

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Tamara D. Lazarević-Pašti

**PRIMENA OKSIDACIJE ORGANO-
TIOFOSFATNIH PESTICIDA U
METODAMA ZA NJIHOVU DETEKCIJU NA
BAZI INHIBICIJE
ACETILHOLINESTERAZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Tamara D. Lazarević-Pašti

**APPLICATION OF
ORGANOTHIOPHOSPHATE PESTICIDES
OXIDATION IN METHODS FOR THEIR
DETECTION BASED ON
ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentori: dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“

Članovi komisije: dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“

dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Mentoru, prof. dr Ljubi Mandić, zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći, podršci, posvećenom vremenu za konsultacije i stručnim savetima tokom izrade i pisanja ove teze.

Mentoru, dr Vesni Vasić, zahvaljujem se na izboru teme, podršci i razumevanju, posvećenom vremenu u izradi i pisanju ove teze, kao i na znanju koje sam stekla radeći sa njom.

Zahvalnost dugujem prof. dr Miroslavu M. Vrviću na dragocenim sugestijama tokom pisanja ove teze.

Zahvaljujem se dr Tatjani Momić na svesrdnoj pomoći i uvođenju u problematiku, kao i na savetima tokom izrade eksperimentalnog dela teze.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na podršci i pomoći koju su mi pružali tokom izrade ove teze.

Najtoplije se zahvaljujem svojoj porodici i dragim prijateljima na nesebičnoj pomoći i iskrenoj podršci koju su mi pružali tokom izrade ove teze.

Posebno se zahvaljujem svom suprugu Igoru na stručnim savetima, podršci, strpljenju i razumevanju.

PRIMENA OKSIDACIJE ORGANO-TIOFOSFATNIH PESTICIDA U METODAMA ZA NJIHOVU DETEKCIJU NA BAZI INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Ispitana je inhibicija slobodne acetilholinesteraze (AChE) odabranim organo-tiofosfatima (OP) (diazinon, malation, hlörpirifos, azinfos-metil, forat) i njihovim okso-analogima (diazokson, malaokson, hlörpirifos-okson, azinfos-metil-okson, forat-okson), pri čemu su optimizovani uslovi za detekciju najniže koncentracije tih jedinjenja primenom AChE testa. Određene su IC_{50} vrednosti za sva navedena jedinjenja.

U cilju povećanja osetljivosti AChE testa, ispitivani organo-tiofosfati prevedeni su u okso-analoge u prisustvu enzima mijeloperoksidaze (MPO). To je potvrđeno pomoću UPLC i GC/MS analize. Nastali oksidacioni proizvodi stabilni su najmanje 1h. Maksimalne koncentracije oksona dobijaju se kada se organo-tiofosfati inkubiraju sa 100 nM MPO u prisustvu H_2O_2 koncentracije 50 μ M, pri pH 6, na temperaturi 25 °C u toku 10 minuta. Oksidacija OP u prisustvu MPO pod navedenim uslovima primenjena je u modifikaciji metode za detekciju OP na bazi inhibicije AChE. Određena je granica detekcije modifikovane metode, kao i efikasnost oksidacije i njena primena na smešu OP.

Gore navedeni organo-tiofosfati prevedeni su u odgovarajuće oksone i pomoću elektrohemijski generisanih halogena. Proizvodi koji nastaju identifikovani su kao oksioni pomoću UPLC analize. Utvrđeno je da je najefikasnija oksidacija elektrognerisanim bromom u toku 15 minuta. Određena je i granica detekcije AChE testa za određivanje OP kada su OP oksidovani elektrohemijski generisanim bromom.

Upoređeni su efekti enzimske i elektrohemijske oksidacije OP na osetljivost AChE testa za detekciju OP. Rezultati su pokazali da su granice detekcije za jedan red veličine niže kada se oksidacija odvija u prisustvu elektrognerisanih halogena u odnosu na enzimsku oksidaciju.

Efekat neoksidovanih OP i OP oksidovanih u prisutvu MPO ispitan je i na imobilizovanoj AChE u protočnom injekcionom sistemu. U ovom slučaju, granica detekcije metode još je niža, i to za još jedan red veličine u odnosu na slobodnu acetilholinesterazu.

Ključne reči: organofosfati, pesticidi, biosenzori, oksidacija, acetilholin-esteraza, mijeloperoksidaza, detekcija;

Naučna oblast: prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: biohemija

APPLICATION OF ORGANOTHIOPHOSPHATE PESTICIDES OXIDATION IN METHODS FOR THEIR DETECTION BASED ON ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION

The inhibition of acetylcholinesterase in the presence of selected organothiophosphates (diazinon, malathion, chlorpyrifos, azinphos-methyl, phorate) and their oxo-analogues (diazoxon, malaaxon, chlorpyrifos-oxon, azinphos-methyl-oxon, phorate-oxon) was examined. Experimental conditions were optimized to detect the lowest possible concentrations of these compounds using AChE test. IC_{50} values were determined for all the mentioned compounds.

Investigated organothiophosphates have been converted into their oxo-analogues in the presence of the enzyme myeloperoxidase. Oxidation products were detected using UPLC and GC/MS analysis. It was found that the products are stable within minimum 1h. In order to optimize oxidation procedure and achieve maximum concentrations of oxons, the optimal concentrations of H_2O_2 (50 μ M) and MPO (100 nM) were determined. Also, the optimal incubation time of OPs and MPO (10 min), as well as the optimal pH (6) and temperature (25 °C) were estimated. Oxidation of OPs in the presence of MPO under optimal conditions was applied as a modification of the method for detecting OP using AChE test. The detection limits were determined for the modified method, as well as the efficiency of oxidation and its application for the analysis of sintetic mixture of OPs.

Examined organothiophosphates have been converted into their oxo-forms using electrochemically generated halogens. Products have been identified as oxons using UPLC analysis. It was found that the the most efficient oxidation of OPs was carried out by after 15 minutes of oxidation with electrogenerated bromine. Detection limits were determined, too.

Effects of enzymatic and electrochemical oxidation on the sensitivity of the AChE test for the detection of OP were compared. The results showed that the IC_{50} values were lower by 100 to 1000 times when the oxidation takes place in the presence of

electrochemically generated halogens and that the limits of detection were for an order of magnitude lower, compared to the enzymatic oxidation procedure.

The effects of OP and OP oxidized in the presence of MPO were tested on immobilized AChE. In this case, the method detection limit was for an order of magnitude lower.

Key words: organophosphate, pesticide, biosensor, oxidation, acetylcholinesterase, myeloperoxidase, detection;

Area of science: natural sciences and mathematics

Sub-area of science: biochemistry

Lista skraćenica

- AChE – acetilholinesteraza
- ASChI - acetiltioholin-jodid
- BChE - butirilholinesteraza
- BSA – goveđi serum albumin (eng. bovine serum albumin)
- ChO – holin-oksidaza
- CPG - staklene kuglice sa kontrolisanom veličinom pora (eng. controlled-pore glass)
- CZE – kapilarna zonska elektroforeza (eng. capillary zone electrophoresis)
- DAD – detektor sa diodnim nizom
- DNK – deoksiribonukleinska kiselina
- DTNB - 5, 5' – ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiseina)
- DEF - S,S,S-tributilfosforotritionat
- DMF - dimetil-formamid
- ECD – detektor na bazi zahvata elektrona (eng. electron-capture detector)
- FIA – protočna injekciona analiza (eng. flow injection analysis)
- FAD – flavin-adenin-dinukleotid
- FADH₂ – redukovani flavin-adenin-dinukleotid
- GC – gasna hromatografija (eng. gas chromatography)
- GC/MS – gasni hromatograf spregnut sa masenim spektrometrom
- GOD - glukoza oksidaza
- HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. high pressure liquid chromatography)
- HPLC/MS - tečna hromatografija pod visokim pritiskom spregnuta sa masenim spektrometrom
- K_m – Mihaelis-Mentenova konstanta
- k_{cat} – katalitička konstanta
- LC – tečna hromatografija (eng. liquid chromatography)
- MPO - mijeloperoksidaza
- NBS - N-bromsukcinimid

NADPH - redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
OP - organofosfatni pesticidi
OPH – organofosfat-hidrolaza
2-PAM - piridin-2-aldoksim
PAPA - 4-aminofenil-acetat
PBS – fiziološki rastvor puferisan fosfatom (eng. phosphate buffered saline)
RNK – ribonukleinska kiselina
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
SDS - natrijum-dodecil-sulfat
SDS-PAGE – natrijumdodecilsulfat-poliakrilamid-gel-elektroforeza
TMB-4 - 1,1'-trimetilen-bis-(4-formilpiridinium-bromid)-dioksim
TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNB - 5-tio-2-nitrobenzoat
TLC – tankoslojna hromatografija (eng. thin-layer chromatography)
UV/VIS – ultraljubičasta i vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja
UPLC – tečna hromatografija pod ultra-visokim pritiskom (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography)
 V_0 – početna brzina reakcije
 V_{max} – maksimalna brzina reakcije
ZKE - zasićena kalomelova elektroda

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Pesticidi.....	3
2.1.1. Grupe pesticida.....	3
2.1.2. Organofosfatna jedinjenja.....	4
2.2. Acetilholinesteraza.....	8
2.2.1. Mehanizam inhibicije acetilholinesteraze sa organofosfatima.....	13
2.3. Detekcija organofosfatnih pesticida.....	15
2.3.1. Konvencionalne metode.....	16
2.3.2. Biosenzori.....	17
2.3.2.1. Biološki senzorni elementi.....	18
2.3.2.2. Imobilizacija biokomponente.....	19
2.3.2.3. Transduceri.....	21
2.3.2.4. Generacije biosenzora.....	23
2.3.2.5. Prednosti i ograničenja biosenzora.....	25
2.3.2.6. Primena biosenzora.....	26
2.3.2.7. Biosenzori za detekciju organofosfatnih pesticida.....	30
2.4. Oksidacija organofosfatnih pesticida.....	33
2.4.1. Oksidacija organofosfatnih pesticida neorganskim supstancama.....	33
2.4.2. Oksidacija organofosfatnih pesticida pomoću enzima.....	34
2.4.3. Elektrohemijska oksidacija organofosfatnih pesticida.....	35
2.5. Mijeloperoksidaza.....	36
2.5.1. Reakcioni mehanizam mijeloperoksidaze.....	39
2.5.2. Trodimenzionalna struktura mijeloperoksidaze.....	41

3. MATERIJAL I METODE	44
3.1. Hemikalije.....	44
3.2. Korišćena oprema.....	47
3.2.1. Spektrofotometrijska merenja.....	47
3.2.2. Tečna hromatografija.....	47
3.2.3. Gasna hromatografija.....	47
3.2.4. Protočni injekcioni sistem (FIA).....	47
3.2.4.1. Imobilizacija AChE.....	49
3.2.5. Elektrohemijska merenja.....	50
3.2.6. Ostala laboratorijska oprema.....	50
3.3. Određivanje aktivnosti AChE.....	51
3.4. Oksidacija OP u prisustvu MPO.....	51
3.5. Oksidacija OP elektrohemijski generisanim hlorom, bromom i jodom.....	52
3.6. Identifikacija proizvoda oksidacije OP.....	52
3.6.1. UPLC.....	52
3.6.2. GC/MS.....	53
3.7. Ispitivanje peroksidazne aktivnosti mijeloperoksidaze.....	54
3.8. Ispitivanje hlorinujuće aktivnosti mijeloperoksidaze.....	54
4. REZULTATI I DISKUSIJA	56
4.1. Inhibicija native AChE organofosfatima.....	56
4.1.1. Optimizacija uslova za detekciju najniže koncentracije OP primenom AChE testa.....	56
4.1.2. Inhibicija AChE organo-tiofosfatima.....	58
4.1.3. Inhibicija AChE okso-oblicima organofosfata.....	61
4.2. Prevođenje OP iz tio- u okso-oblik u prisustvu MPO.....	64
4.2.1. Oksidacija.....	64
4.2.1.1. Identifikacija proizvoda oksidacije.....	65

4.2.1.1.1. UPLC.....	65
4.2.1.1.1.1. Stabilnost oksidovanih oblika OP.....	69
4.2.1.1.2. GC/MS.....	71
4.2.2. Optimizacija uslova za oksidaciju organo-tiofosfata.....	73
4.2.2.1. Određivanje optimalne koncentracije H ₂ O ₂ za oksidaciju OP u prisustvu MPO.....	74
4.2.2.2. Uticaj vremena inkubacije MPO sa OP na oksidaciju.....	76
4.2.2.2.1. Određivanje kinetičkih konstanti za proces oksidacije OP u prisustvu MPO.....	78
4.2.2.3. Oksidacija OP u zavisnosti od koncentracije MPO.....	80
4.2.2.4. Oksidacija OP u prisustvu MPO u zavisnosti od pH.....	82
4.2.2.5. Zavisnost oksidacije OP u prisustvu MPO od temperature reakcione smeše.....	83
4.2.2.5.1. Određivanje aktivacione energije oksidacije.....	86
4.2.3. Primena utvrđenih optimalnih uslova oksidacije OP u prisustvu MPO u modifikaciji AChE testa za detekciju OP.....	88
4.2.3.1. Određivanje efikasnosti oksidacije OP pomoću modifikovanog AChE testa.....	93
4.2.3.2. Uticaj smeše organofosfata na aktivnost AChE u nativnom obliku.....	94
4.3. Oksidacija OP elektrohemijski generisanim Cl ₂ , Br ₂ i I ₂	96
4.3.1. Elektrohemijsko generisanje halogena na elektrodi od staklastog ugljenika.....	96
4.3.2. Oksidacija OP elektrognerisanim X ₂ (X = Cl, Br, I).....	100
4.4. Poređenje efekta oksidacije OP različitim metodama na njihovo određivanje pomoću AChE testa.....	109
4.5. Odredjivanje koncentracije OP u realnim uzorcima	111
4.6. FIA sistem za detekciju OP.....	112
4.6.1. Određivanje radnih parametara FIA sistema.....	113
4.6.2. Inhibicija imobilizovane AChE u prisustvu OP.....	116

5. ZAKLJUČAK.....	119
6. LITERATURA.....	121
7. PRILOZI.....	140
Biografija.....	143

1. UVOD

Organofosfatni pesticidi, čija je upotreba u poljoprivredi i danas široko rasprostranjena, veoma su štetni po okolinu i čoveka. Njihov toksični efekat potiče od ireverzibilne inhibicije AChE, enzima koji učestvuje u transdukciji nervnih signala. Kao inhibitori AChE, organofosfatni pesticidi su toksični za čoveka i zbog toga je razvijanje metoda za njihovu detekciju veoma važno. Organo-tiofosfati u organizmu podležu metaboličkoj oksidaciji pod dejstvom citohroma P450, što vodi formiranju odgovarajućih oksiona. Proizvodi oksidacije organo-tiofosfata su toksičniji od polaznih jedinjenja, jer su jači inhibitori AChE. Ova činjenica može se iskoristiti za poboljšanje osetljivosti AChE testa za detekciju OP, koji se zasniva na inhibiciji enzima.

Za oksidaciju organo-tiofosfata do sada su korišćena razna jedinjenja. Najviše je ispitan efekat neorganskih oksidanata, od kojih su najbolje rezultate dali NBS, brom, azotna kiselina, hlor, ozon i vodonik-peroksid. Mnogi enzimi su takođe korišćeni za oksidaciju OP, uglavnom peroksidaze, kao što su peroksidaza iz rena i hloroperoksidaza.

Polazeći od činjenice da je oksidacija OP neophodan korak u metodama za njihovu detekciju, koje se baziraju na inhibiciji AChE, ciljevi ovog rada bili su:

1. -oksidacija organofosfatnih pesticida u prisustvu mijeloperoksidaze, određivanje optimalnih uslova za oksidaciju (koncentracija H_2O_2 , vreme inkubacije, koncentracija mijeloperoksidaze, pH, temperatura) i identifikacija proizvoda oksidacije pomoću UPLC i GC/MS;
2. -elektrohemijsko generisanje hlora, broma i joda, određivanje optimalnih uslova i oksidacija organofosfata pomoću elektrognerisanih halogena, identifikacija proizvoda oksidacije pomoću UPLC, određivanje najefikasnijeg halogena za oksidaciju organofosfata;
3. -poređenje efikasnosti oksidacije organofosfata u prisustvu enzima mijeloperoksidaze i elektrognerisanih halogena, utvrđivanje prednosti i mana obe metode;

4. -primena metode za određivanje OP u realnim uzorcima;
5. -imobilizacija acetilholinesteraze i razvijanje FIA sistema za detekciju organotiofosfata uz oksidaciju kao modifikaciju metode.

2. OPŠTI DEO

2.1. Pesticidi

2.1.1. Grupe pesticida

Termin *sredstva za zaštitu bilja* obuhvata sva hemijska jedinjenja koja se koriste za kontrolisanje rasta zglavkara, mikroorganizama i korova. Ta jedinjenja služe da se obezbedi ispravan rast biljaka i minimalno moguće zalaganje odgajivača. Sveobuhvatniji termin ***pesticidi*** odnosi se na jedinjenja koja se upotrebljavaju za kontrolu štetočina svih vrsta, uključujući i one koji su direktna opasnost po zdravlje čoveka i životinja. Među štetčinama insektima značajni su oni koji prenose humane bolesti, kao što su vrste komaraca koji su prenosioci malarije, vaši koje prenose tifus, buve koje prenose kugu i različite vrste koje su nosioci meningitisa i žute groznice.

U pesticide se ubrajaju: insekticidi, fungicidi, baktericidi, herbicidi i regulatori rasta biljaka [1].

Insekticidi su grupa pesticida koja je od velikog značaja za poljoprivredu i ekonomiju. Uprkos tome što su mnogi proizvodi već dostupni, ostalo je dosta prostora za nove i bolje. Razlog tome su vrste koje su razvile rezistenciju na postojeće proizvode, naročito one koje se brzo dele i za kratko vreme proizvedu veliki broj generacija. Novorazvijeni pesticidi bi trebalo da imaju idealna svojstva, što podrazumeva prvenstveno širok spektar aktivnosti, a zatim i da budu bezbedni po sisare i ribe. Željena svojstva novih pesticida trebalo bi obezbediti po što manjoj ceni.

Relativni značaj fungicida i baktericida razlikuje se širom sveta. Promene u procesu kultivacije biljnih vrsta i uzgajanje novih vrsta dovele su do povećane učestalosti gljivičnih obolenja, zbog čega je razvoj ove grupe pesticida veoma važan.

Herbicidi važe za grupu pesticida koja se danas najviše koristi u poljoprivredi. Pored toga što značajno utiču na povećanje prinosa, herbicidi štede trud oko uzgajanja biljaka. Ovaj faktor je posebno važan u razvijenim zemljama. Herbicidi imaju i karakteristike koje su važne sa gledišta ekologije i toksikologije. Kako se najčešće primenjuju pre berbe, u momentu kada dospevaju do potrošača budu razgrađeni do ostataka koji nisu štetni. Mnogi herbicidi su selektivni inhibitori fotosinteze, koja je karakteristična za biljke, pa tako nisu toksični za sisare.

Regulatori rasta biljaka imaju specifične efekte na fiziološke procese biljaka. Oni menjaju sastav biljke, na primer, tako što povećavaju sadržaj šećera ili proteina. Takođe mogu da inhibiraju rast jedinke skraćivanjem internodusa, što dovodi do povećane fizičke stabilnosti biljke. Ostale primene regulatora rasta biljaka ogledaju se u indukovanju cvetanja, povećanju otpornosti na sušu i mraz, pospešivanje sazrevanja i suzbijanje rasta drugih ometajućih biljaka u neposrednoj okolini jedinke. Regulatori rasta biljaka služe da poboljšaju prinos i kvalitet kultura.

Razvoj novih proizvoda za zaštitu biljaka podrazumeva sintezu, biološki skrining, procenu zemljišta, toksikološka ispitivanja, metaboličke studije, ispitivanje degradacije jedinjenja, proveru bezbednosti po životnu sredinu, zaštitu patenta i proizvodnju samog proizvoda.

Svi pesticidi imaju neki uticaj na životnu sredinu čoveka. Da bi se taj uticaj doveo na prihvatljiv nivo, svi komercijalno dostupni proizvodi u većini država moraju podleći striktnim zakonskim regulativama. Pre nego što se pusti na tržište, proizvod se mora detaljno ispitati i utvrditi koliku opasnost predstavlja po čoveka i životinje.

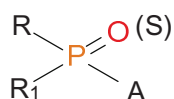
2.1.2. Organofosfatna jedinjenja

Fosfor i njegova jedinjenja danas imaju veliki značaj u mnogim oblastima nauke i tehnike. Neorganska jedinjenja fosfora imaju veliku primenu u industriji, a u poljoprivredi se koriste kao fosfatna đubriva. Organska jedinjenja fosfora se primenjuju u proizvodnji

plastičnih masa, kao reaktanti u organskoj sintezi, kao dodaci mazivima i uljima, a koriste se u velikom obimu i u zaštiti bilja. Mnoga jedinjenja se danas koriste kao insekticidi, herbicidi ili fungicidi.

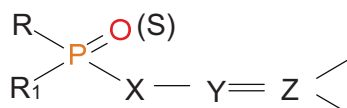
Organska jedinjenja fosfora dobijaju na značaju sa radovima nemačkog istraživača Šradera [2; 3]. Sistematski razvoj organske hemije fosfora počinje u dvadesetom veku. Sa radovima Šradera ova jedinjenja dobijaju praktičan značaj i počinje nov period industrijske proizvodnje insekticida iz grupe organskih jedinjenja fosfora [4].

Šrader i njegovi saradnici najpre su dali osnovnu strukturu za jedinjenja sa kontaktnim insekticidnim delovanjem, a ona je kasnije razvijena u strukturu čija je opšta formula:



U ovoj formuli R i R¹ su alkil-, alkoksi- ili amino- grupe, a „A“ grupa predstavlja kiselinski ostatak neorganske ili organske kiseline (Cl⁻, F⁻, SCN⁻ i CH₃COO⁻) ili neku drugu grupu (enolati, merkaptidi itd).

Prošlo je dosta vremena dok se za sva jedinjenja koja su sintetizovana prema Šraderovoj opštoj formuli dokazalo ne samo biocidno delovanje, već da se fosforilacijom objasni njihova hemijska i biohemijska aktivnost. Klark i saradnici su 1964. godine dali osnovnu strukturu za sva jedinjenja sa fosforilujućim svojstvima (Shema 2).



U formuli X, Y i Z uglavnom predstavljaju atome H, C, N, O, S i halogena. Razvoj organske hemije fosfora potvrdio je svu njenu opravdanost, jer danas, pored insekticida, ova jedinjenja nalaze primenu kao herbicidi, fungicidi, regulatori rasta biljaka, rodenticidi i kao hemosterilanti. Veoma je interesantno da se neka od organskih jedinjenja fosfora koriste kao lekovi. Među antibioticima poznat je fosfomicin, a za lečenje različitih vrsta tumora endoksan ili ciklofosfamid. Takođe se i neki jaki otrovi, kao što su paraokson i armin, koriste u lečenju glaukoma [4].

