірці.

Метод на основі тонкошарової хроматографії. П і д г о т о в к а п р о б. З картопляних бульб зрізали шкірку (3—4 мм), подрібнювали і сушили при температурі 35 °С протягом 2 діб. Кінцева маса зразків за рахунок втрати вологи складала в середньому 25 % від початкової. Далі зразки розтирали до порошкоподібного стану.

Е к с т р а к ц і я г л і к о а л к а л о і д і в. 2 г порошку вміщували в круглдонну колбу і заливали 15 мл суміші киплячий метанол:оцтова

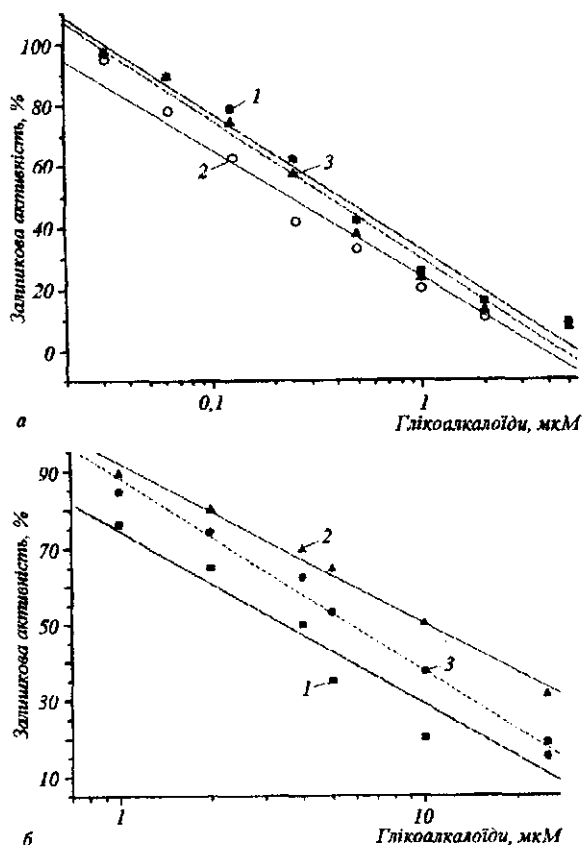


Рис. 1. Калібрувальні криві пригнічення бутирилхолінестерази (БуХЕ) різного походження: а — БуХЕ з сироватки людини; б — БуХЕ з сироватки коня (1 — α -соланіном; 2 — α -чаконіном; 3 — їхньою сумішшю, 1:1). На цьому рисунку та на рис. 2—5 і 7 похибка дорівнює 5 %

кислота (95 + 5, v/v) (суміш А) [17]. Колбу приєднували до зворотного холодильника і тримали на водяній бані, періодично струшуючи, при температурі кипіння метанолу (70 °С). Надосадову рідину зливали в колбу, а до осаду знову додавали 15 мл суміші А. Загалом процедуру повторювали тричі. Зібрану рідину фільтрували і випарювали при 40 °С, використовуючи водоструминний насос, до сухого залишку. Останній розчиняли в 1 мл суміші Б (метанол:оцтова кислота, 99 + 1, v/v) [17]. Отриманий екстракт застосовували для хроматографічного аналізу.

Розділення соланіну і чаконіну на пластинках Сорбфіл. 1. Носії готували наступним чином. Перед використанням пластинки Сорбфіл з дрібнозернистим силікагелем активували, проганяючи по них метанол

у хроматографічній камері. Потім пластинки висушували на повітрі.

2. Для приготування зразка вихідний розчин (стандарт) соланіну і чаконіну на суміші Б брали в концентрації 0,4 мг/мл (у 5 мкл 2 мкг алкалоїду).

3. Зразки для хроматографічного аналізу наносили за допомогою самплерів на лінію старту. Плями з $d = 3-4$ мм були розташовані на відстані 1,5—2 см одна від одної та 2,5 см — від краю пластинки для того, щоб вони не занурювалися в розподільну суміш.

4. Суміш хлороформ:метанол:2 %-й водний розчин гідроксиду амонію у співвідношенні 70:30:5 [11] вносили на дно хроматографічної камери на висоту 1 см. Для розподілу ГА використовували метод висхідної одновимірної хроматографії (роздільний шлях 8,5 см). Оптимальне розділення соланіну і чаконіну спостерігалось при $t = 18-20$ °С. Після завершення хроматографії пластинки висушували в горизонтальному положенні до повного випаровування залишків розчинників.

5. Для візуалізації хроматографічних плям використовували хлорид стибіуму (III) як специфічний барвник на стероїдні глікозиди. В результаті взаємодії $SbCl_3$ з подвійним зв'язком стероїду з'являється малинове забарвлення [17, 18]. Завдяки тому, що хлорид стибіуму — це специфічний барвник на стероїди, для визначення соланіну або чаконіну може бути використана одна й та сама калібрувальна крива. Пластинки на кілька секунд занурювали у 2 M $SbCl_3$, розчинений у суміші оцтова кислота:дихлорметан (1 + 3, v/v), і сушили на повітрі не довше 10 хв. Потім їх вміщували у сушильну шафу (100 °С). Яскраво-рожеві плями на безбарвному тлі хроматограми з'являлися через 3—5 хв (рис. 1).

Для останнього етапу аналізу поверхню хроматограми сканували через 5 хв після проявлення, отримуючи цифрову копію зображення, та проводили комп'ютерний розрахунок кінцевого результату, використовуючи спеціальну програму «Денситоаналіз» [19].

Результати і обговорення. Створений нами раніше сенсор на основі потенціометричних перетворювачів придатний для кількісного визначення загального вмісту ГА у зразках харчових продуктів, оскільки вимірювання можна проводити в діапазоні концентрації від 1 до 100 мкМ, що є нижчим від такої ГА у споживаній людиною картоплі (25—250 мкМ). Однак, згідно з роботою [20],

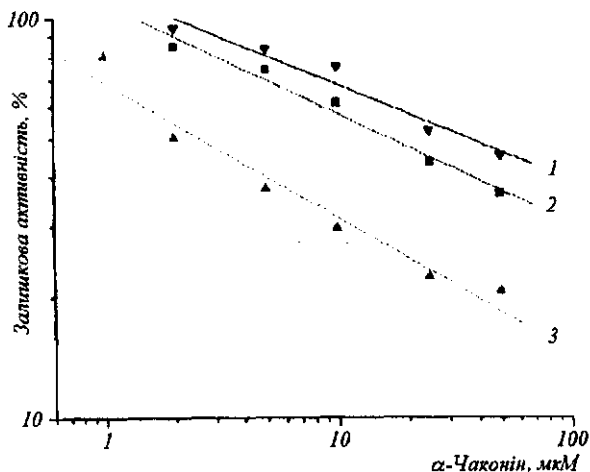


Рис. 2. Калібрувальні криві для визначення чаконіну за різної тривалості іммобілізації бутирилхолінестерази у парах глутарового альдегіду: 1 — 15 хв; 2 — 30 хв; 3 — 45 хв. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,3

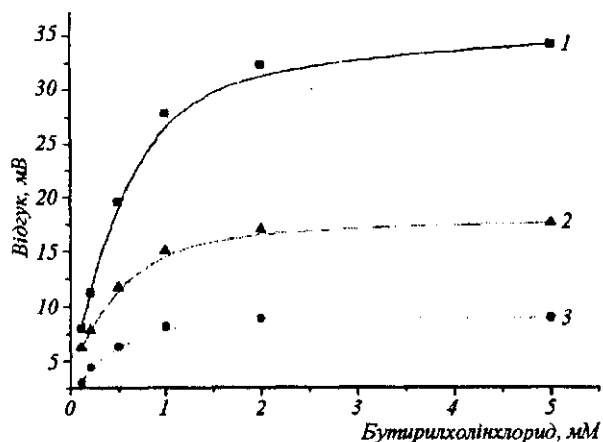


Рис. 3. Калібрувальні криві для визначення субстрату за різної тривалості іммобілізації у парах глутарового альдегіду: 1 — 15 хв; 2 — 30 хв; 3 — 45 хв. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,3

співвідношення соланідин:соланін:чаконін у крові становить 1:2,4:4,5 і тому рівень ГА у сироватці може бути таким: соланідину — 0,19, соланіну — 0,2 і чаконіну — 0,4 мкМ. Абсолютно очевидно, що для аналізу загального рівня ГА у сироватці крові необхідно знайти підходи до покращення деяких аналітичних характеристик створених біосенсорів, а саме — підвищення діапазону чутливості визначення глікоалкалоїдів.