Za samo pedeset godina sintetizovano je i ispitano više od sto hiljada organskih jedinjenja fosfora sa ciljem da se primene kao pesticidi. Međutim, danas primenu nalazi samo oko 150 jedinjenja. Veoma važna karakteristika ovih jedinjenja je da pokazuju izrazito različita fizička svojstva, kao što su vrednosti napona pare i rastvorljivost u vodi. Razlikuju se i prema hemijskoj stabilnosti, a pokazuju i različitu toksičnost prema toplokrvnim životinjama.

Široki spektar fizičko-hemijskih svojstava i bioloških aktivnosti omogućava ovim supstancama različitu primenu u poljoprivredi i higijeni. Neke se koriste kao fumiganti, neke kao kontaktni otrovi, a druge kao sistematski insekticidi. Neka jedinjenja se koriste u zaštiti bilja u vreme setve, a druga mogu uspešno da se primenjuju samo u periodu žetve. Prva moraju da se odlikuju postojanošću kako bi se izbeglo sekundarno delovanje i smanjili troškovi, a druga grupa jedinjenja, koja se koriste u kasnijem periodu, treba da budu manje postojana. Na taj način se reguliše koncentracija ostataka koja mora da bude zanemarljiva u periodu žetve.

Prema Šraderu, da bi neko organsko jedinjenje fosfora bilo biološki aktivno treba da ima:

- kiseonik ili sumpor koji su vezani dvostrukom vezom za petovalentni fosfor,
- R i R₁ alkil-grupe vezane za fosfor preko kiseonika (alkoksi –OR ili ariloksi –OAr grupe), preko azota (amido grupa –NR₂) ili direktno (alkil –R i aril –Ar grupe),
- kiselinski ostatak neorganske ili organske kiseline (F⁻, CNS⁻, RCOO⁻ i dr.), kao i neke druge grupe, npr. merkpto grupa.

Sa razvojem hemije organskih jedinjenja fosfora i sintezom novih jedinjenja složenih struktura, javila se potreba da se opšta formula Šradera modifikuje i tada je A grupa zamenjena grupacijom (P)-XYZ. Da bi se ovom formulom prikazalo jedinjenje sa dobrim pesticidnim svojstvima, potrebno je da veza P-X bude što slabija, a da grupa Z bude što više elektronegativna ili da postaje elektronegativna pod uticajem protona ili redukcionih supstanci, odnosno da je u stanju da induktivnim efektom privuče elektrone veze P-X. Treći uslov je da se uvede Y atom sa sp^2 hibridizacijom [4].

Nesumnjivo da ova modifikovana Šraderova formula može da posluži za objašnjenje ponašanja novih jedinjenja i da objasni potrebu sinteze jedinjenja u kojima su radikali različita heterociklična jedinjenja. Ovim postupkom mogu da se objasne i potencijalna svojstva molekula u zavisnosti od protonacije u prisustvu rastvarača ili u prelaznom stupnju. Tako se može objasniti zavisnost strukture i biološke aktivnosti nekog molekula, jer protonacija fosforilujuće supstance igra važnu ulogu u fiziološkim procesima.

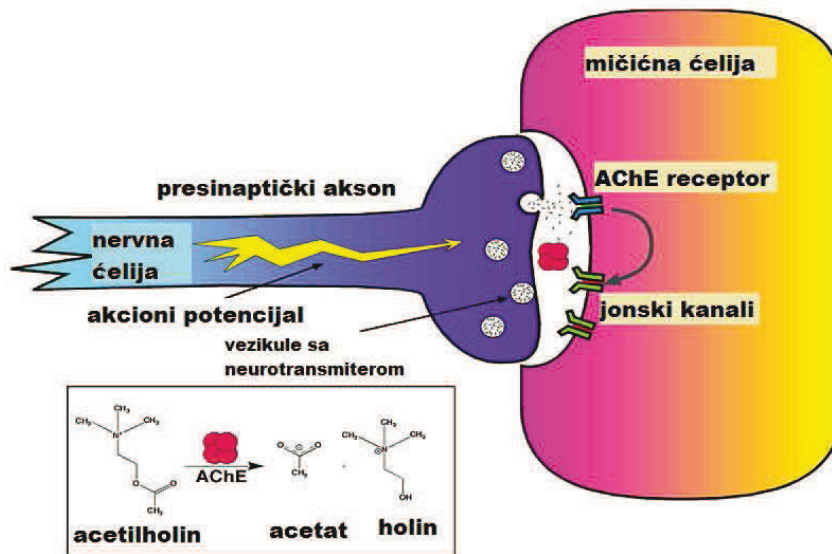
Najčešće korišćeni organofosfatni pesticidi (OP) dati su u Tabeli 1.

Tabela 1. Najčešće korišćeni OP

Uobičajeni naziv	Komercijalni naziv	Naziv po IUPAC-u
Acefat	Acephate®, Orthene®	<i>O,S</i> -dimetil-acetil-fosfoamidotioat
Azinfos-metil	Azinphos®, Guthion®	<i>O,O</i> -dimetil- <i>S</i> -[(4-okso-1,2,3-benzotriazin-3[4H]-il)metil]-fosfoditioat
Hlorpirifos	Chlorpyrifos®, Govern®	<i>O,O</i> -dietil- <i>O</i> -(3,5,6-trihlor-2-piridinil)-fosfotioat
Diazinon	Diazinon®	<i>O,O</i> -dietil- <i>O</i> -(2-izopropil-6-metil-4-pirimidinil)-fosfotioat
Dimetoat	Dimethoate®, Cygon®	<i>O,O</i> -dimetil- <i>S</i> -metilkarbamoilmetil-fosfoditioat
Disulfoton	Di-Syston®	<i>O,O</i> -dietil- <i>S</i> -[2-(etiltio)etil]-fosfoditioat
Etoprop	Mocap®	<i>O</i> -etil- <i>S,S</i> -dipropil-fosfoditioat
Fenamifos	Nemacur®	Etil-3-metil-4-(metiltio)fenil-(1-metiletil)-fosfoamidat
Malation	Fyfanon®, Malathion®	Dietil-(dimetoksitiofosforiltio)sukcinat
Metamidofos	Monitor®	<i>O,S</i> -dimetil-fosforamidotioat
Metidation	Supracide®	<i>S</i> -2,3-dihidro-5-metoksi-2-okso-1,3,4-tiazol-3-ilmetil- <i>O,O</i> -dimetil-fosfoditioat
Metil-paration	Pennacp-M®	<i>O,O</i> -dimetil- <i>O</i> -(nitrofenil)-fosfotioat
Naled	Dibrom®	1,2-dibrom-2,2-dihloretil-dimetil-fosfat
Oksidemeton-metil	MSR®	<i>S</i> -[2-(etilsulfinil)etil]- <i>O,O</i> -dimetil-fosfotioat
Forat	Phorate®, Thimet®	<i>O,O</i> -dietil- <i>S</i> -[(etiltio)metil]-fosfoditioat

2.2. Acetilholinesteraza

Acetilholinesteraza (AChE) je ključni enzim nervnog sistema životinja. Glavna biološka uloga acetilholinesteraze je okončavanje prenosa impulsa u holinergičkim sinapsama brzom hidrolizom neurotransmitera acetilholina [5] (Slika 1).



Slika 1. Hidroliza acetilholina

Komercijalno dostupne AChE se danas najčešće izoluju iz električnih organa električnih riba, pa su te izoforme i najbolje ispitane. Različite oligomerne forme ovog enzima iz električne jegulje (iz roda *Electrophorus*) i električne raže (iz roda *Torpedo*) su strukturno homologe sa AChE iz nerava i mišića kičmenjaka. Bon i saradnici [6] su pokazali da aktivna mesta AChE iz četiri različite vrste (električna jegulja, električna raža, pacov i kokoška) imaju ekvivalentnu katalitičku aktivnost po aktivnom mestu. Budući da je veoma čist preparat AChE iz električne jegulje komercijalno dostupan, oni su bili u stanju da utvrde da svaki monomer veže jedan molekul inhibitora. Susman i saradnici [7] su prvi okarakterisali trodimenzionalnu strukturu acetilholinesteraze. Oni su izučavali električni organ raže *Torpedo californica* pomoću rendgenske analize sa rezolucijom od 2.8 angstroma. Pokazalo se da molekul AChE ima oblik elipse i dimenzije 45x60x65 angstroma. Enzim je dimer, što je prikazano na Slici 2.



Slika 2. Trodimenzionalna struktura AChE iz *Torpedo californica*

Monomer enzima je α/β protein. Sastoji se od 12 β pločica okruženih sa 14 α heliksa. Prvi i poslednji par β pločica formiraju β ukosnicu (Slika 3).



Slika 3. Sekundarna struktura AChE iz *Torpedo californica*

Rane kinetičke studije indikovale su da aktivno mesto acetilholinesteraze sadrži dva takozvana pod-mesta, esterazno i anjonsko pod-mesto, što odgovara katalitičkom mestu i džepu za vezivanje holina. Esterazno mesto sadrži serin koji reaguje sa supstratom, kao i sa organofosfatima. Anjonsko pod-mesto vezuje naelektrisanu kvaternarnu grupu iz

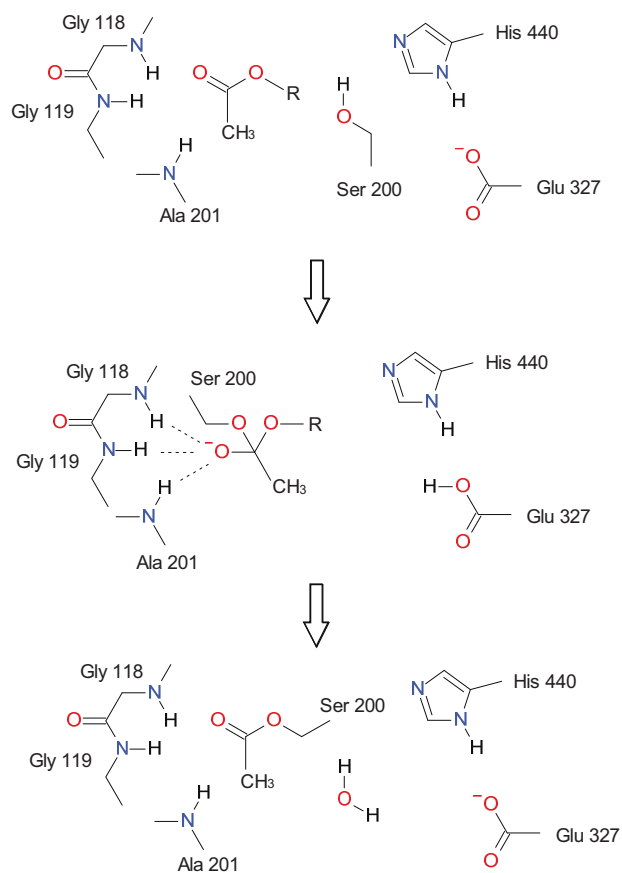
acetilholina. Supstrat prodire duboko u usko udubljenje koje vodi do aktivnog mesta enzima.

Doerti i saradnici [8] predstavili su teorijske i eksperimentalne podatke dobijene uz pomoć modela koji podržava interakcije kvaternarnog azota i π elektrona aromatičnih grupa. Prema tom modelu, doprinos aromatičnog karaktera udubljenja veoma je značajan za visok stepen vezivanja liganda. Rozenberi i saradnici predložili su „aromatično vođeno“ vezivanje supstrata [9]. Esterifikaciono mesto formiraju Ser 200, His 440 i Glu 327.

Enzimaska reakcija hidrolize acetilholina u prisustvu acetilholinesteraze odvija se u dva stupnja:

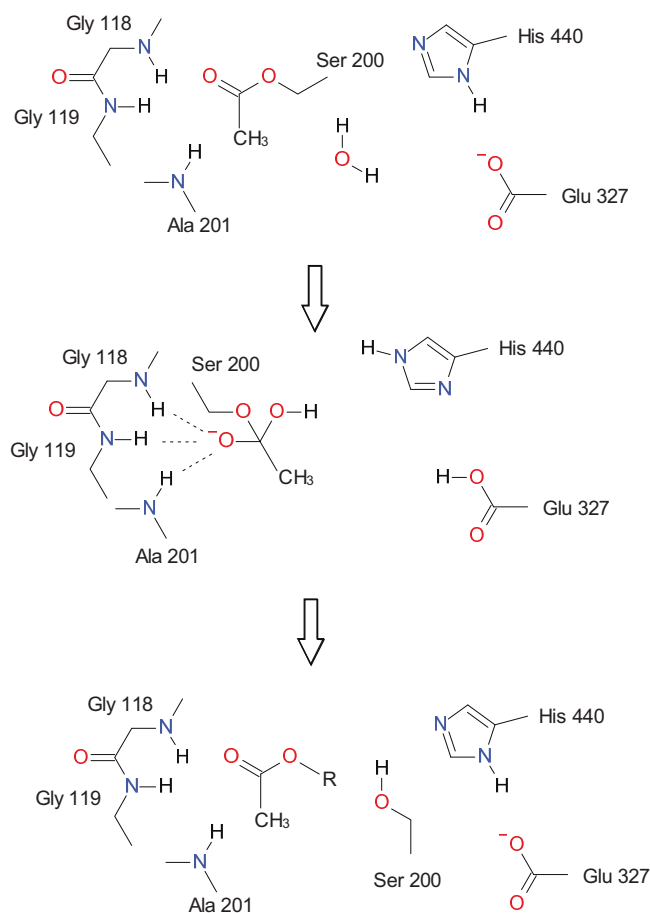
1. reakcija između acetil grupe supstrata i serinskog ostatka enzima (Slika 4a)
2. deacetilacija serinskog ostatka (Slika 4b)

Prvi korak katalize podrazumeva napad serina (Ser 200) na acetilholin. Hidroksilna grupa serina nije jak nukleofil pri fiziološkim uslovima. Reakcija počinje tako što proton iz hidroksilne grupe serina biva preuzet od strane azota imidazalnog prstena histidina (His 440). Proton vezan za azot prelazi na glutamat (Glu 327). Aktivirani serin je jak nukleofil, koji može napasti C-atom karbonilne grupe supstrata, dovodeći do stvaranja tetraedarskog prelaznog stanja. Anjon koji pri tome nastaje stabilizovan je vodoničnim vezama sa ostacima Gly 118, Gly 119 i Ala 201. Proton sa His 440 obezbeđuje formiranje holina, dok enzim ostaje acetilovan (Slika 4a).



Slika 4a. Mehanizam dejstva AChE – 1. faza, acetilovanje enzima

Jedan molekul vode interkalira se između acetil grupe i His 440. Proton iz molekula vode se prenosi na His 440, a hidroksilna grupa napada karbonilni C-atom acetilovanog intermedijera i formira se tetraedarsko prelazno stanje. Konačno, proton se premešta sa histidina na serin, a etanska kiselina se oslobađa (Slika 4b).

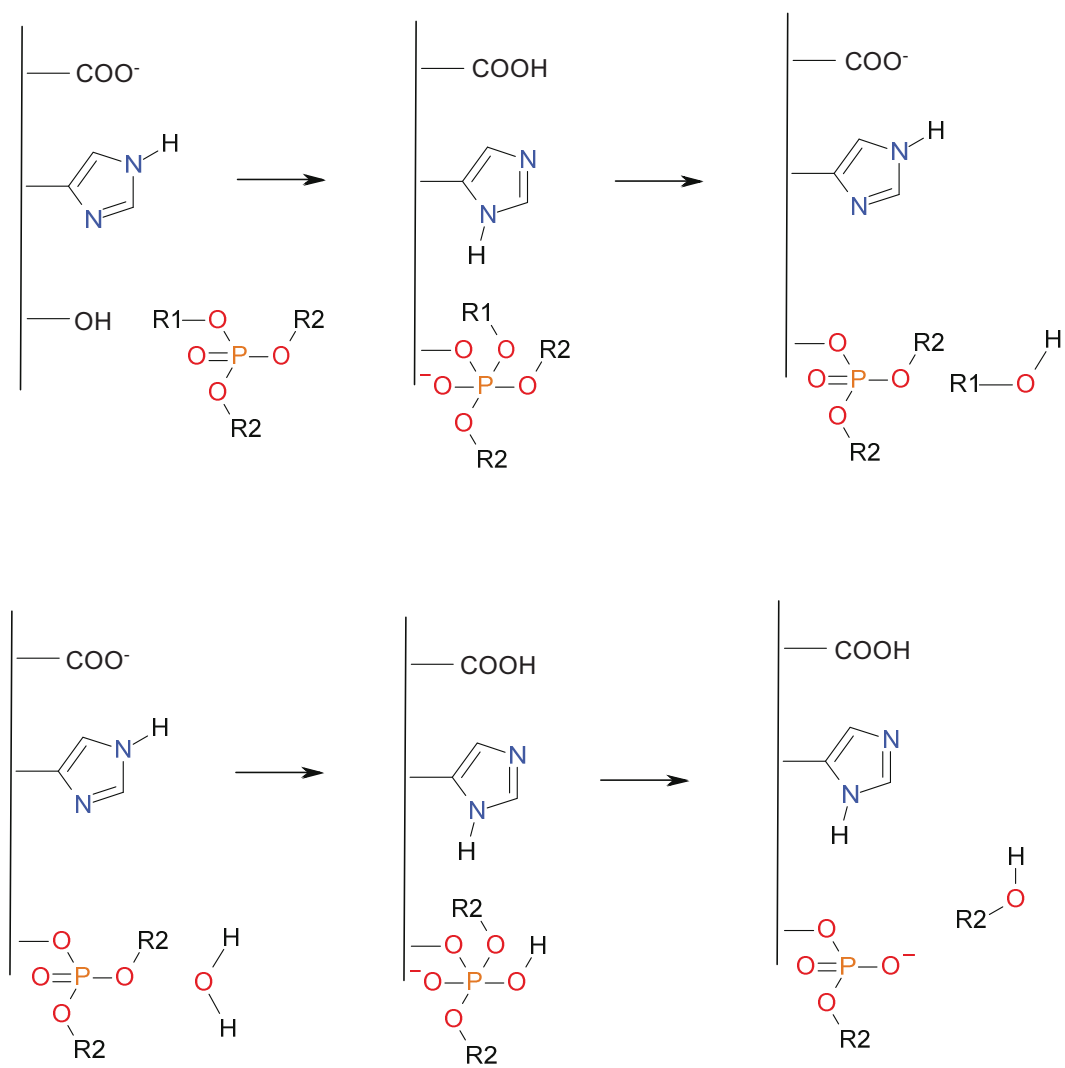


Slika 4b. Mehanizam dejstva AChE – 2. faza, deacetilovanje serinskog ostatka

2.2.1. Mehanizam inhibicije AChE sa organofosfatima

Organofosfati su ireverzibilni inhibitori acetilholinesteraze, kovalentno se vezuju za aktivno mesto enzima. Hidroksilna grupa serina reaguje sa fosfatnim estrom (Slika 5), dolazi do eliminacije alkohola uz fosforilaciju Ser 200. Posle ovog koraka, enzim je ireverzibilno inhibiran i samo pomoću piridin-2-aldoksima (2-PAM) i 1,1'-trimetilen-bis-(4-formilpiridinium-bromid)-dioksima (TMB-4) može da povрати svoju aktivnost [10].

Inhibirani enzim treba reaktivirati u roku od nekoliko minuta, jer starenjem kompleksa pesticid-enzim reaktivacija postaje nemoguća.



Slika 5. Mehanizam ireverzibilne inhibicije AChE organofosfatima

Ukoliko je AChE blokirana inhibitorima, akumulacija acetilholina uzrokuje simptome koji daju sledeću kliničku sliku:

- muskarinske manifestacije – pojačana bronhijalna sekrecija, pojačana salivacija, znojenje, bronhokonstrikcije, abdominalni grčevi, bradikardija
- nikotinske manifestacije – fascikulacija glatkih mišića, a u težim slučajevima i dijafragme i respiratornih mišića, tahikardija
- manifestacije centralnog nervnog sistema – glavobolja, vrtoglavica, uznemirenost, anksioznost, mentalna konfuzija, konvulzije, koma, depresija respiratornog centra.

U ekstremnim slučajevima, ovi simptomi mogu odvesti u smrt [5].

2.3. Detekcija organofosfatnih pesticida

Budući da se organofosfatni pesticidi često upotrebljavaju u poljoprivredi i kontoli razvoja insekata, njihova detekcija je veoma važna. Četrdesetih i pedesetih godina dvadesetog veka analitičke procedure za određivanje organofosfata bile su vremenski veoma zahtevne i komplikovane zbog ograničenja dostupnih metoda. Bilo je teško identifikovati različita jedinjenja, a kvantifikacija je bila moguća samo u slučajevima visokih koncentracija. Jedine metode izbora su bile hromatografija na papiru i različite kolorimetrijske metode.

Razvoj gasne hromatografije kao analitičke metode i razvoj mikrokulometrijskog i detektora sa zahvatom elektrona (ECD, eng. electron-capture detector) postavio je nove ciljeve i olakšao analizu halogenovanih jedinjenja. Ipak, to nije bilo dobro rešenje za jedinjenja sa elektronegativnim funkcionalnim grupama. Kasnije su se pojavili detektori za gasne hromatografe specifični za pojedinačne elemente. Kulometrijski detektor za halogenovana jedinjenja se koristio u to vreme, ali je njegov nedotatak bila nedovoljna osetljivost i robustnost za rutinske analize. Tokom vremena, razvijene su metode detekcije sa dovoljnom osetljivošću, ali je trajanje i jednostavnost izvođenja analize još uvek problem.

2.3.1. Konvencionalne metode

Razdvajanje pesticida hromatografskim metodama pre određivanja pojedinačnih komponenti je danas rutina. Gasna hromatografija (GC, eng. gas chromatography) i tečna hromatografija (LC, eng. liquid chromatography) se najčešće koriste u te svrhe [11; 12; 13; 14]. Tankoslojna hromatografija (TLC, eng. thin-layer chromatography) je nekada bila veoma popularna, ali su je nove hromatografske tehnike potpuno potisnule [15]. Ipak, zahvaljujući razvoju novih sistema za detekciju, TLC se vraća u upotrebu. U poslednje vreme i kapilarna zonska elektroforeza (CZE, eng. capillary zone electrophoresis) počela je da se koristi, budući da se pokazala kao komplementarna sa GC i LC [16].

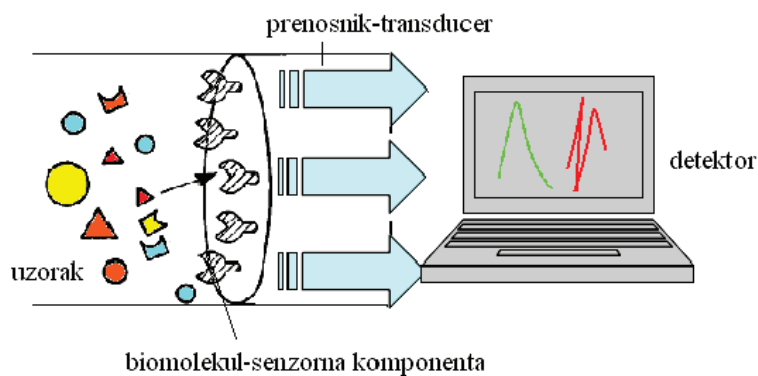
GC je dugo bila metoda izbora za razdvajanje pesticida prve generacije. Oni su bili jako hidrofobni, isparljivi i stabilni na visokim temperaturama. Problem se pojavio kada su u upotrebu ušli polarni i termolabilni pesticidi. Tada je LC dobila na značaju u ovoj oblasti. Granica detekcije ove metode je oko 1 nM [12; 13; 14]. Poseban doprinos dalo je korišćenje novih vrsta detektora, kao što su detektor sa diodnim nizom (DAD, eng. diode array detector), fluorescentni i maseni detektor.

Gasni hromatograf sa masenim spektrometrom (GC/MS) je instrument koji se u današnje vreme najčešće upotrebljava za analizu OP [12]. Razlog je mogućnost određivanja mikrogramske količine pesticida, što se postiže zahvaljujući velikoj moći razdvajanja na GC koloni i povezanosti sa masenim spektrometrom, koji ima izuzetno visoku osetljivost (0,05 nM) [14; 17]. Ipak, osetljivost nije dovoljno visoka da se dostignu granice kvantifikacije koje Komisija evropskih zajednica propisuje za pojedinačne pesticide, te je koncentrovanje uzorka uvek neophodno. Takođe, postoji jedan broj pesticida koji se i danas koriste, a nisu isparljivi i termostabilni, pa se ne mogu analizirati pomoću GC/MS [18].

Iako se konvencionalne metode svakodnevno koriste u cilju detekcije pesticida i imaju niske granice detekcije, one su zametne, skupe i komplikovane. Zato je potrebno je konstruisati sistem koji će moći brzo, pouzdano i ekonomično da analizira sve organofosfatne pesticide, po potrebi i na mestu kontaminacije.

2.3.2. Biosenzori

Termin **senzor** definiše se kao uređaj ili sistem koji odgovara na fizičke i hemijske kvantitete tako što proizvodi izlazni signal koji je mera tog kvantiteta. To su obično elektroda ili optičko vlakno, koji detektuju ili odgovaraju na specifične interakcije sa hemikalijama u okruženju. Rad **biosenzora** se zasniva na sprezanju imobilizovanog biološkog senzorskog elementa (biološki aktivna komponenta, npr. antitelo, enzim ili ćelija) sa instrumentom (fizičko-hemijskim transducerom), koji transformiše specifično prepoznavanje u električni, optički ili toplotni signal, pri čemu se rezultati dobijaju odmah [19]. Merenje ciljnog analita se postiže selektivnom transdukcijom reakcije biomolekula i analita u merljivi signal. Najvažnije osobine svakog biosenzora su visoka *specifičnost* i *osetljivost* prema ciljnom analitu, što se postiže kao rezultat optimizovanog molekuskog prepoznavanja biološki aktivne komponente i njenog prirodnog supstrata sa većim afinitetom nego pri prepoznavanju sa drugim komponentama u sistemu. Princip rada biosenzora prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Princip rada biosenzora

2.3.2.1. Biološki senzorni elementi

Biosenzori se mogu klasifikovati prema tipu aktivne biološke komponente ili prema načinu signalne transdukcije, kao i prema kombinaciji ova dva aspekta. Tip biokomponente određuje stepen selektivnosti i specifičnosti biosenzora. Biokomponente su podeljene na tri grupe: *biokatalitičke*, *bioafinitetne komponente* i *hibridni receptori*.

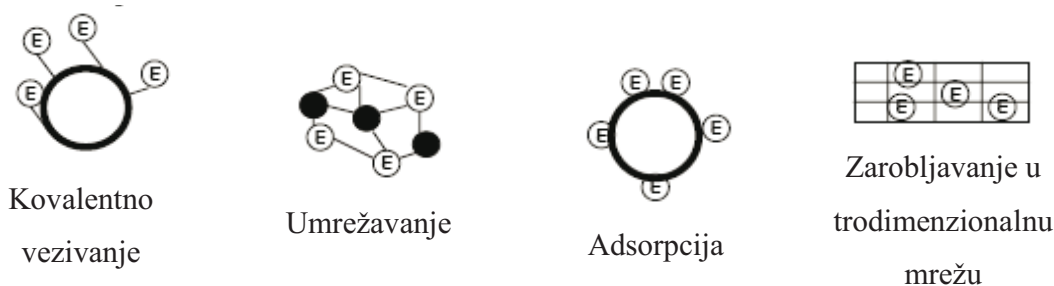
Biokatalitički elementi za prepoznavanje mogu biti sistemi koji sadrže enzime, cele ćelije (mikroorganizmi kao što su bakterije, kvasci, eukariotske ćelije), ćelijske organele ili iseći biljnog i životinjskog tkiva [20]. Prednost biosenzora koji koriste mikroorganizme, biljna ili životinjska tkiva ogleda se u činjenici da je izbegnuta naporna procedura izolovanja i prečišavanja, a da se enzim ipak koristi kao aktivna komponenta. Mikrobnii senzori su manje osetljivi na inhibiciju od strane vrsta prisutnih u uzorku, tolerantniji na varijaciju pH i temperature i generalno traju duže. S druge strane, imaju spor odgovor i nisku selektivnost u poređenju sa sensorima na bazi izolovanih enzima [21]. Enzimski senzori su najčešće korišćeni i odlikuju se visokom selektivnošću. U principu, svi enzimski senzori rade na principu imobilizacije enzimskog sistema na transducer [22].

U grupu bioafinitetnih receptora ubrajaju se hemoreceptori, antitela i nukleinske kiseline. Ova grupa biosenzora zasniva se na afinitetu između molekula, što obezbeđuje selektivne interakcije sa datim ligandom i formiranje termodinamički stabilnih kompleksa. Potencijalna široka upotreba imunosenzora rezultat je velikih mogućnosti za njihovu primenu: svako jedinjenje može biti analizirano, uz uslov da postoji specifično antitelo za njega. Pored toga, imunosenzori su vrlo specifični i selektivni za određeni antigen. Antigen-antitelo kompleksi mogu da se koriste za skoro sve tipove senzora. Fizičko-hemijske promene nastale usled vezivanja antigena i antitela ne generišu elektrohemijiski signal koji je moguće detektovati. Iz tog razloga se enzimi, fluorescentna jedinjenja, elektrohemijiski aktivne supstance, radionuklidi ili avidin-biotin kompleksi koriste za obeležavanje antigena ili antitela [23; 24]. Najčešće korišćeni transduceri u imunosenzorima su akustični ili optički sistemi [22].

Hibridni receptori, kao što su DNK i RNK probe, pokazali su obećavajuće rezultate u analizi hrane, kao i u detekciji mikroorganizama. Princip selektivne detekcije se bazira na pronalaženju jedinstvene sekvence baze nukleinske kiseline u procesu hibridizacije. Sparivanje baza na određeni način (adenin i timin, citozin i guanin) obezbeđuje da jedan jednolančani fragment može da prepozna sebi komplementaran deo i formira dvostruki lanac. DNK senzori se sastoje od dobro definisane jednolančane sekvence koja je imobilizovana na čvrstu podlogu kao biološki receptor. DNK proba se dodaje u DNK ili RNK iz nepoznatog uzorka. Ako dođe do hibridizacije probe i lanaca iz nepoznatog uzorka zbog sparivanja sekvenci koje su komplementarne, detekcija je moguća. Analitičke metode koje se zasnivaju na interakcijama sa DNK su jedine koje mogu da detektuju genetičke modifikacije. Komercijalno se koriste za detekciju patogena u hrani, kao što su *Salmonella*, *Listeria*, *E.coli* i *S. Aureus* [22; 25; 26].

2.3.2.2. Imobilizacija biokomponente

Da bi se biokomponente mogle upotrebljavati više puta, potrebno je da budu imobilizovane na neki nosač. Imobilizacija doprinosi stabilnosti komponente koja je imobilizovana u odnosu na slobodan, nativni oblik, a i uzorak je lakše odvojiti u takvom sistemu. Biokomponente mogu biti imobilizovane na nosač na razne načine: adsorpcijom, fizičkim zarobljavanjem u trodimenzionalnu mrežu, kovalentnim vezivanjem, umrežavanjem (Shema 1) [27]. Matriks može funkcionisati isključivo kao nosač biokomponente, ali takođe može biti i mediator u mehanizmu signalne transdukcije. Svrha imobilizacije je da se zadrži maksimum aktivnosti biokomponente na površini transducera. Izbor metode za imobilizaciju zavisi od prirode biokomponente, tipa transducera, fizičko-hemijskih svojstava analita i radnih uslova biosenzora [22].



Shema 1. Načini imobilizacije enzima na nosač

Adsorpcija biomolekula na nosače je najjednostavnija metoda za imobilizaciju biokomponente na transducer. Izvodi se tako što se rastvor biomolekula dovede u kontakt sa aktiviranim nosačem tokom definisanog vremenskog perioda. Potom se nevezani molekuli biokomponente uklone ispiranjem. Budući da je adsorpcija posledica Van der Valsovih veza, promena pH, jonske jačine ili temperature može dovesti do toga da se biomolekuli uklone sa nosača.

Zarobljavanjem u polimerizujuće gelove obezbeđuje se da biomolekuli ne mogu difundovati iz reakcione smeše, dok mali molekuli supstrata lako mogu da prodru do njih. Zarobljavanje u gelu je jednako blaga procedura kao adsorpcija, jer molekuli biokomponente nisu kovalentno vezani za nosač. Ovaj metod se dosta koristi, a kao gelovi se koriste kolagen, želatin, agar, polivinil-alkohol itd.

U slučaju kovalentnog vezivanja, biokomponenta biva povezana sa nosačem kovalentnim vezama. U slučaju enzima, hemijski reaktivna mesta mogu biti amino i karboksilne grupe, imidazolne grupe histidina, itd. Obično se imobilizacija izvodi u tri koraka:

1. aktivacija nosača;
2. nanošenje biomolekula na nosač;
3. uklanjanje adsorbovanih biomolekula;

Nedostatak ove metode za imobilizaciju je gubitak aktivnosti biokomponente usled kovalentnog vezivanja za nosač. Kao nosači najčešće se koriste celuloza, dekstran, i polivinil-hlorid.

Biopolimeri mogu biti međumolekulski povezani pomoću bi- ili multifunkcionalnih reagenasa. Molekuli proteina mogu se umrežiti međusobno ili sa nekim drugim funkcionalnim proteinom (npr. goveđim serum albuminom). Kao bifunkcionalni reagensi koriste se najčešće glutaraldehid, derivati bisizocijanata i bisdiazobenzidin. Prednosti umrežavanja su jednostavnost procedure i jako hemijsko vezivanje biomolekula. Mana je mogućnost gubljenja aktivnosti zbog potencijalnih promena u aktivnim mestima proteina.

2.3.2.3. Transducери

Biosenzori mogu biti klasifikovani prema tipu transducera na: elektrohemijske, optičke, termalne i piezoelektrične.

Biosenzori koji se baziraju na elektrohemijskim transducerima su ekonomični i imaju brz odgovor. Prednost je i to što postoji mogućnost automatizacije, što znači i aplikaciju velikog broja uzoraka [28]. Elektrohemijski biosenzori mogu se podeliti na: konduktometrijske, impedometrijske, potenciometrijske i amperometrijske [22].

Konduktometrijski biosenzori se baziraju na principu promene provodljivosti sredine kada mikroorganizmi prevode nenaelektrisane supstrate, kao što su ugljeni hidrati, u intermedijere koji su naelektrisani, kao što je mlečna kiselina. Količina naelektrisanog metabolita je direktno proporcionalna stepenu rasta organizma. Konduktometrijski biosenzori su najčešće nespecifični i daju loš signal, te se retko koriste [22].

Impedometrijski biosenzori se zasnivaju na principu da mikrobnim metabolizam rezultira porastom provodljivosti i kapacitivnosti, što uzrokuje smanjenje impedanse [29; 30]. Impedansa se obično meri pomoću strujnog mosta. Komercijalni analitički uređaji koji se zasnivaju na ovoj tehnologiji postoje na tržištu [22].

Potenciometrijski transducer poseduje membranu ili površinu selektivnu na određenu vrstu, koja generiše potencijal proporcionalan koncentraciji aktivne vrste, što se meri u odnosu na referentnu elektrodu [31]. Potenciometrijski uređaji mogu da mere promene u koncentraciji jona i pH. Radi se na poboljšanju granica detekcije i selektivnosti

ovih biosenzora, kao i na minijaturizaciji [32; 33; 34; 35]. Najčešće se koriste u higijensko-sanitarnoj kontroli kvaliteta proizvoda [22; 36; 37; 38; 39].

Amperometrijski biosenzori mere struju koja se javlja pri hemijskoj reakciji elektroaktivne vrste na primenjenom potencijalu, što je povezano sa njenom koncentracijom u rastvoru. Amperometrijski biosenzor je brz, osetljiviji, precizniji i tačniji od potenciometrijskog senzora, stoga što nije potrebno čekati da se uspostavi termodinamička ravnoteža i odgovor je linearna funkcija koncentracije analita. S druge strane, selektivnost amperometrijskih uređaja je određena redoks potencijalom prisutnih elektroaktivnih vrsta. Kao posledica, struja merena instrumentom može uključiti doprinose nekoliko hemijskih (elektroaktivnih) vrsta [22]. Najčešće se koriste za detekciju mikroorganizama u hrani [23; 25; 40; 41; 42].

Biosenzori sa optičkim transducerima u poslednje vreme zaokupljaju sve više pažnje, što je uslovljeno napretkom u tehnologiji optičkih vlakana i laserkoj tehnologiji. Ovi senzori su proširili granice primene spektrofotometrijskih metoda u analitičkoj hemiji, posebno za sisteme male po dimenzijama. Optički biosenzori su zasnovani na metodama merenja UV/VIS apsorpcije, bio/hemiluminescencije, fluorescencije/fosforescencije, refleksije, rasejanja i indeksa prelamanja, uzrokovanom interakcijom biokatalizatora sa ciljnim analitom. Optički senzori, prvobitno razvijeni za kiseonik, CO i određivanje pH korišćenjem kiselo-baznih indikatora [43], prošireni su za konstrukciju fluorescentnih i luminescentnih optroda. Optrode su konstruisane sa imobilisanim selektivnim biokomponentama na jednoj strani optičkog vlakna i komponentama za detekciju na drugom kraju. Promena intenziteta apsorbovane ili emitovane svetlosti od strane indikatorske boje je princip rada pH, pO₂ i pCO₂ proba na bazi optičkih vlakana koja postižu transdukciju samo posredstvom indikatorske boje. Ova promena je direktno proporcionalna količini analita prisutnoj u uzorku [22; 44; 45].

Biosenzori sa termalnim transducerima zasnivaju se na praćenju promene energije u hemijskoj reakciji koja je katalizovana pomoću enzima ili mikroorganizma tokom vremena. Deo nastale toplote uvek gubi, jer se ne mogu postići idealni adijabatski uslovi, zbog čega rezultati nisu potpuno pouzdani. Upotreba termalnih biosenzora u analizi hrane je ograničena za sada, zbog komplikovane instrumentacije. Ipak, nekoliko veoma važnih

jedinjenja u kontroli kvaliteta hrane određuje se na ovaj način: askorbinska kiselina, glukoza, laktat, galaktoza, etanol, penicilin G, cefalosporin i oksalna kiselina [46; 47; 48; 49]. Uprkos nedostatku osetljivosti, termalni biosenzori imaju prednost mogućnosti minijaturizacije i konstruisanja uređaja za simultano određivanje većeg broja jedinjenja [50; 51].

Piezoelektrični transduceri se obično koriste u imunosenzorima. Imunokomponenta se pri tome imobilizuje na površinu piezoelektričnog kristala [52]. Pri interakciji sa analitom dolazi do promene ukupne mase depozita na kristalu, zbog čega se menja njegova specifična frekvencija oscilovanja, što dalje može da se poveže sa koncentracijom analita u uzorku. Za širu primenu ovih tipova transducera još uvek postoje teškoće, jer zahtevaju kompleksnu instrumentaciju [22].

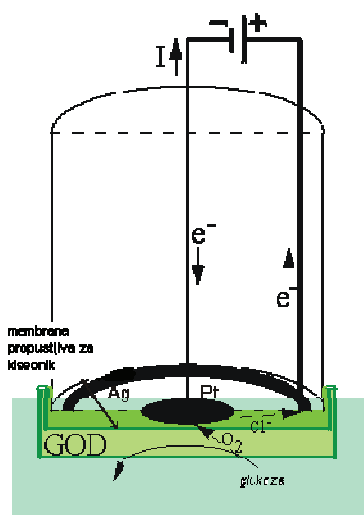
2.3.2.4. Generacije biosenzora

Ako se posmatra konstrukcija, biosenzori se mogu podeliti u tri generacije.

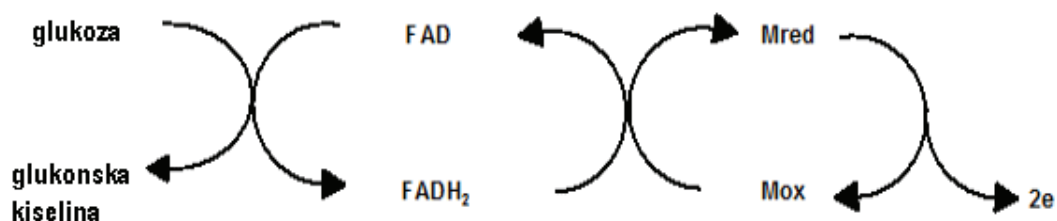
Prvoj generaciji pripadaju biosenzori zasnovani na prostom vezivanju biokomponente za membranu. Ta membrana se zatim na odgovarajući način povezuje sa transducerom, a proizvod reakcije biokomponente i ciljnog molekula difunduje do transducera i proizvodi signal. Primer za prvu generaciju biosenzora je senzor za merenje koncentracije glukoze (Slika 7). Enzim glukoza-oksidaza (GOD) je imobilizovana na poliakrilamidni gel na gas-propustljivoj membrani koja prekriva kiseoničnu elektrodu. Slični biosenzori konstruisani su i za detekciju holesterola, monoamina, laktata, oksalata, etanola itd [53].

Druga generacija biosenzora podrazumeva specifične medijatore između reakcije i transducera, u cilju poboljšanja odgovora. Primer je biosenzor za određivanje koncentracije glukoze sa ferocenom kao medijatorom (Slika 8). Oksidacija glukoze odvija se zahvaljujući FAD komponenti glukoza-oksidaze, koja se konvertuje u $FADH_2$. Potom se $FADH_2$ reoksiduje do FAD pomoću medijatora ferocena. Medijator se reoksiduje direktno na

elektrodi. Struja koja nastaje tokom ovog procesa je amperometrijska mera koncentracije glukoze [53].



Slika 7. Biosenzor za merenje koncentracije glukoze; GOD – glukoza-oksidaza;



Slika 8. Princip rada biosenzora za određivanje koncentracije glukoze sa ferocenom kao medijatorom (M)

Na kraju, u trećoj generaciji biosenzora, biokomponenta se imobilizuje direktno na transducer, što dovodi do toga da sama reakcija uzrokuje odgovor i nisu direktno uključeni ni proizvod ni medijator. Problem ovde može nastati ako je biokomponenta protein, jer se oni uglavnom denaturišu na površini elektrode. Takođe, transfer elektrona može biti spor i

ireverzibilan. Dobro rešenje problema je modifikacija površine elektrode nekim materijalom koji nije elektroaktivan i nije medijator. Taj materijal bi trebalo vodoničnim vezama da veže protein. Većina biosenzora sa elektrohemijskim transducerom koji su danas u upotrebi pripada ovoj generaciji [53].

2.3.2.5. Prednosti i ograničenja biosenzora

Biosenzori predstavljaju važnu analitičku alatku u današnje vreme. Biosenzor obezbeđuje rezultate bolje od konvencionalnih analitičkih sistema u smislu pouzdanosti, osetljivosti, reproduktivnosti, selektivnosti i specifičnosti. Takođe, biosenzor daje rezultate u realnom vremenu, jednostavan je za rukovanje, prenosiv i ekonomičan. Veoma je značajna mogućnost određivanja ciljnog analita na licu mesta, kao i njegova detekcija u kompleksnoj smeši uz minimalnu pripremu uzorka. Mogućnost uporedog određivanja bioloških efekata (toksičnost, efekat na endokrini sistem) ciljnog analita predstavlja informaciju od velikog značaja.

Postojeća generacija biosenzora ima nekoliko ograničenja, koja se moraju prevazići:

- osetljivost se mora poboljšati;
- specifičnost zavisi od antitela, enzima i mikrobne ćelije, pa treba pažljivo odabrati ono što će se koristiti shodno tome da li senzor služi za skrining ili identifikaciju specifičnog analita;
- vreme odgovora se mora skratiti;

2.3.2.6. Primena biosenzora

Biosenzori se primenjuju u mnogim sektorima, uključujući kontrolu bioprocasa i zaštitu životne sredine, kontrolu kvaliteta hrane, poljoprivredu, vojnu industriju, medicinu, farmaciju i slično.

Najpoznatiji primer komercijalnog biosenzora je biosenzor za određivanje nivoa glukoze u krvi. Princip rada ovog biosenzora zasniva se na korišćenju enzima glukoza oksidaze imobilizovanog na elektrodu. Glukoza-oksidaza katalizuje oksidaciju glukoze, pri čemu se dva elektrona prenose na FAD (koji je deo enzima), koji se redukuje do FADH₂. U sledećem koraku elektroni prelaze na elektrodu. Struja koja se pri ovom procesu javlja je mera koncentracije glukoze. U ovom slučaju elektroda je transducer, a enzim je biološka senzorna komponenta [18].

Pored ovog primera, biosenzori se koriste u medicini za određivanje raznih analita. Klasične procedure za određivanje različitih parametara traju po nekoliko dana, što je u slučajevima pacijenata sa intenzivne nege, čije se stanje menja iz minuta u minut, beskorisno. Takođe, dijabetičarima je potrebna brza analiza nivoa glukoze u krvi. Tako danas postoje biosenzori za određivanje glukoze koje pacijenti koriste kod kuće [54].