Для вирішення цього завдання запропоновано

варіювати час іммобілізації БуХЕ в насичених парах глутарового альдегіду.

Як видно з рис. 2, зі збільшенням часу іммобілізації зростає чутливість і діапазон вимірювання чаконіну. Логічним поясненням отриманого результату видається припущення, що величина відгуку сенсора, перш за все, визначається активністю ферменту у мембрані сенсора і відповідно кількістю активних сайтів ферменту, здатних зв'язувати як молекули інгібітора, так і молекули субстрату. Отже, чим нижча активність ферменту у мембрані сенсора, тим більший ступінь пригнічення молекулами алкалоїду. На рис. 3 показано, що кількість активного ферменту в мембрані значно знижується із зростанням часу іммобілізації. Так, при 45-хв іммобілізації фермент мав найменшу активність, що пов'язано, очевидно, з формуванням більшої кількості ковалентних зв'язків між молекулами глутарового альдегіду та аміногрупами ферменту. Внаслідок цього зменшується активність останнього, що призводить до падіння величини відгуку сенсора.

Оскільки варіювання часу іммобілізації БуХЕ на поверхні потенціометричного перетворювача не спричинило суттєвого покращення діапазону чутливості створеного сенсора, було запропоновано замість БуХЕ сироватки крові коня використати як чутливий елемент сенсора БуХЕ сироватки людини. Встановлено (рис. 1), що біосенсор на основі БуХЕ сироватки крові людини значно чутливіший до ГА картоплі у порівнянні з сенсором, де використано БуХЕ сироватки коня, а лінійний динамічний діапазон визначення алкалоїдів складає 1—20 і 0,03—5 мкМ відповідно для БуХЕ сироватки крові коня і людини. Очевидно, що чутливості біосенсора з іммобілізованою БуХЕ людини достатньо для аналізу вмісту ГА в сироватці крові. Відомо, що фермент БуХЕ має порівняно низьку специфічність стосовно різних типів інгібіторів, зокрема, фосфоорганічних пестицидів та іонів важких металів. З огляду на це виконано низку дослідів для виявлення можливості селективного визначення ГА картоплі за допомогою створеного потенціометричного біосенсора. Визначено також концентрації глікоалкалоїдів на фоні деяких важких металів і пестицидів.

Так, додавання ЕДТА у робочий буфер концентрації 1 мМ не впливало на чутливість холінестеразного сенсора до ГА, тобто глікоалкалоїди можна визначати з тією ж самою чутливістю у

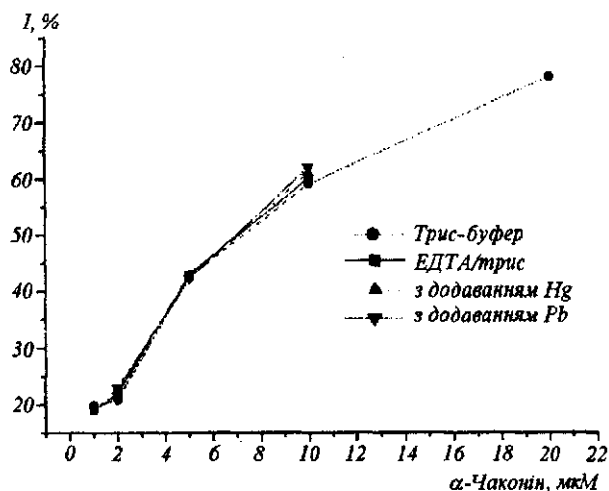


Рис. 4. Калібрувальні криві для визначення чаконіну в різних буферах: 10 мМ трис, 10 мМ трис + 1 мМ ЕДТА, 10 мМ трис + 1 мМ ЕДТА з додаванням 50 мкМ Hg^{2+} або Pb^{2+}

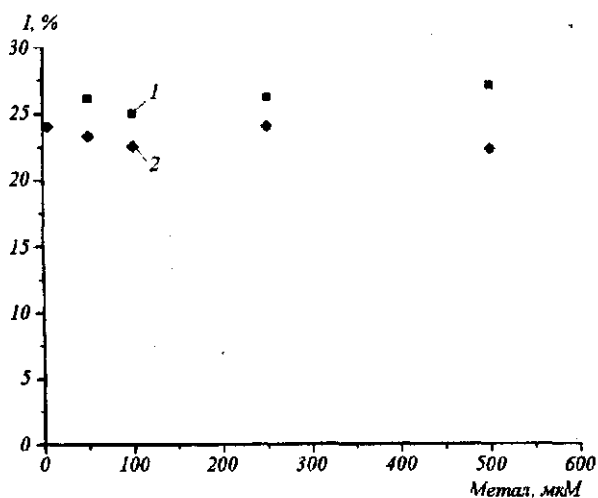


Рис. 5. Вплив різних концентрацій іонів важких металів на відгук біосенсора (інгібування, I): 1 — 1 % Pb^{2+} ; 2 — 1 % Hg^{2+} . Буфер: 10 мМ трис- NO_3 + 1 мМ ЕДТА. Концентрація чаконіну становила 2 мкМ

присутності токсичних іонів важких металів, таких як ртуть і свинець, при концентраціях 50 мкМ (рис. 4). Встановлено також, що збільшення вмісту іонів важких металів одного типу (до 500 мкМ ртуті або свинцю) в середовищі вимірювання глікоалкалоїдів біосенсорним методом значного впливу на інгібіторний ефект ГА та на точність визначення не справляло (рис. 5).

Внесення суміші іонів до аналізованого зразка також не впливало на інгібіторну здатність ГА (рис. 6). Отриманий результат дає можливість

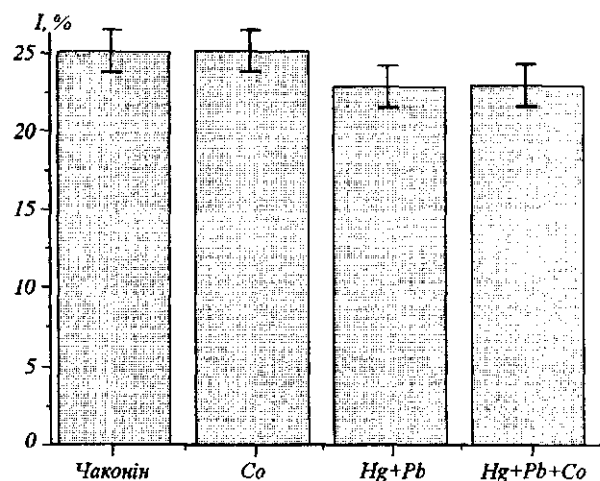


Рис. 6. Вплив наявності важких металів на відгук біосенсора (інгібування, I). Вимірювання здійснювали в буферному розчині: 10 мМ трис + 1 мМ ЕДТА. Концентрація чаконіну становила 2 мкМ, Co^{2+} — 500, Hg^{2+} — 2 і Pb^{2+} — 250 мкМ

зробити висновок, що використання 1 мМ ЕДТА в робочому буфері робить сенсор нечутливим до іонів важких металів одного типу та їхніх сумішей у значних концентраційних діапазонах, тобто селективним для визначення ГА на фоні іонів важких металів.

Наступним етапом роботи було дослідження можливості створення біосенсора, нечутливого до фосфоорганічних пестицидів. Відомо, що фосфотриестераза здатна розщеплювати фосфоорганічні пестициди. Тому ми припустили, що за наявності даного ферменту в біоселективній мембрані біосенсора останній повинен бути нечутливим до пестицидів і відповідно реагувати лише на концентрації ГА у вимірювальних зразках. Дійсно, коли при створенні біосенсора фосфотриестеразу коїмобілізували з БуХЕ в біоселективній мембрані, сенсор не виявляв впливу фосфоорганічних пестицидів на відгук сенсора до ГА (рис. 7). А додавання 1 мМ ЕДТА у вимірювальну комірку призвело до того, що ГА можна було вимірювати з високою селективністю за присутності високих концентрацій як фосфоорганічних пестицидів (наприклад, 100 мкМ параоксону), так і значних концентрацій іонів важких металів (100 мкМ Pb^{2+} , Hg^{2+}) (рис. 8).