Biotehnološka industrija se sve više razvija i zahteva analitičko praćenje procesa, koje se potencijalno može postići pomoću biosenzora. To je posebno značajno za dve oblasti: praćenje aktivne komponente i proizvoda biotehnološkog procesa i analiza polutanata i mikrobiološkog zagađenja. Biosenzori su veoma selektivni zahvaljujući svojim enzimskim ili imunološkim komponentama i imaju sposobnost da iz kompleksne smeše molekula izdvoje ciljni analit [54].

Otkriće novih lekova je dugotrajno i naporno. Biosenzori predstavljaju mogućnost da se taj proces značajno ubrza. U farmaceutskoj industriji biosenzori se koriste da detektuju interakcije između ciljnog molekula i potencijalnog leka bez korišćenja markera ili praćenja promene boje ili fluorescencije. Biosenzori mogu brzo da izmere koliko dobro se potencijalni lek vezuje za ciljni analit. Prednost je i to što uzorci ne moraju biti prečišćeni. Primer koji ilustruje koliko biosenzori mogu ubrzati ispitivanje potencijalnih novih lekova

je antidepresiv Prozak, koji je na tržište dospio tek posle 15 godina testiranja, dok je sličan lek novije generacije doživeo isto posle samo dve godine ispitivanja pomoću biosenzora [55].

Analiza hrane neophodna je da bi se zadovoljio širok spektar zahteva u industriji. Potreba za ovim postoji da bi se postigli kvalitet i bezbednost hrane, kao i da se osigura usklađenost sa propisima. Istraživači konstantno definišu razne indekse vezane za karakteristike hrane, koji mogu da ukažu na njen kvalitet i bezbednost [56]. Najčešće se određuju: alkohol u vinima, glukoza u šećerima i sirupima, biogeni amini kao indikatori za svežinu hrane, penicilin u mleku, kontaminanti kao što su pesticidi, toksini i mikrobi, vodonik-peroksid i sulfiti kao konzervativi u raznim prehrambenim proizvodima, kao što je zamrznuto povrće itd. Tabela 2. daje primere razvijenih biosenzora za analizu hrane [57].

Tabela 2. Primeri razvijenih biosenzora za analizu hrane (Amp. – amperometrijski, Pot. – potencimetrijski transducer)

<i>Analit</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Biokomponenta</i>	<i>Transducer</i>	<i>Granica detekcije</i>
Fruktoza	Med, sok i kola	D-fruktoza-dehidrogenaza	Amp.	0,5-15 mM [58]
Laktoza	Hrana	B-galaktozidaza, laktozim, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pot.	— [59]
Etanol	Alkoholna pića	Alkohol-dehidrogenaza i NaDH-oksidaža	Amp.	$3 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ M [60]
Polifenoli	Maslinovo ulje	Tirozinaza	Amp	0,3-30 μ M [61]
L-amino kiseline	Sintetički uzorci	L-aminokiselina-oksidaža i peroksidaža iz rena	Amp.	— [62]
Sulfit	Vino	Sulfit-oksidaža	Amp	0,002-0,3 mM [63]
Bakterije	Hrana	Anti E. Coli i anti-salmonela antitela	Amp.	50-200 ćelija/L [64]
Pesticidi	Mleko	Holinesteraza	Amp.	10^{-11} - 10^{-7} M [65]
Pesticidi	Povrće	Acetilholiesteraza i butirilholiesteraza	Amp.	$5 \cdot 10^{-5}$ -50 mg/kg [66]

Postoji veliki potencijal za rutinsku i kontinualnu analizu prisustva nečistoća i polutanata u vodi, zemljištu i vazduhu. Broj potencijalnih analita je ogroman, a osnovni parametri koji se prate su pH, provodljivost, razni neorganski joni i organske supstance kao što su fenoli, urea, pesticidi. Za ispitivanje sadržaja toksičnih supstanci u vodi i zemljištu najčešće se koriste celi organizmi. Većina biosenzora koji se upotrebljavaju u zaštiti životne sredine fokusirani su na bakterijske sisteme, dok su biosenzori sa eukariotskim ćelijama retki. Još ređi su oni koji sadrže ćelije sisara, iako one mogu dati bolji i za čoveka relevantniji odgovor u poređenju sa bakterijama [67].

Veliki problem predstavlja učestala upotreba pesticida u poljoprivredi, što je rezultiralo njihovim obilnim prisustvom u prirodnim vodama. Iako konvencionalne tehnike poput HPLC/MS i GC/MS daju zadovoljavajuće analitičke rezultate pri određivanju pesticida, razvijaju se novi eseji i biosenzori za brže i jeftinije analize na licu mesta. Enzimski biosenzori, zasnovani na inhibiciji određenog enzima, najčešće se primenjuju za određivanje ovih jedinjenja [67]. U Tabeli 3. nalaze se biosenzori koji se koriste u zaštiti životne sredine.

Tabela 3. Primeri biosenzora koji se koriste u zaštiti životne sredine

<i>Transducer</i>	<i>Senzorni element</i>	<i>Analit</i>	<i>Karakteristike</i>	<i>Matriks</i>
Elektrohemijski (amperometrijski)	Antitela	Atrazin	LD: 1 µg/L [68]	-
Optički	Antitela	Simazin	LD: 0,2 µg/L [69]	Prirodne, podzemne vode
Optički	Antitela	Pesticidi i estroni	[70]	Rečna voda
Elektrohemijski	Antitela	Surfaktanti	LD: µg/L opseg [71]	-
Elektrohemijski (amperometrijski)	Antitela	Estradiol	LD: 1 ng/L [72]	-
Elektrohemijski (amperometrijski)	Antitela	<i>Escherichia coli</i>	10 ćelija/mL [73]	Pijaća voda
Optički	Antitela	<i>Salmonella enterditiis</i> , <i>Lysteria monocitogenes</i>	10 ⁶ ćelija/mL [74]	-

Vojna industrija takođe ima veliki interes za prenosive senzore, zbog detekcije hemijskog oružja, kao što su npr. nervni gasovi [54]. Tehnologija biosenzora se koristi i u mornarici. Senzor koji je od nedavno u upotrebi, napravljen od provodljivih polimera (sastojci donjeg veša), može dati podatke o tome da li vojnik krvari i da li je eventualna povreda nastala na veni ili arteriji. Takođe, postoje i minijaturni kompjuteri koje vojnik može progutati, a koji daju informacije o njegovom zdravstvenom stanju i nivou stresa.

Tehnologija biosenzora upotrebljava se i za testiranje zloupotrebe narkotika u policiji, zatvorima, na graničnim prelazima, ali i u sportu (doping kontrola). Takođe se sve više koristi i za detekciju eksploziva.

Uprkos velikom broju biosenzora koji se trenutno razvijaju i bogatoj literaturi na ovu temu, malo sistema je još uvek praktično prihvatljivo za tržište (Tabela 4).

Tabela 4. Komercijalni biosenzori

<i>Instrument</i>	<i>Biološki element</i>	<i>Transducer</i>	<i>Kompanija</i>
BIACORE	Biomolekulska interakcija	Optički	Biacore AB [75]
IBIS	Biomolekulska interakcija	Optički	Windsor Scientific, Ltd. [76]
SPR-CELLIA	Cele ćelije, makromolekuli	Optički	Nippon Laser and Electronics Lab
REMEDIOS	Cele ćelije	Optički (bioluminiscencija)	Remedios
Cellsence	<i>E. coli</i>	Elektrohemijski (amperometrijski)	Euroclon, Ltd. [77]
ToxSen™	Biomolekulska interakcija	Elektrohemijski	Abtech Scientific, Ltd. [76]
PZ106 Immunobiosenzor system	Antitela	piezoelektrični	Universal Sensors

2.3.2.7. Biosenzori za detekciju organofosfatnih pesticida

Najviše istraživanja urađeno je na polju razvoja biosenzora za detekciju organofosfatnih pesticida. Značajne su interakcije organofosfata sa specifičnim biomolekulima, gde OP mogu biti supstrati (npr. za organofosfat-hidrolazu - OPH), inhibitori biomolekula (npr. acetilholinesteraze) ili antigeni [78].

Mehanizam inhibicije AChE pomoću organofosfata je veoma specifičan, što je dovelo do razvoja nekoliko analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju pesticida. Holinesteraza kao biokomponenta potiče iz različitih vrsta (AChE iz električne jegulje, goveđih eritrocita, humanih eritrocita ili butirilholinesteraza - BChE - iz konjskog i humanog seruma) [66]. Ovi biosenzori mere enzimsku inhibiciju *in vitro*, a ona se može ekstrapolirati na *in vivo* inhibiciju.

Pokazano je da jedan enzim može biti meta većeg broja toksičnih jedinjenja sa različitom inhibitornom moći [79]. Tako biosenzori koji se zasnivaju na inhibiciji AChE mere sumu toksičnih efekata svih pesticida u uzorku, ali ne mere njihovu ukupnu ni pojedinačnu koncentraciju [80]. U kombinaciji sa raznim transducerima, kao što su potenciometrijski [81; 82; 83; 84; 85; 86; 87], amperometrijski [88; 89; 90; 91; 92; 93], optički [94; 95; 96], piezoelektrični [97] i konduktometrijski [98], oni daju zadovoljavajuće rezultate. U Tabeli 5. su navedeni neki od tih biosenzora.

Tabela 5. Neki biosenzori za detekciju OP zasnovani na inhibiciji holinesteraza

<i>Detekcija</i>	<i>Enzim</i>	<i>Supstrat</i>	<i>Vreme inkubacije</i>	<i>Granica detekcije</i>	<i>Referenca</i>
Amperometrijska Pt//Ag/AgCl	AChE	ASChCl	30 min	4 ng/ml	[80]
Amperometrijska Pt//Ag/AgCl	AChE + BChE	ASChI, BuSChI	10 min	0.1 ng/ml	[66]
Amperometrijska Pt//Ag/AgCl	AChE	PAPA	0 min	20 ng/ml	[89]
Amperometrijska H ₂ O ₂ - senzor	AChE + ChO	ACh	30 min	3 ng/ml	[99]
Amperometrijska Pt//Ag/AgCl	AChE + ChO	ASCh	1 min	27 ng/ml	[93]
Potenciometrijska pH - elektroda	AChE	ACh	0 min	25 ng/ml	[85]
Konduktometrijska	AChE, BChE	AChCl, BuChCl	10 min	275 ng/ml	[97]
Spektrofotometrijska	AChE	ASChCl+DTNB	10 min	3 ng/ml	[92]
Hemiluminiscentna	AChE + ChO	ACh+luminol	30 min	0.75 ng/ml	[94]

ASChCl – acetiltioholin-hlorid; ASChI – acetiltioholin-jodid; BuSChI – butiriltioholin-jodid; AChCl – acetilholin-hlorid; BuChCl – butirilholin-hlorid;

Najčešće korišćeni optički transduceri su spektrofotometrijski i fluorimetrijski. Ipak, spektrofotometrija često nije dovoljno osjetljiva da bi se detektovali pesticidi u koncentracijama u kojima se nalaze u realnim uzorcima (npr. voda za piće, povrće, voće, zemljište). Zbog toga je potrebno primeniti osjetljivije tehnike za merenje apsorbancije produkta reakcije između AChE i supstrata. Sa druge strane, fluorimetrija je veoma osjetljiva metoda, ali zahteva supstrate koji daju fluorescentne proizvode. Nedavno su optičke metode poboljšane korišćenjem lasera [18]. Uprkos tome, najveći broj biosenzora baziranih na inhibiciji AChE ima elektrohemijski transducer. Uglavnom su to amperometrijski i potenciometrijski transduceri. Među amperometrijskim, transduceri koji se zasnivaju na praćenju H_2O_2 pokazuju veću osjetljivost nego oni sa detekcijom potrošnje kiseonika. Sa druge strane, potenciometrijski uređaji su najjednostavniji za konstruisanje i korišćenje.

Kao što se iz do sada navedenog vidi, biosenzori bazirani na inhibiciji AChE aktivno su istraživani u poslednjih dvadeset godina. Iako osjetljivi i korisni kao jednokratni senzori za praćenje zagađivača u životnoj sredini, ovi biosenzori imaju neka ograničenja. Kao prvo, oni imaju dugotrajne i zamorne protokole koji zahtevaju dugu inkubaciju sa inhibitivima pre analize, kako bi se obezbedila dobra osjetljivost. Takođe, potrebna je i inkubacija sa 2-PAM da bi se aktivnost AChE povratila posle inhibicije sa OP [89; 98; 99]. Drugo, AChE može biti, kao što je već pomenuto, inhibirana raznim neurotoksinima, što podrazumeva veliki broj OP, ali i karbamate i mnoga druga jedinjenja. To je razlog zašto ovakvi biosenzori nisu selektivni i ne mogu biti upotrebljeni za kvantifikaciju pojedinačnih pesticida.

OPH je enzim koji hidrolizuje širok spektar organofosfatnih estara, pesticida kao što su paration, kumafos i acefat, kao i hemijskih agenasa somana, sarina, tabuna i drugih [100; 101; 102; 103]. Hidrolizom svakog molekula ovih jedinjenja oslobađaju se protoni, a na korelaciji broja protona i koncentracije molekula zasnivaju se potenciometrijska merenja. Na taj način obezbeđuju se jednostavnija, direktnija i brža merenja samo pesticida koji su po strukturi organofosfati (nasuprot AChE biosenzorima, koji ne razlikuju klase pesticida). Pri tome, biosenzori koji se zasnivaju na OPH potencijalno bi mogli služiti za

kvantifikaciju pojedinačnih OP kada bi se koristili kao detektor u konjukciji sa HPLC sistemom za hromatografsko razdvajanje [104; 105].

2.4. Oksidacija organofosfatnih pesticida

U realnim uzorcima organofosfatni pesticidi se nalaze u tio-obliku i u izuzetno niskim koncentracijama, najčešće reda veličine ppb, a vrlo retko ppm. Budući da su okso-oblici organofosfata znatno jači inhibitori AChE od tio-oblika, oksidacijom OP se granica detekcije neke metode može spustiti i za tri reda veličine. Zato je oksidacija organotiofosfatnih pesticida neophodan korak u analizama [80].

2.4.1. Oksidacija organofosfatnih pesticida neorganskim supstancama

Pesticidi su do sada najčešće oksidovani neorganskim jedinjenjima. Kumaran i saradnici [106] su proučavali povećanje efekta inhibicije AChE bromnom vodom dodavanjem u sintetičku morsku vodu sa pesticidima. Tri godine kasnije [107] predložili su metodu za skrining organofosfatnih pesticida u zemljištu. Pesticidi su najpre ekstrahovani organskim rastvaračima, koji su potom uparavani, a ostatak je rastvaran u acetonitrilu u koji je dodata bromna voda, kako bi se povećala osetljivost biosenzora. Određena je inhibitorna moć i pogodna koncentracija bromne vode. Slično tome, Kim [108] i Li [109] su razvili pogodnu metodu za veoma brzu oksidaciju devet organofosfata pomoću broma rastvorenog u acetonitrilu. Veliki procenat polaznih jedinjenja na taj način preveden je u okso-oblike, čak 82-100%. Pare broma su takođe korišćene za oksidaciju parationa [110].

N-bromsukcinimid (NBS) je privukao pažnju kao jedinjenje koje tio-oblike organofosfata brzo i specifično konvertuje u okso-oblike. Hercšprung i saradnici (1990) su predstavili metodu koja sa 100% efikasnosti prevodi pet odabranih organotiofosfata u

okso-oblike u vodenim uzorcima. Finalna koncentracija NBS podešena je tako da ne dovodi do inhibicije AChE. Pomoću ove metode, koja uključuje i prekoncentraciju uzorka u jednom koraku, mogu se odrediti i pesticidi koncentracije 0,1 ppb [111]. Još dve istraživačke grupe postigle su bolju osetljivost biosenzora za detekciju organofosfata korišćenjem NBS. Za tri ispitivana pesticida, hlörpirifos, fenitrothion i paration, inhibicija AChE sa oksidovanim uzorkom bila je pet puta veća u odnosu na neoksidovani [11; 80]. Prvu oksidaciju realnih uzoraka izveo je Šulc sa svojim saradnicima 2002. godine. Oni su optimizovali uslove za detekciju pesticida u sokovima u prisustvu NBS kao sredstva za oksidaciju [112].

Brom i NBS su, do skoro, bili jedini oksidanti korišćeni za povećanje osetljivosti metoda za detekciju organofosfata. Vremenom su se razvile mnoge metode za oksidaciju organo-tiofosfata, ali njihov cilj je uglavnom bio samo sinteza okso-oblika. Oksidacije su se najčešće izvodile u organskim rastvaračima i pod drastičnim eksperimentalnim uslovima [113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126]. Oksidacija pri takvim uslovima ne može biti upotrebljena u detekciji organofosfatnih pesticida, osim ako se ne uvedu neke modifikacije procedura.

2.4.2. Oksidacija organofosfatnih pesticida pomoću enzima

Poslednjih godina za oksidaciju organofosfatnih pesticida dosta su korišćeni i enzimi. Četiri hemoproteina, hlörperoksidaza, lignin-peroksidaza, peroksidaza iz rena i citohrom *c*, upotrebljeni su za oksidaciju 10 različitih organofosfata (azinfos-metil, hlörpirifos, dihlörfention, dimetoat, paration, fosmet, terbufos, trihlörfon, fosfamidon i DEF - S,S,S-tributilfosforotritionat). Od četiri enzima, samo je hlörperoksidaza bila u stanju da oksiduje 7 od 10 pesticida. Trihlörfon, fosfamidon i DEF nisu reagovali sa hlörperoksidazom. Ovaj podatak nije iznenađujući, budući da su sva 3 navedena jedinjenja u okso-obliku i već poseduju atom kiseonika u fosfatnoj grupi. Preostala 3 enzima nisu pod datim eksperimentalnim uslovima oksidovala nijedan od ispitivanih pesticida. U uzorcima

oksidovanim u prisustvu hloroperoksidaze nisu pronađeni proizvodi hidrolize, kao ni proizvodi halogenovanja [127]. Drugi autori pokazali su da peroksidaza iz rena može da oksiduje paration *in vitro*, ali u malom procentu, dok se veći deo hidrolizuje [128]. I citohrom P450 korišćen je za oksidaciju hlorspirifosa i parationa u cilju njihove detekcije. Dobijeni rezultati bili su znatno bolji u odnosu na oksidaciju pomoću NBS. To je posebno došlo do izražaja u slučaju realnih uzoraka, gde čak ni mnogo veće količine NBS od inače primenjivanih nisu dale zadovoljavajuće rezultate [129]. Svi ovi rezultati upućuju na to da se i neke druge peroksidaze mogu upotrebiti za oksidaciju organo-tiofosfata.

2.4.3. Elektrohemijaska oksidacija organofosfatnih pesticida

U literaturi se pod elektrohemijaskom oksidacijom organo-tiofosfata najčešće podrazumeva njihov tretman u cilju razgradnje i prevođenja u netoksične oblike, u idealnom slučaju njihova potpuna oksidacija do različitih mineralnih formi [130; 131; 132; 133; 134; 135]. Procedure za elektrohemijasku oksidaciju pesticida se najčešće zasnivaju na elektrohemijaskom generisanju visoko reaktivnih radikalskih vrsta na anodama sa visokim nadnaponom za razlaganje vode (obično anode tipa Ti/TiO₂ ili nerđajući čelik), pri čemu nastaju OH•, O• i ClOH [136]. Ove kratkoživeće vrste brzo oksiduju organo-tiofosfate (direktna oksidacija) ili prelaze u druge oksidanse koji se dele na primarne (Cl₂, O₂) i sekundarne (ClO₂, O₃, H₂O₂) koji imaju znatno duže polu-vreme života i mogu da difunduju od anode pri čemu se proces oksidacije nastavlja (sekundarna oksidacija) [137; 138]. U literaturi takođe postoje podaci o elektrohemijaskom tretmanu organo-tiofosfata elektro-Fentonovom reakcijom [139; 140; 141; 142]. Pri pomenutom postupku elektrohemijaski se generiše Fe²⁺ jon koji u kiseljoj sredini reaguje sa H₂O₂ dajući OH• radikal koji reaguje sa organo-tiofosfatima uklanjajući ih iz rastvora.

Pored elektrohemijaskog uklanjanja pesticida iz rastvora, elektrohemijaski tretman se može iskoristiti i za oksidaciju pesticida u cilju snižavanja njihove granice detekcije. Evtugin i saradnici [143] su predložili metod elektrohemijanske „aktivacije“ uzorka. Autori su

demonstrirali da u slučaju elektrolitičkog tretmana sintetičkog rastvora diazinona u 0,1 M NaCl dolazi do spuštanja granice detekcije za tri reda veličine. Korišćene su elektrode od staklastog ugljenika, dok je elektroliza trajala 7 do 15 minuta pri gustinama struja od 1,5 do 2 mA cm⁻². Prema autorima, u toku elektrolize generiše se Cl₂ koji oksiduje diazinon, dok snižavanje granice detekcije navodi na zaključak da u ovom slučaju dolazi do prevođenja diazinona iz tio- u okso- oblik, slično hemijskoj oksidaciji bromom [108; 109], iako autori nisu eksplicitno identifikovali proizvode nakon elektrohemijske aktivacije.

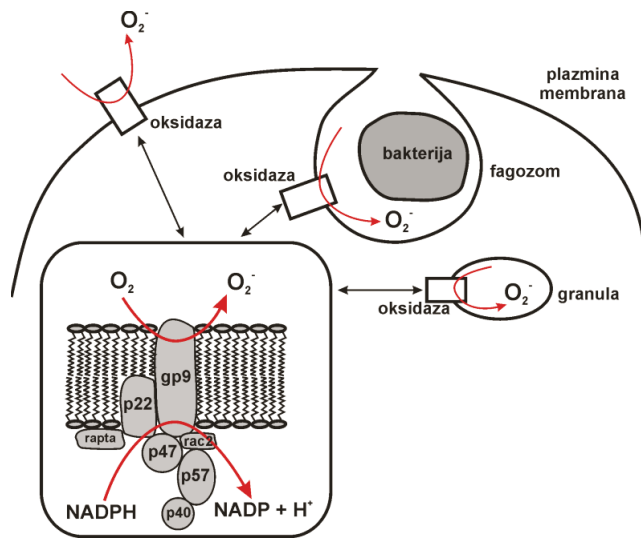
Važno je napraviti paralelu između elektrohemijskog tretmana rastvora pesticida u cilju njihove degradacije i elektrohemijskog tretmana u cilju snižavanja granice detekcije. Naime, u drugom slučaju jedini proizvod od interesa je okso- forma pesticida čija je dalja degradacija nepovoljna. Za razliku od elektrohemijskih tretmana koji za cilj imaju degradaciju pesticida, Evtugin i saradnici su za elektrohemijski tretman koristili elektrode od staklastog ugljenika, materijala koji pruža širok interval potencijala u kome nema reakcija na površini u odsustvu elektroaktivnih vrsta. Na taj način omogućeno je direktno formiranje Cl₂ iz NaCl, a ne izuzetno reaktivnih OH•, O• i ClOH, što je sprečilo intenzivnu oksidaciju diazinona, i prema prikazanim rezultatima, selektivno prevodjenje u okso- formu, što je ranije potvrđeno za slučaj hemijske oksidacije bromom [108; 109].