Таким чином, можна зробити висновок стосовно того, що застосування етилендіамінтетраацетату і фосфотриестерази, коїмобілізованої на поверхні потенціометричних перетворювачів разом з БуХЕ,

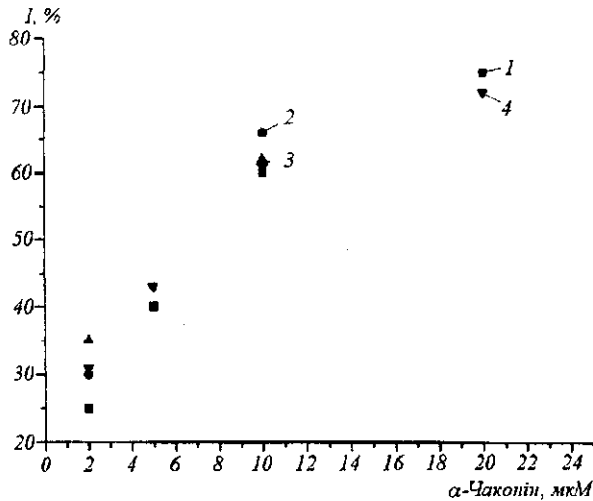


Рис. 7. Калібрувальні криві для визначення чаконіну біосенсорним методом за наявності параоксону і кобальту в середовищі визначення: 1 — 1 % ЕДТА; 2 — 10 мкМ параоксон; 3 — 100 мкМ параоксон; 4 — 1 % суміш ЕДТА + Со. Вимірювання здійснювали в 10 мМ трис-NO₃ буфері, рН 7,5, який містив 1 мМ ЕДТА. Біоселективна мембрана вміщувала бутирилхолінестеразу (5 %) і фосфотриестеразу (0,2 %)

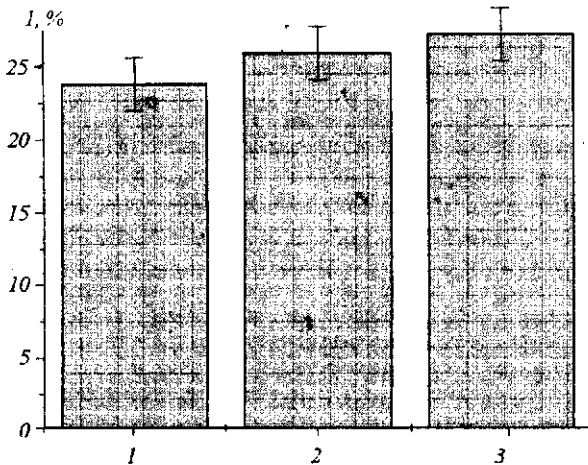


Рис. 8. Вплив параоксону і важких металів на відгук біосенсора (концентрація чаконіну становила 2 мкМ): 1 — 10 мкМ параоксон + 100 мкМ (Hg, Pb); 2 — 100 мкМ параоксон + 100 мкМ (Hg, Pb); 3 — 10 мкМ параоксон + 250 мкМ (Hg, Pb) Визначення проводили в 10 мМ трис-NO₃ буфері за наявності 1 мМ ЕДТА. Біоселективна мембрана містила бутирилхолінестеразу (5 %) і фосфотриестеразу (0,2 %)

перешкоджає пригніченню іммобілізованої БуХЕ ртуттю, свинцем (аж до концентрацій 500 мкМ) і параоксоном (до 100 мкМ) та не впливає на здатність стероїдних алкалоїдів картоплі інгібувати її, а також дозволить роздільно визначати досліджувані зразки на наявність вищезгаданих токсинів за допомогою розробленого біосенсора.

Вміст глікоалкалоїдів у різних сортах картоплі.

Сорт картоплі	Вміст глікоалкалоїдів (мг/100 г сирової маси), визначений	
	біосенсорним методом	методом ТШХ
Ранні		
Повінь	15,6±0,8	13,8±1,4
Серпанок	8,2±0,4	6±0,6
Бородянська рожева	13±0,6	9,4±0,9
Середньоранні		
Світанок київський	14,9±0,7	11,5±1,1
Водограй	12,7±0,6	12,8±1,3
Обрій	5,4±0,3	7±0,7
Купава	11,4±0,6	9,7±0,9
Забава	6,1±0,3	6,1±0,6
Середньостиглі		
Слов'янка	11,9±0,6	13,7±1,3
Явір	10,8±0,5	13,2±1,3
Луговська	15,8±0,8	14,2±1,4
Середньопізні		
Ракурс	17,9±0,9	29,4±2,9
Зарево	19,3±0,9	19,9±2,0
Промінь	9,7±0,5	17,1±1,7

З використанням методу ТШХ та створеного потенціометричного сенсора протестовано 14 сортів картоплі (див. «Матеріали і методи»), виведеної методом традиційної селекції співробітниками Інституту картоплярства Української академії аграрних наук.