2.5. Mijeloperoksidaza

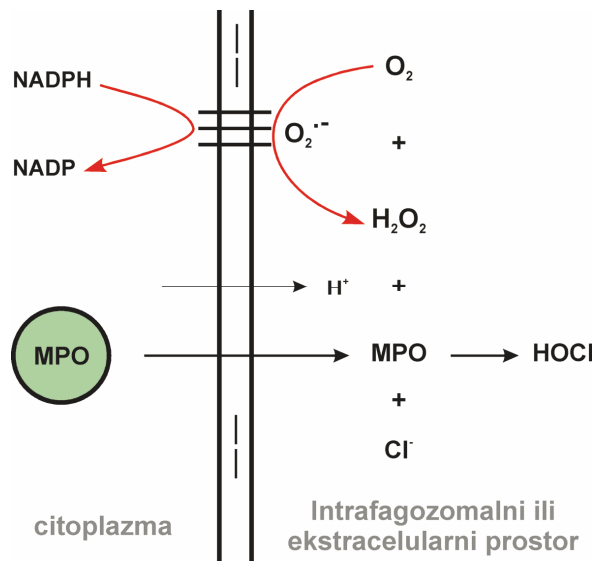
Mijeloperoksidaza (MPO, EC 1.11.1.7) je najzastupljeniji enzim u neutrofilima (od 1 % do 5 % suve mase ćelije) [144; 145], a ima ga i u monocitima. Neutrofilnu peroksidazu prvi je prečistio Agner 1941. godine i zbog njene intenzivne zelene boje nazvao je verdoperoksidaza [144]. Dalja istraživanja tkivne distribucije enzima pokazala su da je prisutan samo u mijeloidnim ćelijama, pa je njegovo ime promenjeno u mijeloperoksidaza. MPO se sintetizuje i pakuje u azurofilne (primarne) granule neutrofila tokom promijelocitne faze razvića granulocita i prisutna je u zrelih granulocitima u mirovanju [146]. Monociti takođe sadrže MPO pozitivne citoplazmatične granule, iako ih je mnogo

manje nego u neutrofilima [147]. Ove peroksidazne granule se gube sazrevanjem monocita u makrofage, iako je prisustvo MPO u makrofagima uočeno u određenim patološkim stanjima [148; 149]. Uloga MPO kao komponente antimikrobnog sistema neutrofila predložena je 1967. godine, kada je uočeno da ovaj enzim ima jako antimikrobno dejstvo u prisustvu H_2O_2 i jona halogena [150; 151; 152].

Neutrofili pripadaju grupi profesionalnih fagocita kod ljudi. Oni ingestuju bakterije u intraćelijske odeljke nazvane fagozomi, u koje upućuju različite citotoksične agense. Kada fagocituju, neutrofili podležu prasku potrošnje kiseonika, „respiratornom prasku“, izazvanom NADPH-oksidadnim kompleksom, koji se agregira na fagozomalnoj membrani (Slika 9) [153; 154]. Ovaj oksidadni sistem transportuje elektrone sa NADPH na citoplazmatsku stranu membrane, na kiseonik u ekstracelularnoj i intrafagozomalnoj tečnosti, gde se prvo formira superoksid-anjon, a onda i druge reaktivne vrste kiseonika [155]. NADPH-oksidadza združena sa H^+ -kanalom dovodi do efluksa H^+ -jona [156; 157]. Superoksid-anjon je uglavnom redukujuće sredstvo, ali može da se ponaša i kao oksidujuće sredstvo. Kada njegova dva molekula interaguju, jedan se oksiduje, a drugi redukuje, u dismutaznoj reakciji u kojoj nastaju kiseonik i H_2O_2 . Ovo se može desiti spontano, pogotovo na kiselim pH, ili može biti katalizovano superoksid-dismutazom (SOD). Veći deo kiseonika koji se potroši u respiratornom prasku pređe u H_2O_2 . Ovako nastali H_2O_2 je oksidant sa citotoksičnim svojstvima. Ipak, najveći deo nastalog H_2O_2 iskoristi MPO u reakciji sa hloridom, pri čemu nastaje hipohlorna kiselina (HOCl), čime se toksičnost H_2O_2 prenosi na hipohlornu kiselinu (Slika 10) [156]. U zavisnosti od relativnih koncentracija donora, enzim ulazi ili u ciklus halogenovanja (hlorinujuća aktivnost) ili peroksidacije (peroksidazna aktivnost) [158; 159]. Fiziološki supstrat mijeloperoksidaze su hloridi [150].



Slika 9. Moguća mesta formiranja NADPH-oksidadnog kompleksa i njegova aktivnost u humanim neutrofilima



Slika 10. MPO/H₂O₂/hlorid antimikrobni sistem. NADPH, redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat; O₂⁻, superoksid-anjon; HOCl, hipohlorna kiselina

2.5.1. Reakcioni mehanizam mijeloperoksidaze

MPO u reakciji sa proizvodima koji nastaju tokom respiratornog praska fagocitoze, kao i mnogim drugim supstratima, formira tri kompleksa: jedinjenje I, II i III, različitih spektralnih karakteristika. Feri ili nativna MPO (Fe (III)) reaguje sa H_2O_2 i formira jedinjenje I, koje sadrži dva oksidujuća ekvivalenta više nego nativni enzim (Shema 2, reakcija 1). Jedinjenje I je oksogvožđe (IV) $[Fe(IV)=O]$, međuproizvod koji sadrži porfirin π -katjon radikal ($Por\cdot^+$) [158]. Jedinjenje I MPO je jak oksidant jedno- i dvoelektronskih oksidacionih reakcija. U zavisnosti od relativnih koncentracija donora enzim ulazi u ciklus halogenovanja (Shema 2, reakcije 1 i 2) ili peroksidacije (Shema 2, reakcije 1, 3 i 4).

U ciklusu halogenovanja jedinjenje I u jednom dvoelektronskom koraku oksiduje halogene X^- (hloride, bromide, jodide), kao i pseudohalogene tiocijanate (SCN^-) u odgovarajuće hipohalogene kiseline (HOX) i hipotiocijanatnu kiselinu (HOSCN) [160]. Fiziološki supstrat MPO su hloridi [150]. Standardni redukcionni potencijal para jedinjenje I/nativna MPO je prilično visok (1,16 V) na pH 7 [161]. Jedinjenje I je spektrofotometrijski okarakterisano apsorpcionim maksimumom na 412 nm [162].

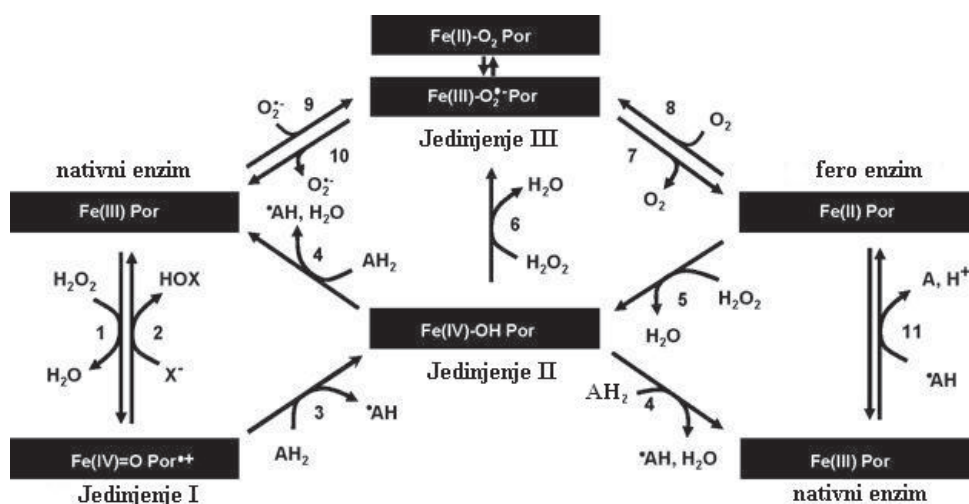
U peroksidaznom ciklusu jedinjenje I se redukuje u dva uzastopna jednoelektronska koraka preko jedinjenja II, protonovane oksogvožđe(IV) vrste (Shema 2, reakcije 3 i 4). Jedinjenje II je spektrofotometrijski okarakterisano apsorpcionim maksimumom na 456 nm [163].

Mnogi neorganski i organski supstrati se ponašaju kao elektron-donori i za jedinjenje I i za jedinjenje II [164]. Jedinjenje I je izuzetno jak jednoelektronski oksidant zbog znatno većeg redukcionog potencijala jedinjenje I/jedinjenje II (1,35 V) od para jedinjenje II/nativna MPO (0,97 V) na pH 7 [165]. Ova razlika u oksidativnim kapacitetima jedinjenja I i II se odražava na brzinu reakcija ovih intermedijera sa različitim supstratima. Loši peroksidazni supstrati koji brzo reaguju sa jedinjenjem I, a sporo redukuju jedinjenje II dobri su inhibitori proizvodnje HOX zato što zarobljavaju enzim u obliku jedinjenja II i na taj način onemogućavaju ciklus halogenovanja [166]. Ipak, oni ne mogu kompetitivno da

inhibiraju peroksidaznu aktivnost, jer je ona zavisna od redukovanja jedinjenja II u nativni enzim (Shema 2, reakcija 4).

Jedinjenje I kroz peroksidazni ciklus oksiduje brojne supstrate, kao što su fenoli, anilini i β -diketoni u odgovarajuće slobodne radikale (\bullet AH) (Shema 2, reakcije 1, 3 i 4) [167; 168; 169].

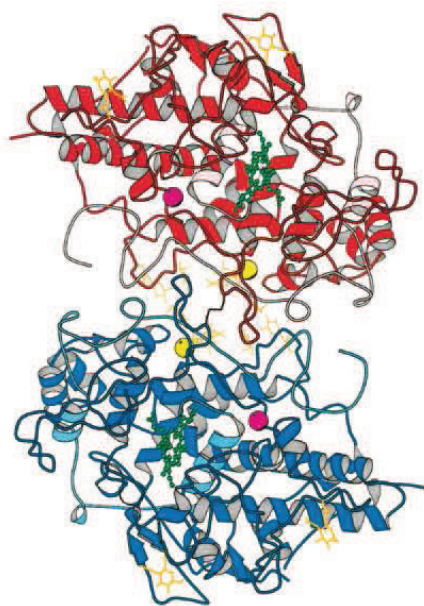
MPO intermedijeri koji ne učestvuju ni u hlorinujućem ni u peroksidaznom ciklusu su Fe(II) oblik MPO i jedinjenje III, koje je fero-dioksi/feri-superoksid anjon kompleks MPO (Shema 2). Slično višim oksidacionim stanjima, redukcionni potencijal Fe(III)/Fe(II) MPO je znatno viši (5 mV) od potencijala istog redoks-para drugih hem-peroksidaza [170]. Iz tog razloga MPO je veoma osetljiva na redukciju svog Fe(II) oblika radikalima intermedijera koji nastaju tokom peroksidaznog ciklusa (Shema 2, reakcija 11). U prisustvu kiseonika Fe(II) MPO se brzo konvertuje u jedinjenje III (Shema 2, reakcija 8). Postoji i mogućnost da jedinjenje III bude formirano reakcijom feri MPO sa superoksid-anjonom (Shema 2, reakcija 9) ili jedinjenja II sa H_2O_2 (Shema 2, reakcija 6) [171]. Jedinjenje III treba posmatrati kao kompleks koji se može raspasti u feri MPO i superoksid-anjon (Shema 2, reakcija 10) ili fero MPO i kiseonik (Shema 2, reakcija 7). Jedinjenje III je spektrofotometrijski okarakterisano apsorpcionim maksimumom na 625 nm [172].



Shema 2. Opšta reakciona shema MPO

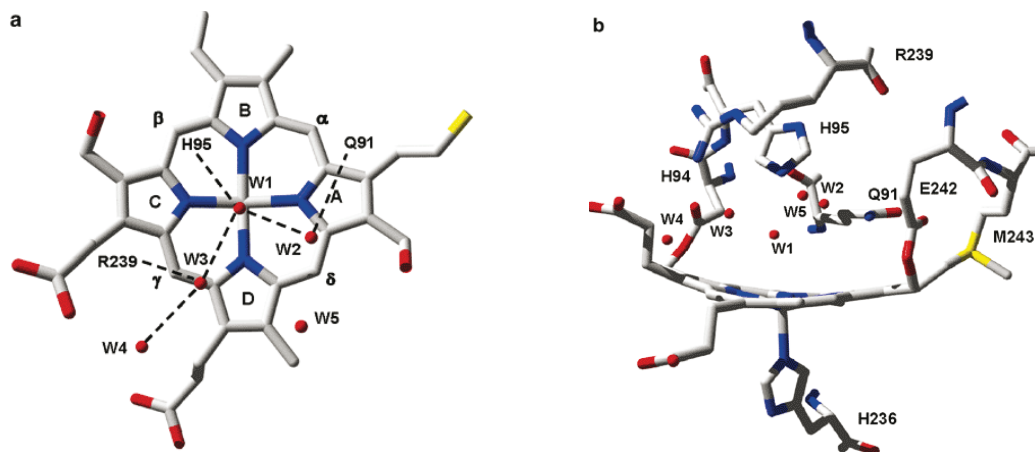
2.5.2. Trodimenzionalna struktura mijeloperoksidaze

MPO je jedina sisarska peroksidaza čija je trodimenzionalna struktura poznata. Trodimenzionalna struktura mijeloperoksidaze prvi put je dobijena analizom kristalne strukture enzima psa [173]. Struktura humane MPO je kasnije definisana [174; 175]. Mijeloperoksidaza je katjonski dimer od 146 kDa sa jednim disulfidnim mostom između simetrično povezanih polovina. Svaka polovina sastoji se od dva polipeptida od 14,5 i 58,5 kDa, a veći polipeptid je glikozilovan (Slika 11). Mali polipeptid sadrži 106, a veliki 467 ostataka aminokiselina. Postoji pet dodatnih intralančanih disulfidnih veza u velikom polipeptidu i jednu u malom. Sekundarna struktura sačinjena je uglavnom od α -heliksa [173; 174; 176]. Svaka polovina molekula poseduje centralno jezgro koje čine 6 heliksa kovalentno vezanih za hem (Slika 11). Pet heliksa potiče od velikog polipeptida, a šesti od malog. Najveći deo velikog polipeptida se uvija u 5 odvojenih domena i jednu otvorenu petlju, koja okružuje jezgro (Slika 11). Mali polipeptid se obmotava oko površine molekula, pri čemu samo njegov karboksi terminalni heliks prodire u unutrašnjost jezgra. Na pet mesta u velikom polipeptidu ostatak asparagina je N-glikozilovan (Asn157, Asn189, Asn225, Asn317 i Asn 563). Svaki monomer MPO sadrži po jedan atom gvožđa, u obliku feri-protopofirina IX i jedan jon kalcijuma.



Slika 11. MPO dimer. Veliki polipeptidi dve polovine su obojeni crveno i plavo, dok su mali polipeptidi svetlije nijanse istih boja. Ostale strukture: hem (zeleno), ugljeni hidrati (narandžasto), kalcijum (ljubičasto) i hloridi (žuto). U centru molekula je disulfidna veza (predstavljena crnom bojom).

Hem je identifikovan kao derivat protoporfirina IX u kome su metil-grupe na pirolovim prstenovima A i C modifikovane (Slika 12a), tako da omogućavaju formiranje estarskih veza sa karboksilnim grupama Glu242 teškog i Asp94 lakog polipeptida. β -ugljenik vinilne grupe na pirolovom prstenu A gradi kovalentnu vezu sa atomom sumpora Met243, pri čemu nastaje sulfonijum-jon veza (Slika 12b) [173; 174].



Slika 12. a) Mreža vodoničnih veza i položaji 5 molekula vode (W1-W5) u distalnoj šupljini MPO u kojoj je smešten hem. b) Neplanarni porfirinski prsten u MPO i njegovo kovalentno vezivanje za protein preko dve estarske veze (Glu242 i Asp94) i jedna veza sulfonijum-jona (Met243). Dodatno, prikazani su proksimalni His336 i distalni katalitički

ostaci His95, Arg239 i Gln91. Slika je konstruisana korišćenjem koordinata iz Protein Data Bank [177].

Sulfonijum-jon veza ima dve uloge: služi kao supstituent koji privlači elektrone preko svog pozitivnog naelektrisanja i odgovoran je zajedno sa susednim ostatkom Glu242 za manju simetriju hem-grupe i distorziju planarne konformacije (Slika 12b) [174]. Postojanje ove veze je razlog specifičnih spektroskopskih osobina MPO. Kod MPO Soretova traka na 430 nm znatno je pomerenka ka crvenom delu spektra u odnosu na Soretove trake drugih proteina, a poseduje i dodatne trake na 496, 570, 620 i 690 nm, koje su odgovorne za karakterističnu zelenu boju ovog enzima [178; 179; 180].

Hem je lociran u pukotini sa prilazom rastvarača preko otvorenog kanala. U distalnoj šupljini se nalazi pet molekula vode (W1-W5). Distalni His95 je vodonično vezan za molekul vode W1 koji se nalazi na pola puta između Nε atoma His95 i gvožđa hema (Slika 12 a i b). Njegova udaljenost i od azota histidina i atoma gvožđa ukazuje da je vodonično vezan za histidin i slabo koordinovan sa gvožđem iz hema. Četiri preostala molekula vode formiraju vodonične veze sa His95, Arg239, Gln91, pirolvim C prstenom hema, kao i međusobno (Slika 12a) [174]. Molekul vode W2 je vodoničnom vezom vezan za Nε atom Gln91, W3 za NH₂ Arg239, W4 za propionat pirolvog C prstena hema, a W5 nema dodatno vodonično vezivanje (Slika 12a) [174].

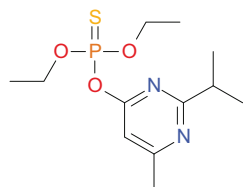
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Hemikalije

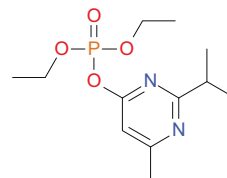
Mijeloperoksidaza iz humanih neutrofila ($A_{430}/A_{280}=0.84$) dobijena je od Planta Natural Products, Vienna, Austria, a koncentracija ($1,85 \times 10^{-5}$ M) je određena spektrofotometrijski ($\epsilon_{430}=91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [181]. Katalaza poreklom iz goveđe jetre, acetilholinesteraza iz električne jegulje (specifična aktivnost 288 IU/mg), acetiltioholinjodid (ASChI), staklene kuglice sa kontrolisanom veličinom pora (CPG 240, 80-120 mesh–controlled-pore glass), amonijum-acetat, glacijalna sirćetna kiselina, acetonitril, *o*-dianizidin-dihidrohlorid, taurin, dimetil-formamid (DMF) i 5, 5' – ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiseina) (DTNB) dobijeni su od Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kalijumhidrogen-fosfat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$), NaCl, KBr, KI, NaI, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, glutaraldehid, 3-aminopropil-trietoksi-silan, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) i 2-PAM dobijeni su od Merck KGaA, Germany. Rastvori vodonik-peroksida pripremani su svakodnevno, razblaživanjem osnovnog rastvora (30% m/V), a tačna koncentracija je određivana spektrofotometrijski ($\epsilon_{240}=43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [182]. Organofosfatni pesticidi diazinon, malation, hlorpirifos, azinfos-metil, forat, diazokson, malaokson, hlorpirifos-okson, azinfos-metil-okson i forat-okson dobijeni su od Pestinal, Sigma-Aldrich, Denmark (najmanje 93% čistoće). Radni rastvori pesticida pravljani su svakodnevno razblaživanjem osnovnog etanolnog rastvora koncentracije 1×10^{-1} M. Finalni rastvori sadržali su maksimalno 1% etanola, što je bilo neophodno zbog rastvorljivosti. Fizička svojstva ovih pesticida date su u Tabeli 6, a njihovne formule na Shemi 3.

Tabela 6. Fizička svojstva ispitivanih pesticida

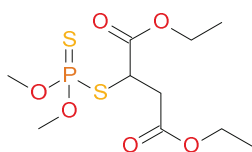
OP	Molekulska formula	Molarna masa (g/mol)	Pojava	Gustina (g/cm ³)	Rastvorljivost u vodi (mg/L)	Generalno rastvorljiv u:	Particioni koeficijent, logP (oktanol/voda)	LD ₅₀ -oralno, za pacove (mg/kg)
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃	304,35	Bezbojna do smeđa tečnost	1,12 (na 20°C)	40 (na 25°C)	etanolu, metanolu, petrol-etru, benzenu...	3,81	300-400
Malation	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,36	Bista bezbojna tečnost	1,23 (na 25°C)	145 (na 20°C)	etanolu, metanolu, acetonu, etil-etru...	2,36	1000-10000
Hlorpirifos	C ₉ H ₁₁ C ₁₃ NO ₃ PS	350,59	Bezbojni kristali	1,39 (na 43,5°C)	2 (na 25°C)	etanolu, metanolu, ksilenu, benzenu...	4,96	95-270
Azinfos-metil	C ₁₀ PN ₃ H ₁₂ S ₂ O ₃	317,32	Narandžasti prozirni kristali	1,44 (na 25°C)	28 (na 25°C)	toluenu, dihlormetanu, etanolu, acetonitrilu...	2,46	4,4-16
Forat	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260,38	Bistra bezbojna tečnost	1,17 (na 2540°C)	50 (na 25°C)	ksilenu, etanolu, etru, ugljen-tetrahloridu...	3,92	1



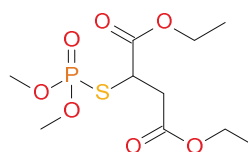
diazinon



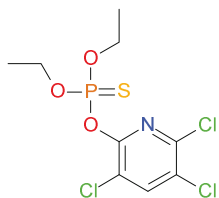
diazokson



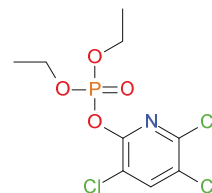
malation



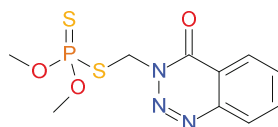
malaokson



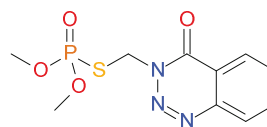
hlörpirifos



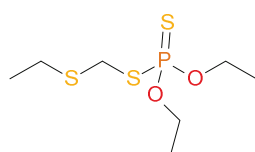
hlörpirifos-okson



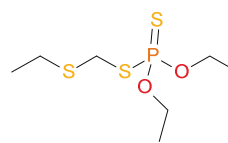
azinfos-metil



azinfos-metil-okson



forat



forat-okson

Shema 3. Strukturne formule ispitivanih organofosfata

3.2. Korišćena oprema

3.2.1. Spektrofotometrijska merenja

Spektrofotometrijska merenja obavljena su na aparatu UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 35, u staklenoj kivetu sa svetlosnim putem 1 cm.