За результатами проведеного дослідження (таблиця), міжнародним стандартам відповідають лише три сорти картоплі: Серпанок, Обрій і Забава. інші ж мають підвищений рівень токсинів, деякі — на межі дозволеної норми. Занепокоєння викликають концентрації глікоалкалоїдів у сортах Ракурс (17,9 мг/100 г — сенсор, 29,45 мг/100 г — ТШХ) і Зарево (19,35 мг/100 г — сенсор, 19,9 мг/100 г — ТШХ).

Коефіцієнт кореляції між ТШХ та біосенсорним методами, розрахований за формулою [1]

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

становив 0,74. Лінійні діапазони чутливості методу ТШХ і біосенсорного методу складала 47—470 і

1—50 мкМ алкалоїдів відповідно. Сумарний вміст глікоалкалоїдів у бульбах 14 сортів дорівнював 5,7—29,45 мг/100 г сирової маси.

Вивчено також зв'язок між тривалістю досягання бульб і вмістом у них ГА. Найнижчими були показники у ранніх та середньоранніх сортів, хоча й серед них траплялися випадки підвищеної концентрації соланіну і чаконіну (наприклад, Повінь, Світанок київський, Водограй). Усі середньостиглі сорти мали значний вміст ГА, який змінювався в межах 11—16 мг/100 г сирової маси, а середньопізні мали ще вищі показники — від 17 до 30 мг/100 г сирової маси. Таким чином, спостерігається збільшення концентрації ГА пропорційно часу вегетаційного періоду. Це можна пояснити тривалішим впливом різних факторів, які стимулюють синтез ГА, ними можуть бути гербіциди, інсектициди, пошкодження шкідниками, грибними та іншими інфекціями.

A. A. Nazarenko, O. P. Soldatkin, O. F. Sosovskaya, I. V. Benilova, Ya. I. Korpan

Potentiometric biosensor for detection of potato glycoalkaloids: control of its analytical characteristics, comparison with thin-layer chromatography

Summary

Butyrylcholinesterase (BuChE) of different origin along with variations of the time of the enzyme immobilization on the potentiometric transducer surface are offered to control analytical characteristics of the biosensor, based on pH-sensitive field effect transistor with immobilized BuChE, for detection of the potato glycoalkaloids. Utilization of ethylenediaminetetraacetate (a complexon of heavy metal ions) and phosphotriesterase (an enzyme capable of exclusive disintegration of phosphororganic pesticides) is shown to enable the selective determination of glycoalkaloids at the background of heavy metal ions and phosphororganic pesticides. 14 potato varieties cultivated in Ukraine have been tested by the biosensor and thin-layer chromatography the correlation between both methods being 0.74.

Key words: biosensor, glycoalkaloids, pH-sensitive field effect transistors, butyrylcholinesterase, thin-layer chromatography.

E. A. Назаренко, А. П. Солдаткин, О. Ф. Сосовская, Я. И. Корпан

Потенциометрический биосенсор для определения гликоалкалоидов картофеля: направленное изменение аналитических характеристик, сравнение с методом тонкослойной хроматографии

Резюме

Чтобы направленно изменять аналитические характеристики биосенсоров на основе pH-чувствительных полевых транзисторов и иммобилизованной бутирилхолинэстеразы (БухЭ) для определения гликоалкалоидов картофеля предложено использование БухЭ различного происхождения и варьирование

времени иммобилизации фермента на поверхности потенциометрических преобразователей. Показано, что применение этилендиаминтетраацетата (комплексона ионов тяжелых металлов) и фосфотриэстеразы (фермента, способного расщеплять исключительно фосфоорганические пестициды) позволяет селективно определять гликоалкалоиды на фоне ионов тяжелых металлов и фосфоорганических пестицидов. С помощью биосенсора и метода тонкослойной хроматографии протестированы 14 сортов картофеля, культивирующегося на территории Украины, и показано, что значение корреляции между данными, полученными этими методами, составляет 0,74.

Ключевые слова: биосенсор, гликоалкалоиды, pH-чувствительные полевые транзисторы, бутирилхолинэстераза, тонкослойная хроматография.

PERELIK LITERATURY

1. Третьяков Н. Н., Кошкин Е. И., Макрушин Н. М. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений. — М.: Колос, 2000.—614 с.
2. Smith D. B., Roddick J. G., Jones J. L. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions // Trends Food Sci. and Technol.—1996.—7.—P. 126—131.
3. Friedman M., McDonald G. M. Postharvest changes in glycoalkaloid content of potatoes // Adv. Exp. Med. Biol.—1999.—459.—P. 121—143.
4. Clement E., Verbist J. F. Determination of solanine in *Solanum tuberosum* L. tubers: comparative study of 9 colorimetric methods // Lebensmitt.-Wiss. + Technol.—1989.—13.—P. 202—206.
5. Ferreira F., Moyna P., Soule S., Vazquez A. Rapid determination of *Solanum* alkaloids by thin-layer chromatographic scanning // J. Chromatogr.—1993.—653.—P. 380—384.
6. Herb S. F., Fitzpatrick T. J., Osman S. F. Separation of potato glycoalkaloids by gas chromatography // J. Agr. Food. Chem.—1975.—23.—P. 520—523.
7. Chen S. Analysis of glycoalkaloids from potato shoots and tomatoes by four-sector tandem mass spectrometry with scanning-array detection: comparison of positive ion and negative ion methods // Anal. Biochem.—1994.—218.—P. 157—169.
8. Hellenas K. E., Branzell C. Liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in potato tubers: NMKL Inter-laboratory study (Nordic Committee on Food Analysis) // J. AOAC Int.—1997.—80.—P. 549—554.
9. Hellenas K.-E., Nyman A., Slanina P., Loof L., Gabrielsson J. Determination of potato glycoalkaloids and their aglycones in blood serum by High Performance Liquid Chromatography. Application to pharmacokinetic studies in humans // J. Chromatogr.—1992.—573.—P. 69—78.
10. Sotelo A., Serrano B. High-performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato. // J. Agr. Food Chem.—2000.—48.—P. 2472—2475.
11. Simonovska B., Vovk I. High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. // J. Chromatogr.—2000.—903.—P. 219—225.
12. Pat. USA ent N US 5614408. Monoclonal antibodies to potato, tomato, and eggplant glycoalkaloids and assays for the same / L. H. Stanker, C. K. Holtzapple // Publ. April 24, 1997/Oct. 18, 1996.
13. Korpan Y. I., Volotovskiy V. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Nazarenko E. A., El'skaya A. V., Soldatkin A. P. A novel biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-

- sensitive field effect transistors. // *Bioelectrochemistry*.—2002.—55.—P. 9—11.
14. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Korpan Ya. I., El'skaya A. V., Gravouelle J.-M., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potato // *Sensors and Actuators B*.—2004.—103.—P. 416—422.
 15. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., El'skaya A. V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids // *Biosensors and Bioelectronics*.—2003.—18.—P. 1047—1053.
 16. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П., Архипова В. М., Шульга О. А., Ельська Г. В. Кондуктометричний ферментний глюкосенсор. Пошук шляхів поліпшення аналітичних характеристик // *Укр. біохім. журн.*—1995.—67, № 6.—С. 53—59.
 17. Bodart P., Kabenger Ch., Noirfalise A. Determination of α -solanine and α -chaconine in potatoes by high-performance thin-layer chromatography/densitometry // *J. AOAC Int.*—2000.—83.—P. 1468—1473.
 18. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях.—М.: Мир, 1965.—508 с.
 19. Шандренко С. Г., Головін А. С., Дмитренко М. П., Юрченко А. І., Бабичева О. Ф. Комп'ютерна реєстрація та аналіз результатів тонкошарової хроматографії // *Журн. хроматогр. т-ва.*—2003.—2, № 4.—С. 22—30.
 20. Пасешинченко В. А., Гусева А. Р. Количественное определение гликоалкалоидов картофеля и препаративное их разделение // *Биохимия.*—1956.—21.—С. 585—590.

УДК 577.152.3:543.645.3:543.554
Надійшла до редакції 23.11.04