3.2.2. Tečna hromatografija

Hromatografske analize su rađene na sistemu UPLC Waters ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography system sa TUV detektorom, što je kontrolisano Empower softverom, na koloni ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈, 1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm (Waters).

3.2.3. Gasna hromatografija

Hromatografske analize su rađene na sistemu GC/MS Agilent 7890A, GC sistem sa 700A QqQ MS, kolona DB-5 MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm.

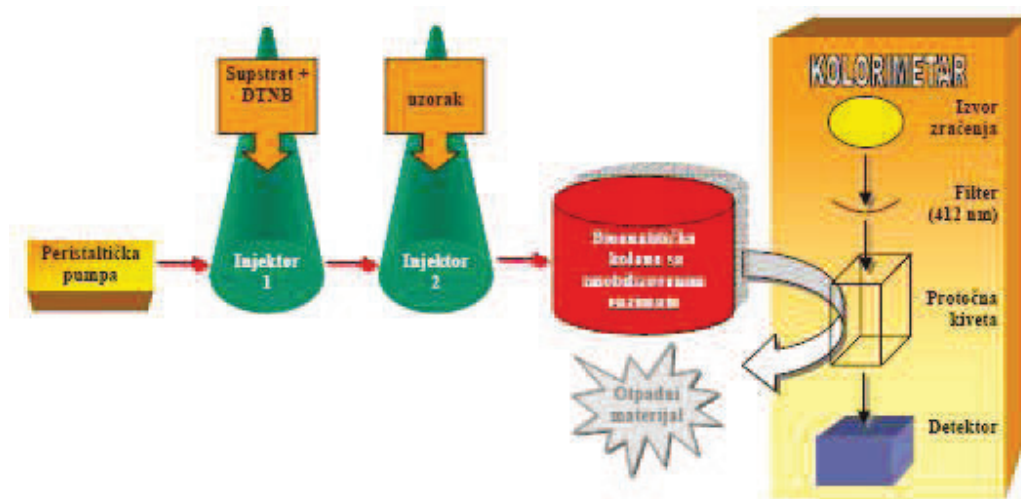
3.2.4. Protočni injekcioni sistem (FIA)

Ispitivanja na imobilizovanoj acetilholinestarzi urađena su na FIA (flow injection analysis) sistemu konstruisanom u Laboratoriji za fizičku hemiju INN Vinca. Sistem se

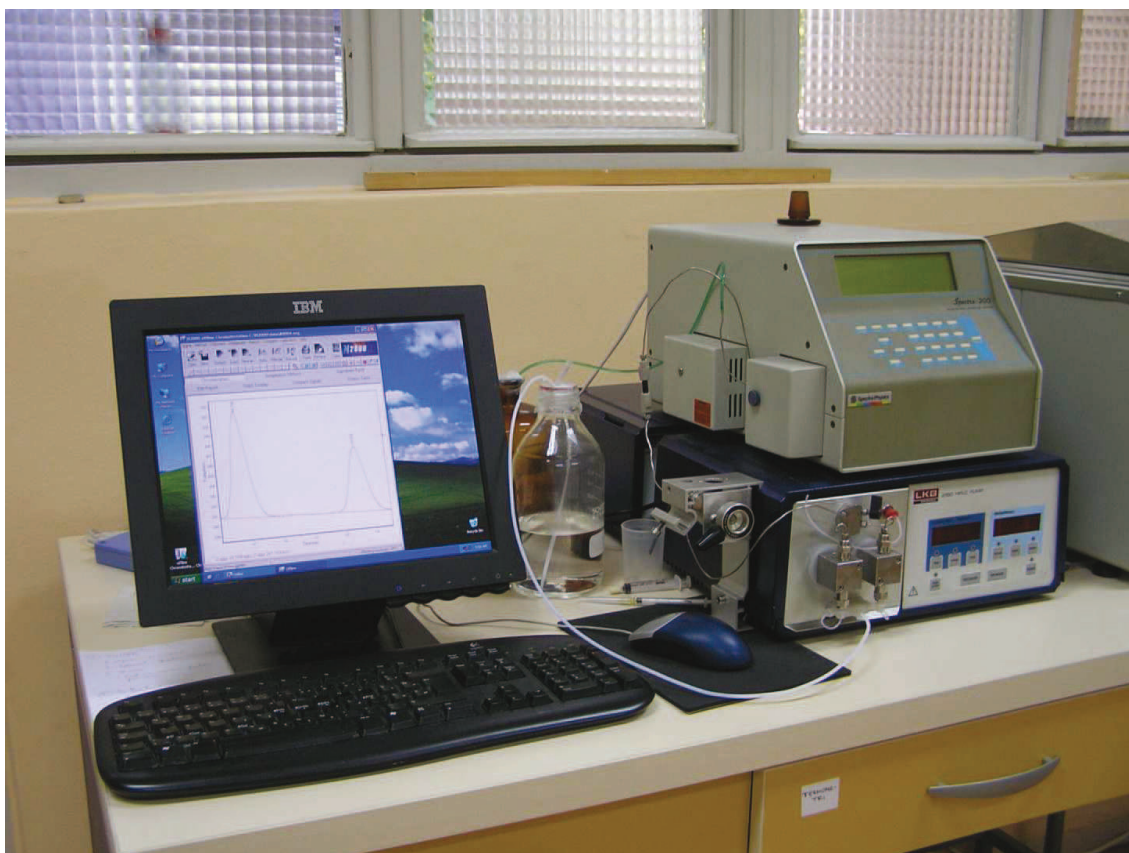
sastoji od od bioanalitičke kolone (Slika 13) sa imobilizovanim enzimom, HPLC pumpe (Dionex AMP-1), injektora (Waters U6K) sa petljom od 200 μ L, i UV VIS detektora (Spectra 200, Spectra Physics). Bioanalitička komponenta FIA sistema napravljena je tako što je kolona dimenzija 21x3 mm napunjena sa 10 - 13 mg imobilizovane AChE. Noseći pufer bio je 50 mM forfatni pH 8. Shematski prikaz biosenzora dat je na Shemi 4, a uređaj u celini je prikazan na Slici 14.



Slika 13. Bioanalitička kolona sa imobilizovanom AChE



Shema 4. Shematski prikaz biosenzora



Slika 14. FIA sistem za analize na imobilizovanoj AChE

3.2.4.1. Imobilizacija AChE

0,55 mg AChE imobilizovano je na 0,15 g aktiviranog CPG prema metodi opisanoj u literaturi [183; 184; 185]. Staklene kuglice su prokuvane u 5% azotnoj kiselini, a zatim isprane dejonizovanom vodom i osušene na 95 °C. Vodeni rastvor aminoalkilirajućeg agensa pripreman je dodavanjem 10 mL 3-aminopropil-trietoksisilana u 90 mL vode, pri čemu je pH podešavano na 3,5 pomoću 5 M HCl. U ovaj rastvor dodavano je osušeno staklo i smeša je inkubirana na 75 °C tokom 150 minuta uz mešanje na svakih 15 minuta. Tretirano staklo je filtrirano, isprano dejonizovanom vodom i osušeno. Proces aktivacije ponovljen je 3 puta. Rastvor umreživača glutaraldehida (2,5 %) pripremljen je dodavanjem

5 mL 25%-nog glutaraldehida u 45 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH 7. Potom su alkilamino-grupe aktiviranog stakla (0,4 g) umrežene pomoću 2 mL glutaraldehida u pari azota tokom 1 h i isprane dejonizovanom vodom. Enzim (0,55 mg) je rastvoren u 3 mL hladnog (4 °C) 50 mM fosfatnog pufera pH 6 i doveden u kontakt sa prethodno tretiranim staklom u struji azota tokom 2,5 h. Posle filtriranja, imobilizovani enzim je ispiran istim puferom i vodom. Imobilizovani enzim je skladišten u puferu na 4 °C do upotrebe.

3.2.5. Elektrohemijska merenja

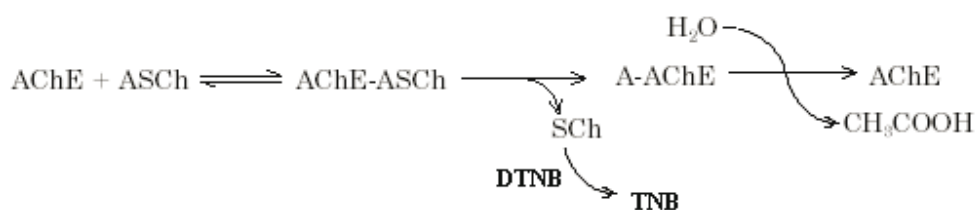
Elektrohemijska merenja obavljena su pomoću Gamry PCI4/750 potencijostata (Gamry Instruments, USA), koji je kontrolisan preko Gamry Framework v4.35. i Pine Rotator (Pine Instruments, USA) sa disk elektrodom od staklastog ugljenika (površine poprečnog preseka 0,19625 cm²).

3.2.6. Ostala laboratorijska oprema

Za odmeravanje hemikalija korišćene su analitička vaga Mettler i tehnička vaga Mettler, za mešanje uzoraka magnetna mešalica VELP scientifica, za određivanje pH rastvora pH metar Metrohm 713 sa kombinovanom elektrodom, a za centrifugiranje centrifuga miniSpin plus, Eppendorf.

3.3. Određivanje aktivnosti AChE

Aktivnost AChE merena je pomoću modifikovane Elmanove metode [186; 187; 188]. Finalna zapremina reakcione smeše bila je 700 μ L. Reakcija je praćena tokom 8 minuta na 37 $^{\circ}$ C. Kao supstrat korišćen je 0,075 M ASChI u kombinaciji sa 1×10^{-4} M DTNB kao hromogenim agansom. Proizvod enzimske reakcije je tiholin, koji sa DTNB gradi 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) žute boje (Shema 5), koji se prati spektrofotometrijski na 412 nm. Intenzitet boje je mera aktivnosti enzima. Reakcija je praćena u 50 mM fosfatnom puferu pH 8, a zaustavljena je dodavanjem 50 μ L natrijum-dodecil-sulfata (SDS) koncentracije 1×10^{-1} M.



Shema 5. Princip određivanja aktivnosti AChE Elmanovom metodom

3.4. Oksidacija OP u prisustvu MPO

Ispitivane koncentracije organofosfata inkubirane su u 50 mM fosfatnom puferu pH 6 sa različitim koncentracijama MPO, u reakcionoj smeši finalne zapremine 0,5-1,0 mL. Reakcija je otpočinajna dodatkom H₂O₂ i zaustavljena dodavanjem katalaze koncentracije 100 μ g/mL. Reakcione smeše su potom centrifugirane 10 minuta na 13000 rpm i supernatant je korišćen za dalje analize.

3.5. Oksidacija OP elektrohemijski generisanim hlorom, bromom i jodom

Indirektna elektrohemijska oksidacija ispitivanih organo-tiofosfata izvršena je u troelektrodnom sistemu sa radnom rotirajućom elektrodom od staklastog ugljenika, platinskom kao pomoćnom i zasićenom kalomelovom elektrodom (ZKE) kao referentnom elektrodom. Kao elektrolitički rastvor korišćen je 50 mM PBS pH 6,5 sa dodatkom Cl^- , Br^- ili I^- i organo-tiofosfata željene koncentracije, ukupne zapremine 20 mL. Pre svakog eksperimenta radna elektroda je mehanički očišćena poliranjem sa dijamantskom pastom (veličina čestica 1 – 5 μm), a potom isprana etanolom i dejonizovanom vodom. Oksidacija je trajala 15 min u galvanostaskim uslovima pri gustini struje od 2 mA cm^{-2} , čime je omogućeno da u toku eksperimenta nastane bar 10 puta više halogena od prisutne koncentracije organo-tiofosfata [143]. U toku eksperimenta rastvor je homogenizovan rotiranjem radne elektrode brzinom od 900 rpm. Pored homogenizacije rastvora, rotacija elektrode izaziva konvekcioni tok elektrolita normalno na površinu elektrode konstantno dovodeći novu količinu reaktanata u blizinu elektrode, a takođe i smanjuje debljinu difuzionog sloja ubrzavajući transfer mase [189].

3.6. Identifikacija proizvoda oksidacije OP

3.6.1. UPLC

Analize svih OP rađene su pod izokratskim uslovima sa mobilnim fazama koje su se sastojale od 20 mM amonijum-acetata u vodi (rastvor A) i 0,1 % sirćetne kiseline u acetonitrilu (rastvor B). U Tabeli 7. su dati zapreminski odnosi rastvora A i B koji su korišćeni za analizu pojedinačnih OP, kao i talasne dužine na kojima su

spektrofotometrijski praćeni. Najpogodnije (karakteristićne) talasne dućine izabrane su na osnovu spektara snimanih u oblasti između 200 i 700 nm.

Tabela 7. Zapreminski odnosi rastvora A i B u mobilnim fazama korišćenim za UPLC analizu ispitivanih OP

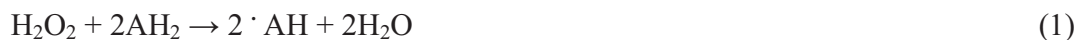
OP	A:B (v/v)	λ (nm)
Diazinon i diazokson	25:75	245
Malation i malaokson	30:70	210
Hlorpirifos i hlorpirifos-okson	25:75	220
Azinfos-metil i azinfos-metil-okson	30:70	230
Forat i forat-okson	30:70	205

3.6.2. GC/MS

Svi ispitivani OP analizirani su pod istim uslovima. Injekciona zapremina bila je 1 μ L, a temperatura injektora 250 °C. Noseći gas helijum puštan je sa protokom od 1,3 mL/min na 80 °C u modu sa konstantnim pritiskom. Temperatura kolone je linearno programirana u opsegu od 80 – 300 °C tako da raste 10 °C/min. Maseni spektri dobijeni su u MRM (multiple reaction monitoring) modu. Energija kolizije bila je 15 eV, a kolizioni gas azot.

3.7. Ispitivanje peroksidazne aktivnosti mijeloperoksidaze

MPO katalizuje tipične reakcije peroksidacije (jednačina 1).



Peroksidazna aktivnost mijeloperoksidaze određivana je po metodi Bradley et al. (1982), praćenjem koncentracije nastalog oksidovanog oblika *o*-dianizidina u reakciji sa vodonik-peroksidom i enzimom [190].

Za određivanje peroksidazne aktivnosti MPO korišćen je supstrat *o*-dianizidin finalne koncentracije 0,53 mM u reakcionoj smeši. Svež rastvor *o*-dianizidina pravljen je pre početka svakog eksperimenta. Aktivnost je određivana u 50 mM fosfatnom puferu pH 6 u prisustvu 0,15 mM vodonik-peroksida. Koncentracija vodonik-peroksida određivana je snimanjem apsorbcije na 240 nm ($\epsilon_{240}=43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Osnovni rastvor MPO koncentracije $1,29 \times 10^{-5} \text{ M}$ je razblaživan i dodavan u reakcione smeše do željenih finalnih koncentracija.

Enzim i *o*-dianizidin su termostatirani 5 minuta na 25°C, nakon čega je reakcija započinjana dodavanjem vodonik-peroksida. Apsorbancija na 460 nm praćena je tokom prvog minuta reakcije. Koncentracija oksidovanog oblika *o*-dianizidina određena je korišćenjem $\epsilon_{460}=11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [190].

3.8. Ispitivanje hlorinujuće aktivnosti mijeloperoksidaze

Hlorinujuća aktivnost mijeloperoksidaze praćena je po metodi Dypbukt et al. (1976) [191]. Koncentracija hipohlorne kiseline čije stvaranje u prisustvu vodonik-peroksida i hlorida katalizuje mijeloperoksidaza (jednačina 2) određivana je merenjem konverzije taurina u taurin-hloramin, koji je detektovan korišćenjem TMB u prisustvu jodida ($\epsilon_{645}=30230 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).



Željene koncentracije mijeloperoksidaze inkubirane su 5 minuta u 20 mM fosfatnom puferu pH 6,5, koji je sadržao 100 mM natrijum-hlorid i 5 mM taurin.

Reakcije su otpočinjane dodavanjem 10 – 30 μM vodonik-peroksida uz brzo mešanje i zaustavljane posle 30 minuta dodavanjem 100 $\mu\text{g/mL}$ katalaze. Jedna zapremina (600 μL) ove reakcione smeše je zatim brzo mešana sa 0,25 zapremina (150 μL) reagensa za razvijanje boje. Nakon 5 minuta merena je apsorbancija na 645 nm i određivana koncentracija nastale hipohlorne kiseline.

Reagens za razvijanje boje sastojao se od 2 mM TMB u 400 mM acetatnom puferu pH 5,4, koji je sadržao 10 % DMF i 100 μM natrijum-jodid. Ovaj rastvor je pripreman rastvaranjem TMB u 100 % DMF koji je potom razblaživan acetatnim puferom do željene koncentracije TMB, a zatim je dodavan natrijum-jodid.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

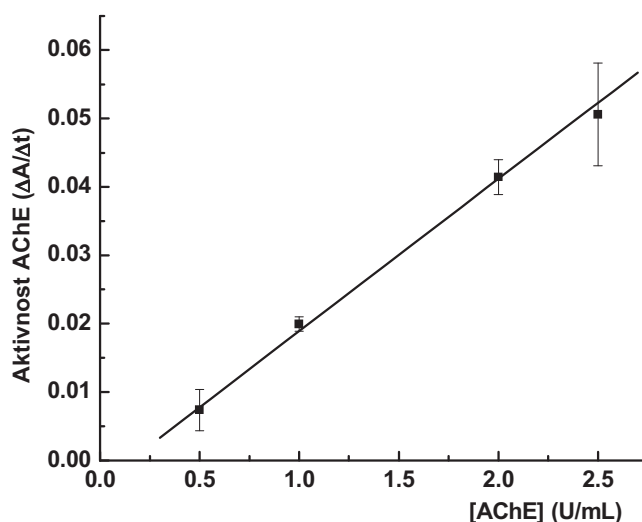
4.1. Inhibicija native AChE organofosfatima

Toksični efekat organofosfatnih pesticida se pripisuje njihovoj ireverzibilnoj inhibiciji AChE [184; 185; 192; 193; 194]. Poznato je da tio-oblici organofosfata (organotiofosfati) u organizmu podležu metaboličkim transformacijama pod uticajem citohroma P450, pri čemu nastaju okso-oblici (oksoni) tih jedinjenja, u kojima je atom sumpora iz tio-grupe zamenjen atomom kiseonika [193; 195; 196]. Metabolička transformacija organotiofosfata u okso-oblike pod uticajem citohroma P450 prikazana je u prilogu (Slika P1). Okso-oblici su toksičniji od polaznih jedinjenja, jer jače inhibiraju AChE [192]. S obzirom na to da transformacija organofosfata iz tio- u okso-oblike predstavlja bitan korak u bioanalitičkim metodama za detekciju niskih koncentracija ovih jedinjenja u životnoj sredini, koje se baziraju na inhibiciji AChE, bilo je potrebno odrediti koncentracionu zavisnost inhibicije ovog enzima kako tio-, tako i okso-oblicima odabranih organofosfatnih pesticida. Pored toga, bilo je potrebno definisati i druge uslove, kao što su koncentracija enzima i vreme inkubacije, kako bi se dobio optimalni spektrofotometrijski signal za detekciju niskih koncentracija inhibitora.

4.1.1. Optimizacija uslova za detekciju najniže koncentracije OP primenom AChE testa

Aktivnost AChE određivana je u opsegu koncentracija 0,5 - 2,5 U/mL na način prethodno opisan u poglavlju 3.3, primenom modifikovane Elmanove metode [186]. Aktivnost enzima je izražena kao promena apsorbancije na 412 nm u minuti. Na Slici 15. prikazani su dobijeni rezultati. Sa grafika se vidi da je zavisnost aktivnosti AChE od njene

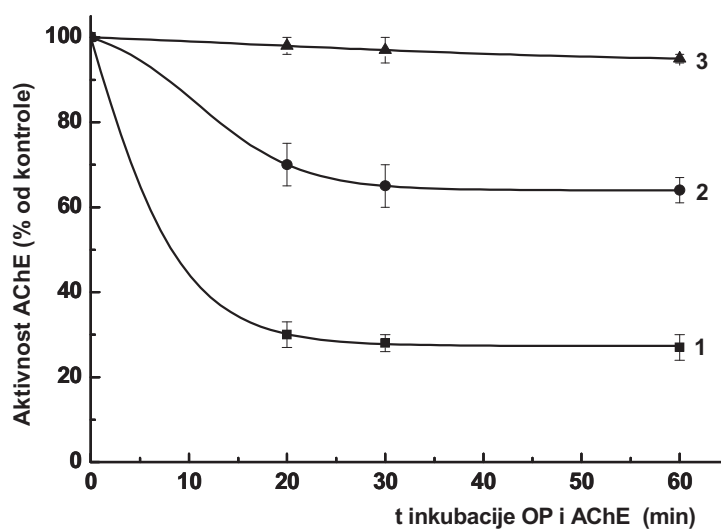
koncentracije u datom opsegu linearna. Obzirom na to da promena koncentracije nagrađenog 5-tio-2-nitrobenzoata pri koncentraciji AChE od 2,5 U/mL daje za 8 minuta promenu apsorbancije za oko 0,5 jedinica, ta koncentracija enzima će se koristiti u esejima za određivanje inhibicije.



Slika 15. Zavisnost aktivnosti AChE od njene koncentracije ispitana u 50 mM fosfatnom puferu pH 8,0 pomoću modifikovane Elmanove metode

Budući da je inhibicija AChE organofosfatima ireverzibilan proces zavisian od vremena inkubacije, određeno je minimalno vreme inkubacije AChE sa inhibitorima koje će dati zadovoljavajuću promenu optičkog signala. Aktivnost enzima koncentracije 2,5 U/mL je određivana AChE testom, na prethodno opisan način. Kao inhibitor uzet je malation u koncentracijama 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Malation je inkubiran sa enzimom na 37 °C tokom 20, 30 i 60 minuta pre otpočinjanja reakcije. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 16. Pri koncentracijama 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M vremenska zavisnost procenta inhibicije AChE je eksponencijalnog oblika i maksimalna vrednost inhibicije je dostignuta posle 20 minuta inkubacije. Pri koncentraciji od 1×10^{-6} M sa povećanjem vremena

inkubacije do 60 minuta aktivnost AChE se linearno smanjuje. Izborom vremena inkubacije od 20 minuta značajno se smanjuje vreme potrebno za analizu. Optimalno vreme je izabrano na primeru malationa, ali se može upotrebiti i za ostale OP, jer su slične strukture i na isti način inhibiraju AChE.



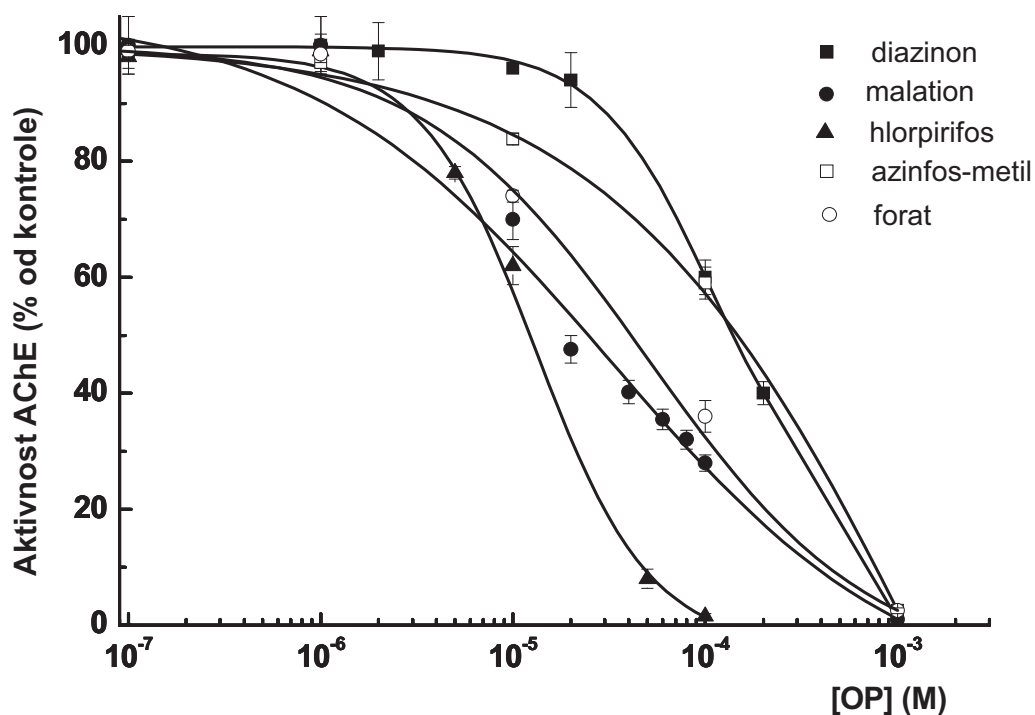
Slika 16. Određivanje optimalnog vremena kontakta AChE koncentracije 2,5 U/mL i malationa koncentracija 1) 1×10^{-4} M, 2) 1×10^{-5} M i 3) 1×10^{-6} M. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri merenja.

4.1.2. Inhibicija AChE organo-tiofosfatima

Aktivnost AChE tito merena je pomoću AChE testa (poglavlje 3.3.) [184; 186], u odsustvu (kontrola) i prisustvu diazinona, malationa, hlörpirifosa, azinfos-metila i forata. Nativni enzim izlagan je ispitivanim organo-tiofosfatima u koncentracionom opsegu od 1×10^{-8} do 1×10^{-3} M. Na osnovu rezultata dobijenih u poglavlju 4.1.1. vreme inkubacije

inhibitora i enzima iznosilo je 20 minuta, a potom je reakcija otpočinjana dodavanjem supstrata i praćena 8 minuta.

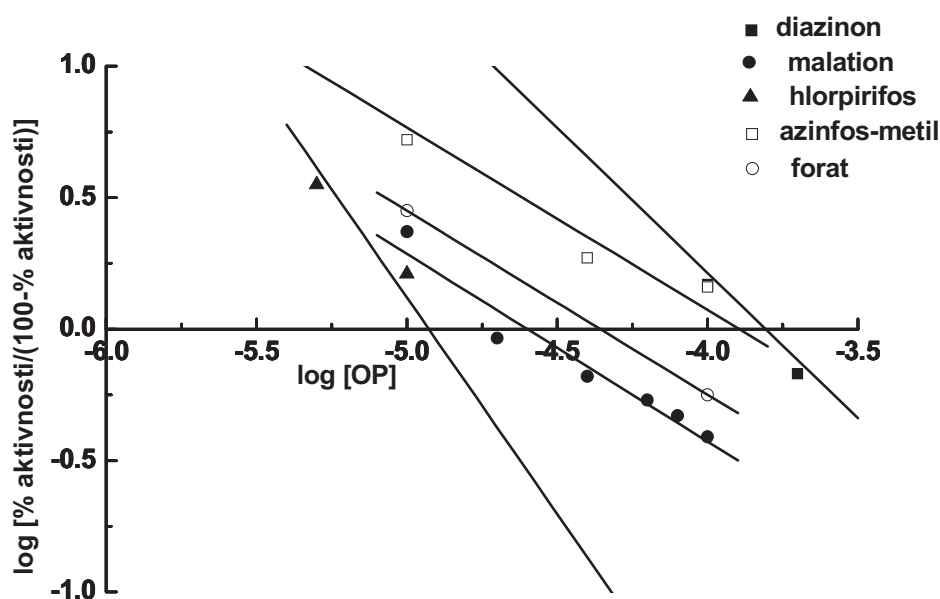
Na Slici 17. prikazane su inhibicione krive dobijene za ispitivane organo-tiofosfate. Sve krive su sigmoidnog oblika.



Slika 17. Zavisnost aktivnosti AChE (2,5 U/mL) od koncentracije ispitivanih organo-tiofosfata. Vreme inkubacije AChE i organo-tiofosfata iznosilo je 20 minuta. Rezultati su prikazani kao procenat srednje vrednosti tri merenja aktivnosti u odnosu na kontrolu u odsustvu OP.

Iz podataka sa Slike 17. određene su IC₅₀ vrednosti (koncentracija inhibitora koja indukuje 50% inhibicije enzimske aktivnosti) za sve inhibitore i prikazane u Tabeli 8. Iz navedenog se vidi da je azinfos-metil najslabiji inhibitor AChE sa IC₅₀ 1,47x10⁻⁴ M, a vrlo

blisku vrednost IC_{50} ima i diazinon, $1,40 \times 10^{-4}$ M. Forat, malation i hlorpirifos imaju IC_{50} vrednosti za red veličine niže i one su $4,14 \times 10^{-5}$, $2,50 \times 10^{-5}$ i $1,15 \times 10^{-5}$ M, respektivno. U grupi ispitanih organofosfata kao najjači inhibitor AChE pri datim uslovima pokazao se hlorpirifos. IC_{50} vrednosti su takođe određene pomoću Hill-ove metode linearne regresione analize (Slika 18) i prikazane u Tabeli 8, kao i Hill-ov koeficijent, n_H . Poređenjem IC_{50} vrednosti dobijenih Hill-ovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom krivom utvrđeno je da je njihova razlika u domenu eksperimentalne greške. Dobijeni Hill-ovi koeficijenti za ispitivana jedinjenja su u saglasnosti sa ranije objavljivanim vrednostima [197].



Slika 18. Hill-ova analiza inhibicije aktivnosti AChE indukovane organo-tiofosfatima

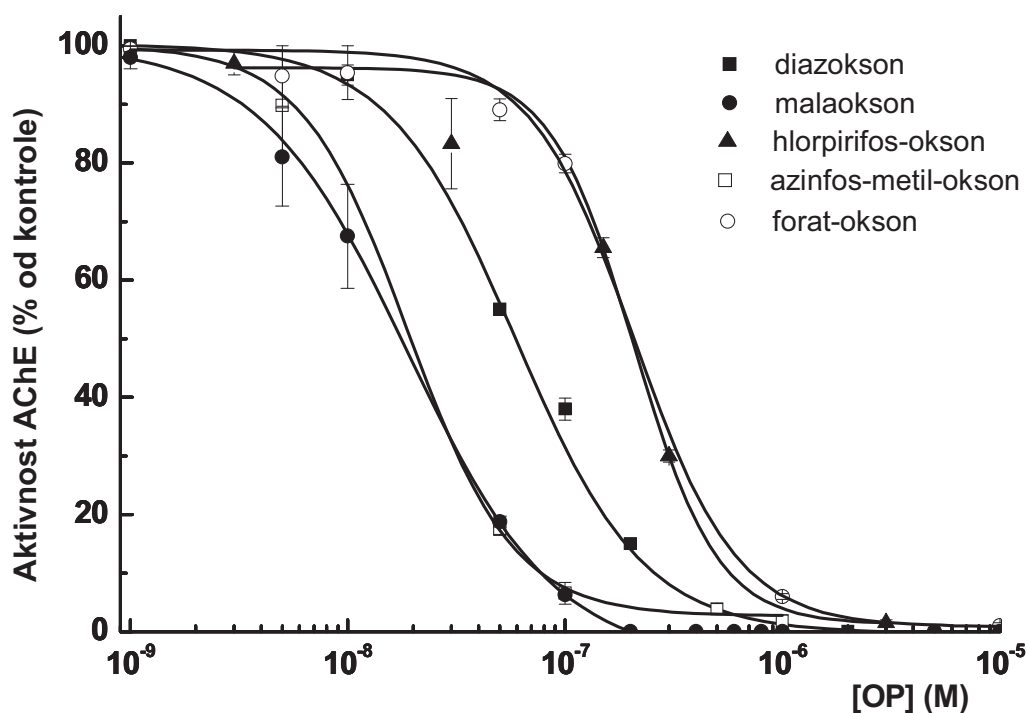
Tabela 8. IC₅₀ vrednosti dobijene Hill-ovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom krivom i Hill-ov koeficijent n_H za ispitivane organo-tiofosfate

OP	IC ₅₀ (M) određeno iz sigmoidne krive	Hill-ova analiza	
		IC ₅₀ (M)	n _H
Diazinon	(1,40±0,21)x10 ⁻⁴	(1,58±0,55)x10 ⁻⁴	1,1±0,1
Malation	(2,50±0,01)x10 ⁻⁵	(2,50±0,55)x10 ⁻⁵	1,3±0,1
Hlorpirifos	(1,15±0,05)x10 ⁻⁵	(1,17±0,55)x10 ⁻⁵	1,6±0,1
Azinfos-metil	(1,47±0,33)x10 ⁻⁴	(1,20±0,55)x10 ⁻⁴	1,2±0,1
Forat	(4,14±0,52)x10 ⁻⁵	(4,30±0,55)x10 ⁻⁵	1,2±0,1

4.1.3. Inhibicija AChE okso-oblicima organofosfata

Inhibicija AChE okso-oblicima organofosfata (diazokson, malaokson, hlorpirifos-okson, azinfos-metil-okson i forat-okson) ispitana je na način koji je prethodno opisan u poglavlju 4.1.2. U ovom slučaju, organofosfati su bili u opsegu koncentracija od 1x10⁻⁹ do 1x10⁻⁵ M.

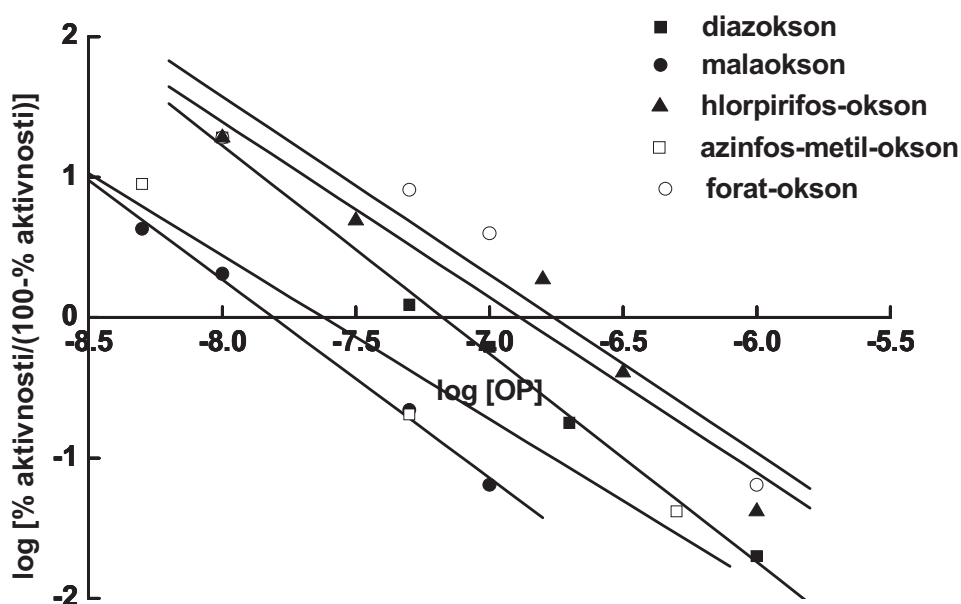
Na Slici 19. prikazane su dobijene inhibicione krive ispitivanih okso-oblika organofosfata. Vidi se da su sve inhibicione krive sigmoidnog oblika, a da je inhibitorski efekat veći za oko dva do tri reda veličine u odnosu na odgovarajuće tio-oblike.



Slika 19. Zavisnost aktivnosti AChE (2,5 U/mL) od koncentracije ispitivanih okso-oblika OP. Vreme inkubacije AChE i organo-tiofosfata iznosilo je 20 minuta. Rezultati su prikazani kao procenat srednje vrednosti tri merenja aktivnosti u odnosu na kontrolu u odsustvu OP.

Iz rezultata prikazanih na Slici 19. određene su vrednosti IC_{50} za ispitivane oksone i prikazani u Tabeli 9. U ovoj grupi najslabiji inhibitori AChE su forat-okson i hlörpirifos-okson sa IC_{50} $2,00 \times 10^{-7}$ M, a zatim slede diazokson, azinfos-metil-okson i malaokson sa IC_{50} vrednostima $5,90 \times 10^{-8}$, $2,00 \times 10^{-8}$ i $1,85 \times 10^{-8}$ M, respektivno. Najjači inhibitor AChE u ovoj grupi jedinjenja je malaokson. IC_{50} vrednosti i Hill-ov koeficijent, n_H , određeni su pomoću Hill-ove metode linearne regresione analize (Slika 20) i prikazane u Tabeli 9. Dobijeni Hill-ovi koeficijenti za ispitivana jedinjenja su u saglasnosti sa ranije objavljivanim vrednostima [197]. Poređenjem IC_{50} vrednosti dobijenih Hill-ovom analizom

i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom krivom utvrđeno je da je njihova razlika u domenu eksperimentalne greške.



Slika 20. Hill-ova analiza inhibicije aktivnosti AChE indukovane okso-oblicima organofosfata

Tabela 9. IC₅₀ vrednosti dobijene Hill-ovom analizom i fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom krivom i Hill-ov koeficijent n_H za relevantne okso-oblike organofosfata

OP	IC ₅₀ (M) određeno iz sigmoidne krive	Hill-ova analiza	
		IC ₅₀ (M)	n _H
Diazokson	(5,90±0,73)x10 ⁻⁸	(6,60±0,55)x10 ⁻⁸	1,5±0,1
Malaokson	(1,85±0,51)x10 ⁻⁸	(1,50±0,55)x10 ⁻⁸	1,4±0,1
Hlorspirifos-okson	(2,00±0,81)x10 ⁻⁷	(1,30±0,55)x10 ⁻⁷	1,1±0,1
Azinfos-metil-okson	(2,00±0,74)x10 ⁻⁸	(2,30±0,55)x10 ⁻⁸	1,2±0,1
Forat-okson	(2,00±0,35)x10 ⁻⁷	(1,70±0,55)x10 ⁻⁷	1,3±0,1

4.2. Prevođenje OP iz tio- u okso-oblik u prisustvu MPO

Rezultati poređenja IC_{50} vrednosti za inhibiciju AChE organo-tiofosfatima i njihovim okso-analogima (Tabele 8 i 9) pokazuju da je u prisustvu okso-oblika stepen inhibicije AChE veći i za više od dva reda veličine. Iako prevođenje organo-tiofosfata u okso-analoge pojačava toksični efekat OP na organizme koji su im izloženi, činjenica je da se ta pojava može iskoristiti za snižavanje nivoa detekcije pesticida. Mnoga jedinjenja korišćena su da bi se tio-oblici organofosfata preveli u okso-oblike [80; 109; 124]. Ova transformacija može se postići i enzimskom reakcijom. U tu svrhu do sada uspešno su korišćeni citohrom *c*, hloroperoksidaza, lignin-peroksidaza i peroksidaza iz rena [127]. Ovi rezultati upućuju na to da bi i druge peroksidaze mogle prevesti organofosfate iz tio- u okso-oblik. Stoga je u daljem radu ispitana je mogućnost upotrebe mijeloperoksidaze za prevođenje OP iz tio- u okso-oblike.

4.2.1. Oksidacija

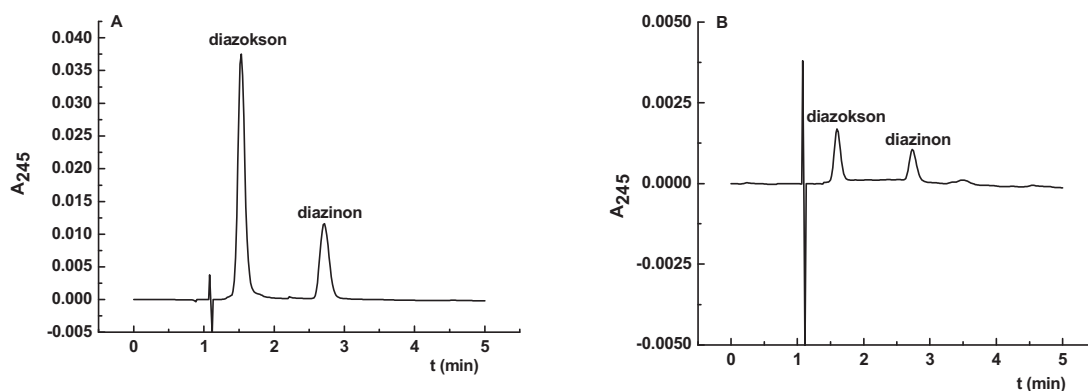
Prevođenje OP iz tio- u okso-oblik postignuto je izlaganjem 1×10^{-5} M OP dejstvu 100 nM MPO u toku 10 minuta. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 50 μ M H_2O_2 , a zaustavljena dodatkom katalaze. Da bi se tačno utvrdilo da li je reakcija koja se odigrava u prisustvu mijeloperoksidaze zaista oksidacija, neophodno je bilo identifikovati novonastale proizvode. U tu svhu upotrebljena je tečna hromatografija pod ultra-visokim pritiskom (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC), a kao dodatna metoda za identifikaciju nastalih proizvoda odabranih jedinjenja gasno-masena hromatografija (eng. Gas Chromatography / Mass Spectrometry – GC/MS).

4.2.1.1. Identifikacija proizvoda oksidacije

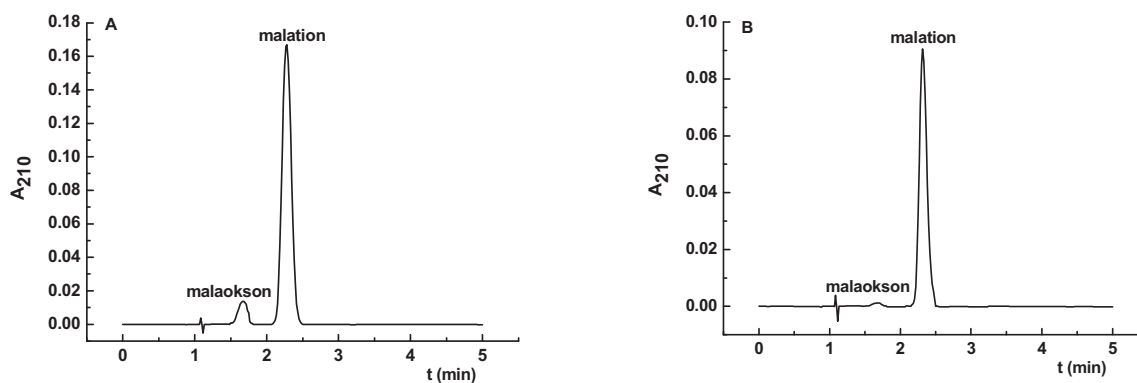
4.2.1.1.1. UPLC

Proizvodi dobijeni biokatalitičkom oksidacijom ispitivanih organo-tiofosfata identifikovani su najpre pomoću UPLC-a. Napravljeni su standardni rastvori maksimalnih dostupnih koncentracija odgovarajućih tio- i okso-oblika ispitivanih organofosfata, rastvorenih u acetonitrilu i snimljeni hromatogrami pod uslovima opisanim u poglavlju 3.5.1. Razvijene su metode za određivanje koncentracije svakog od ispitanih organofosfata pomoću UPLC-a. Kalibracioni grafici, dobijeni pri eksperimentalnim uslovima (u pogledu izbora mobilne faze i talasne dužine) određenim za svako jedinjenje dati su u prilogu (Slika P2).

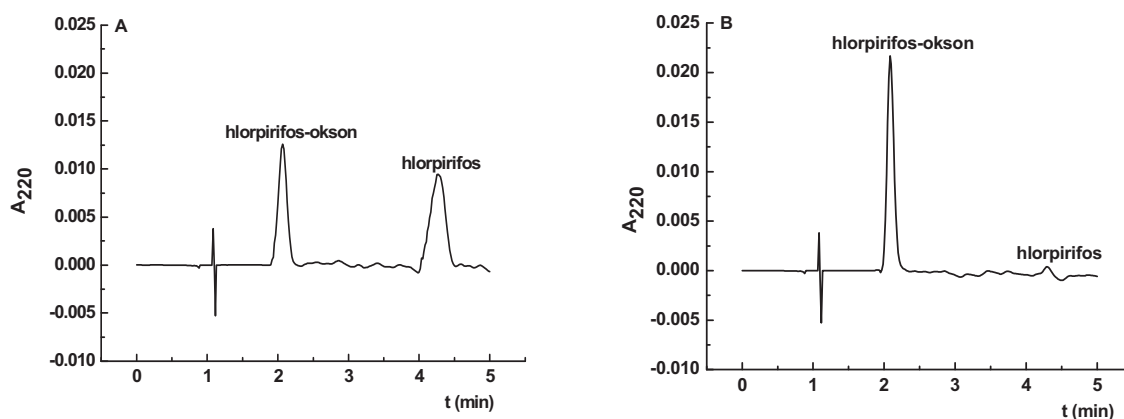
Za identifikaciju proizvoda enzimske reakcije, organo-tiofosfati koncentracije 1×10^{-5} M izlagani su dejstvu 100 nM MPO u toku 10 min. Nakon zaustavljanja reakcije dodatkom katalaze, uzorci su razblaživani 10 puta u acetonitrilu, tako da je njihova finalna ukupna koncentracija (polazno jedinjenje + nastali proizvod) koja je analizirana bila 1×10^{-6} M. Snimljeni su hromatogrami oksidovanih uzoraka organotiofosfata pod istim uslovima kao za standardne rastvore, i prikazani na Slikama 21-25. Iz dobijenih hromatograma određena su retencionna vremena ispitanih jedinjenja i prikazana u Tabeli 10. Rezultati pokazuju, da se u svim slučajevima javljaju dva hromatografska pika. Identifikacija polaznih jedinjenja i nastalih okso-oblika je omogućena poređenjem retencionih vremena oksidovanih uzoraka organofosfata sa retencionim vremenima standarda iz Tabele 10.



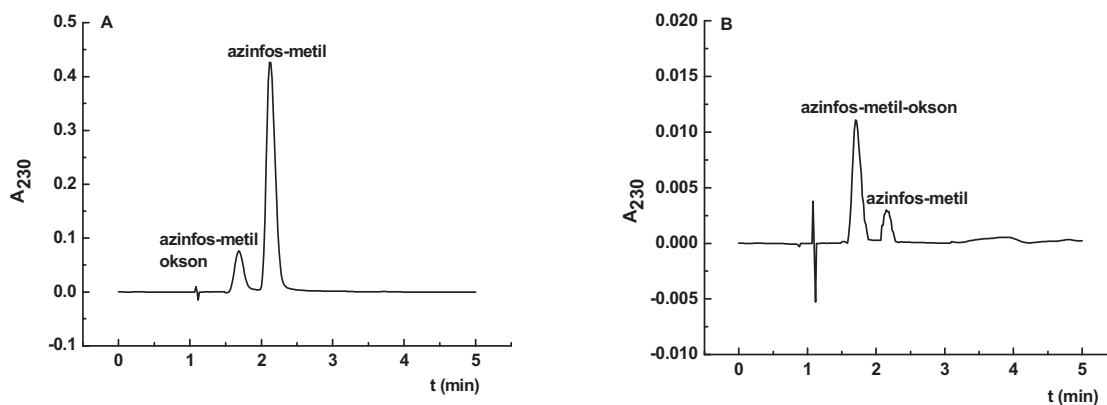
Slika 21. Hromatogrami A) standarda koji je sadržao 1×10^{-5} M diazinon i $3,5 \times 10^{-5}$ M diazokson i B) oksidovanog uzorka ukupne koncentracije 1×10^{-6} M, dobijeni pri istim uslovima. Analiza je urađena pomoću UPLC-a pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i acetonitrila u zapreminskom odnosu 25:75.



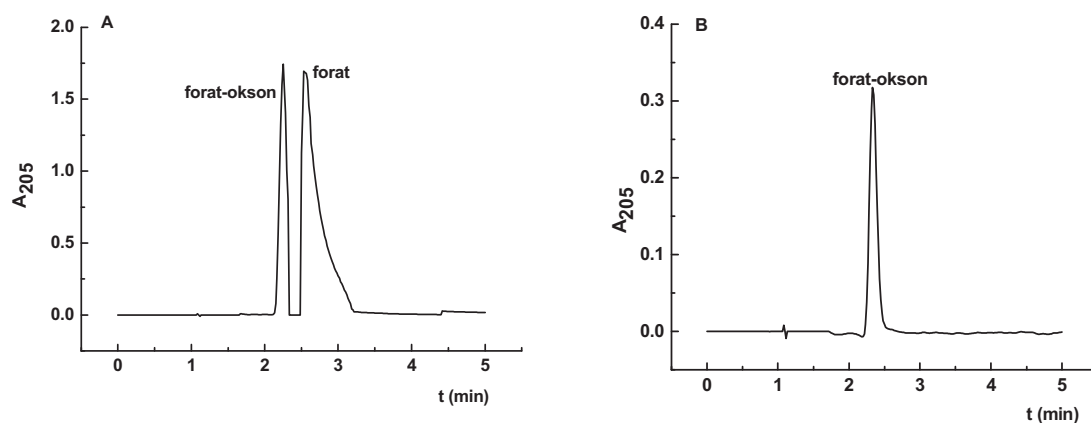
Slika 22. Hromatogrami A) standarda koji je sadržao 1×10^{-5} M malation i 1×10^{-4} M malaokson i B) oksidovanog uzorka ukupne koncentracije 1×10^{-6} M, dobijeni pri istim uslovima. UPLC analiza je urađena pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i acetonitrila u zapreminskom odnosu 30:70.



Slika 23. Hromatogrami A) standarda koji je sadržao 1×10^{-5} M hlorpirifos i 3×10^{-7} M hlorpirifos-okson i B) oksidovanog uzorka ukupne koncentracije 1×10^{-6} M, dobijeni pri istim uslovima. UPLC analiza je urađena pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i acetonitrila u zapreminskom odnosu 25:75.



Slika 24. Hromatogrami A) standarda koji je sadržao 1×10^{-5} M azinfos-metil i $3,3 \times 10^{-4}$ M azinfos-metil-okson i B) oksidovanog uzorka ukupne koncentracije 1×10^{-6} M, dobijeni pri istim uslovima. UPLC analiza je urađena pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i acetonitrila u zapreminskom odnosu 30:70.



Slika 25. Hromatogrami A) standarda koji je sadržao 1×10^{-5} M forat i 5×10^{-8} M forat-okson i B) oksidovanog uzorka ukupne koncentracije 1×10^{-6} M, dobijeni pri istim uslovima. UPLC analiza je urađena pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i acetonitrila u zapreminskom odnosu 30:70.

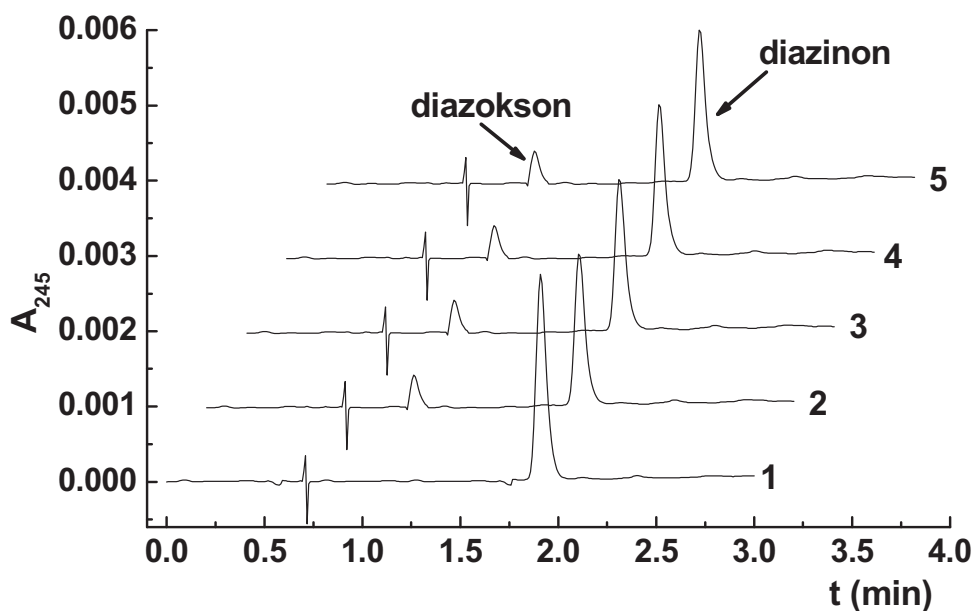
Tabela 10. Retenciona vremena tio- i okso-oblika organofosfata dobijena pomoću UPLC-a

OP	RT (min)	OP	RT (min)
Diazinon	2,70	Diazokson	1,54
Malation	2,30	Malaokson	1,65
Hlorpirifos	4,25	Hlorpirifos-okson	2,00
Azinfos-metil	2,10	Azinfos-metil-okson	1,70
Forat	2,55	Forat-okson	2,30

Prema hromatogramima prikazanim na Slikama 21-25 može se zaključiti da u svim slučajevima izlaganja tio-oblika organofosfata mijeloperoksidazi u reakcionoj smeši, pored polaznog jedinjenja, postoji samo jedan glavni reakcioni proizvod. Prema retencionim vremenima standarda (datim u Tabeli 10.) ti proizvodi su identifikovani kao okso-oblici odgovarajućih organo-tiofosfata.

4.2.1.1.1.1. Stabilnost oksidovanih oblika OP

Da bi se utvrdilo koliko dugo su proizvodi oksidacije stabilni, UPLC hromatogrami oksidovanih uzoraka su snimani tokom 60 minuta posle zaustavljanja reakcije oksidacije dodatkom katalaze. Kao primer, na Slici 26. prikazani su UPLC hromatogrami diazinona oksidovanog u prisustvu MPO. Iz kalibracionih pravih za diazinon i diazokson (Slika P2) određene su koncentracije oba OP tokom 60 minuta i date u Tabeli 11. Nađeno je da se izgled hromatograma i koncentracije OP nisu značajno menjale sa vremenom, kao i da su za diazinon i diazokson one $(0.73 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ M i $(0.27 \pm 0.02) \times 10^{-5}$ M, respektivno. Ovi rezultati takođe potvrđuju da nema drugih proizvoda oksidacije ni posle stajanja uzoraka na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta, odnosno da ne dolazi do daljeg razlaganja okso-oblika. Slični rezultati dobijeni su kada je hloroperoksidaza korišćena za oksidaciju nekih organofosfata, nisu primećeni proizvodi hidrolize i halogenovanja [127; 198]. Ove reakcije se takođe mogu uporediti sa transformacijama OP pod dejstvom citohroma P450 u *in vivo* i *in vitro* sistemima. Razlika je to što je dalje cepanje oksona karakteristično za oksidaciju organofosfata u prisustvu citohroma P450, što nije primećeno u slučajevima hloroperoksidaze i mijeloperoksidaze. Sa druge strane, i oksidacija organofosfata nekim neorganskim oksidantima, kao što je ozon, vodi do hidrolize okso-formi [199].



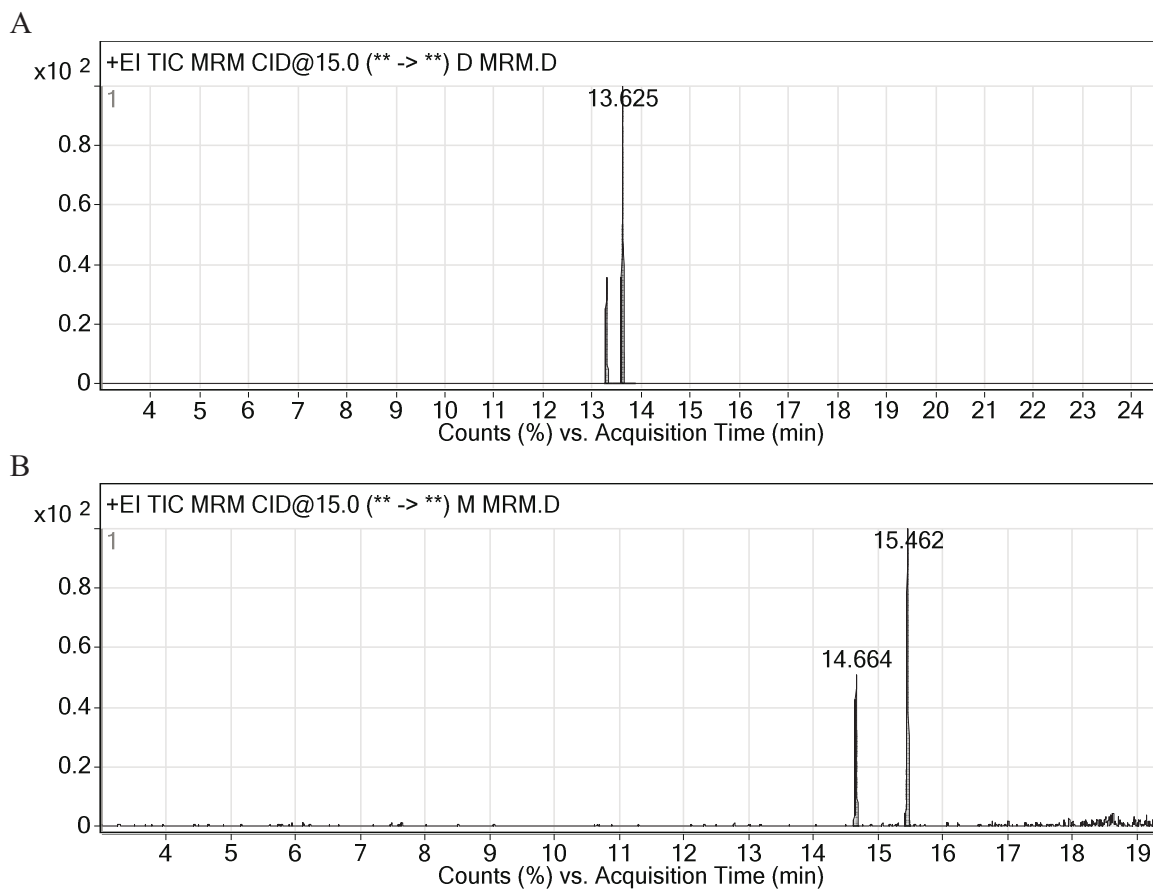
Slika 26. UPLC hromatogrami 1×10^{-5} M diazinona pre (1) i posle (2-5) 10 minuta inkubacije sa 100 nM MPO. Oksidovani uzorci (2-5) su praćeni tokom 60 minuta, a vreme između dva konsektivna hromatograma bilo je 20 minuta. Analiza je urađena pod izokratskim uslovima, sa mobilnom fazom koja se sastojala od 25 % rastvora CH_3COOH u vodi koncentracije 0,1 % i 75 % acetonitrila.

Tabela 11. Koncentracije diazinona i diazoksiona u reakcionoj smeši određene primenom UPLC analize (kalibracioni grafici dati u prilogu, Slika P2) posle 10 minutne oksidacije sa 100 nM MPO i u narednih 60 minuta od zaustavljanja oksidacije.

t (min)	C_{diazinon} (M)	$C_{\text{diazokson}}$ (M)
0	$(0,73 \pm 0,08) \times 10^{-5}$	$(0,27 \pm 0,02) \times 10^{-5}$
20	$(0,72 \pm 0,08) \times 10^{-5}$	$(0,28 \pm 0,02) \times 10^{-5}$
40	$(0,74 \pm 0,08) \times 10^{-5}$	$(0,27 \pm 0,02) \times 10^{-5}$
60	$(0,73 \pm 0,08) \times 10^{-5}$	$(0,28 \pm 0,02) \times 10^{-5}$

4.2.1.1.2. GC/MS

Kao potvrda za rezultate dobijene analizama na UPLC-u, oksidovani uzorci diazinona i malationa koncentracije 1×10^{-5} M su dodatno analizirani i na GC/MS-u. Dobijeni GC hromatogrami prikazani su na Slici 27. U oba slučaja jasno se vide dva hromatografska signala, jedan od polaznog jedinjenja, a drugi od nastalog proizvoda. Ovo je i dodatni dokaz da pri oksidaciji OP u prisustvu MPO nastaje jedan glavni reakcioni proizvod. Poređenjem masenih spektara jedinjenja koja se u tom signalu nalaze sa spektrima iz baze podataka potvrđeno je da su nastali proizvodi okso-oblici polaznih jedinjenja. Do istog zaključka došlo se i poređenjem retencionih vremena sa standardima koji su analizirani pri istim uslovima (Tabela 12).



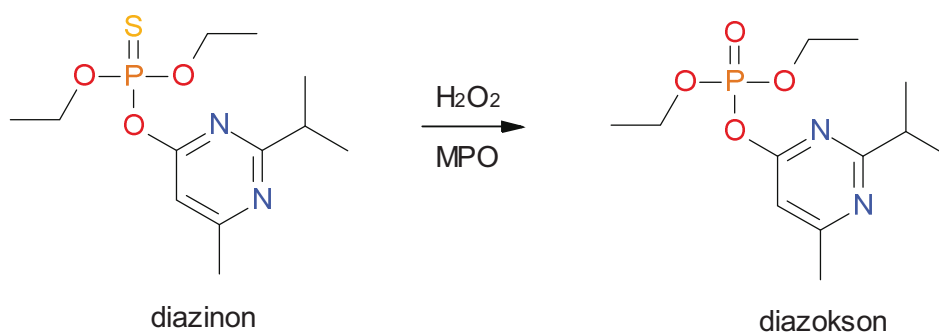
Slika 27. GC hromatogrami A) diazinona i B) malationa koncentracije 1×10^{-5} M oksidovanih u prisustvu 100 nM MPO tokom 10 minuta

Tabela 12. Identifikacija proizvoda oksidacije organo-tiofosfata u prisustvu MPO pomoću GC/MS-a

Jedinjenje	Mr	m/z	RA	RT
Diazinon	304	179, 137, 273	100	13.625
Diazokson	288	137, 273	35	13.299
Malation	330	125, 127, 173	100	15.462
Malaokson	314	127	47	14.664

4.2.2. Optimizacija uslova za oksidaciju organo-tiofosfata

Na osnovu rezultata prikazanih u poglavlju 4.2.1. može se zaključiti da se ispitivani organo-tiofosfati oksiduju u prisustvu MPO i H_2O_2 prema Shemi 6, gde se kao proizvod reakcije javlja okso-oblik:



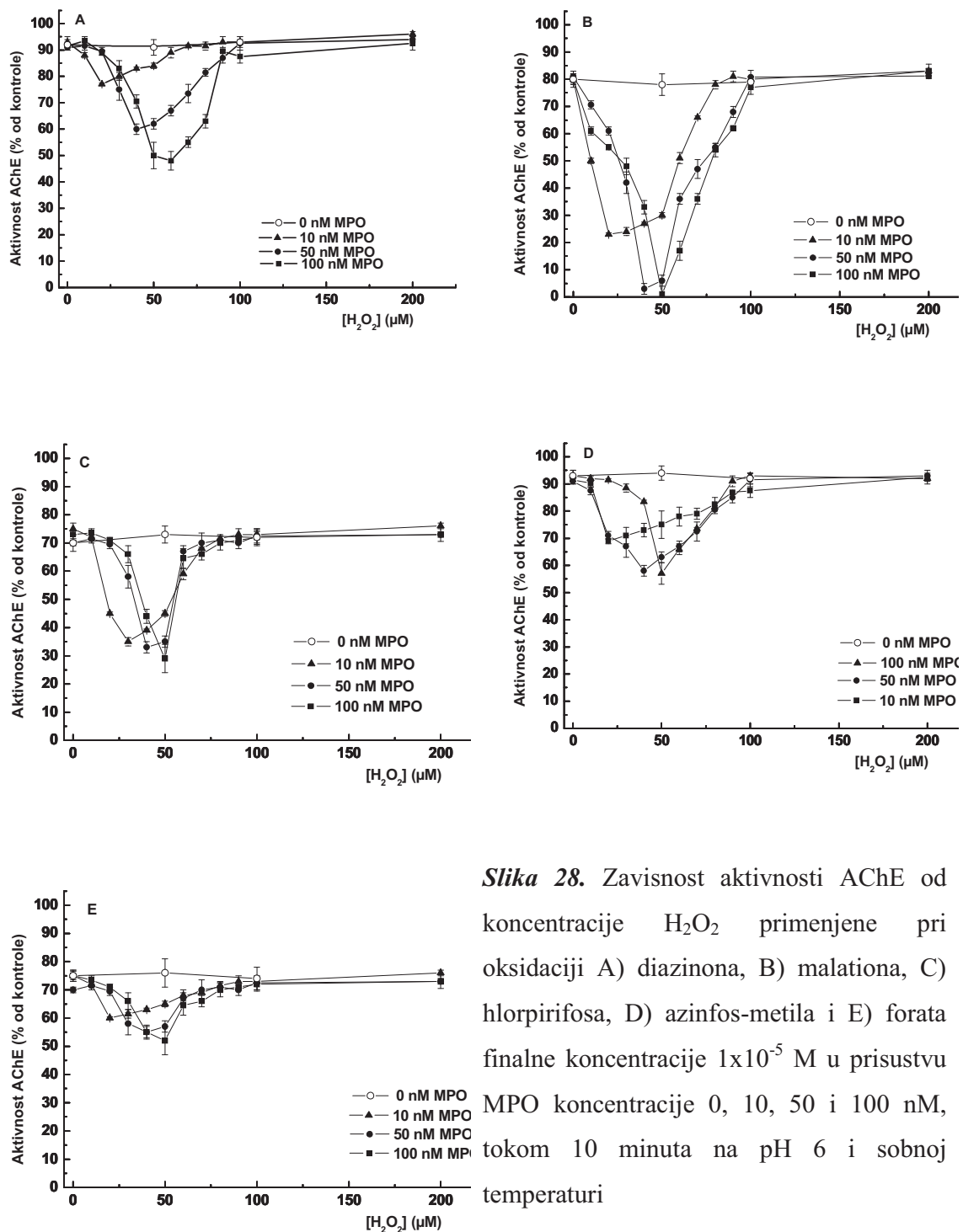
Shema 6. Prevođenje diazinona u diazokson

Da bi se ispitivani organofosfati u što većem procentu preveli iz tio- u okso-oblik (Shema 8), bilo je potrebno optimizovati uslove pod kojima dolazi do oksidacije. Određena je optimalna koncentracija H_2O_2 pri kojoj MPO najefikasnije katalizuje oksidaciju organo-tiofosfata, optimalno vreme inkubacije organo-tiofosfata sa MPO, minimalna koncentracija MPO koju je potrebno koristiti kako bi se postigao zadovoljavajući procenat prevođenja iz tio- u okso-oblik OP, kao i optimalni pH i temperatura za izvođenje reakcije.

4.2.2.1. Određivanje optimalne koncentracije H₂O₂ za oksidaciju OP u prisustvu MPO

U cilju određivanja optimalnih uslova za konverziju ispitivanih organofosfata iz tio- u okso-oblik, ispitan je uticaj H₂O₂ koncentracija između 1 i 200 μM na oksidaciju OP finalne koncentracije 1x10⁻⁵ M, pri različitim koncentracijama MPO (10, 50 i 100 nM). Inkubaciono vreme između ispitivanih OP i MPO bilo je 10 minuta. Oksidacija se odvijala u 50 mM fosfatnom puferu pH 6 na sobnoj temperaturi (25 °C). Budući da su okso-forme organofosfata potentniji inhibitori AChE od tio-oblika, dinamika formiranja oksona praćena je AChE testom (poglavlje 3.3.) [187; 188; 192]. AChE je 20 minuta inkubirana sa ispitivanim organofosfatima posle njihove oksidacije u prisustvu MPO. Pri određivanju preostale aktivnosti AChE svi uzorci su razblaživani 10 puta. Procenat inhibicije AChE indukovano oksidovanim uzorcima organo-tiofosfata razmatran je samo kao posledica povećanja koncentracije okso-forme, jer je u dodatnim eksperimentima utvrđeno da nema sinergizma između uticaja tio- i odgovarajućeg okso-oblika na aktivnost AChE.

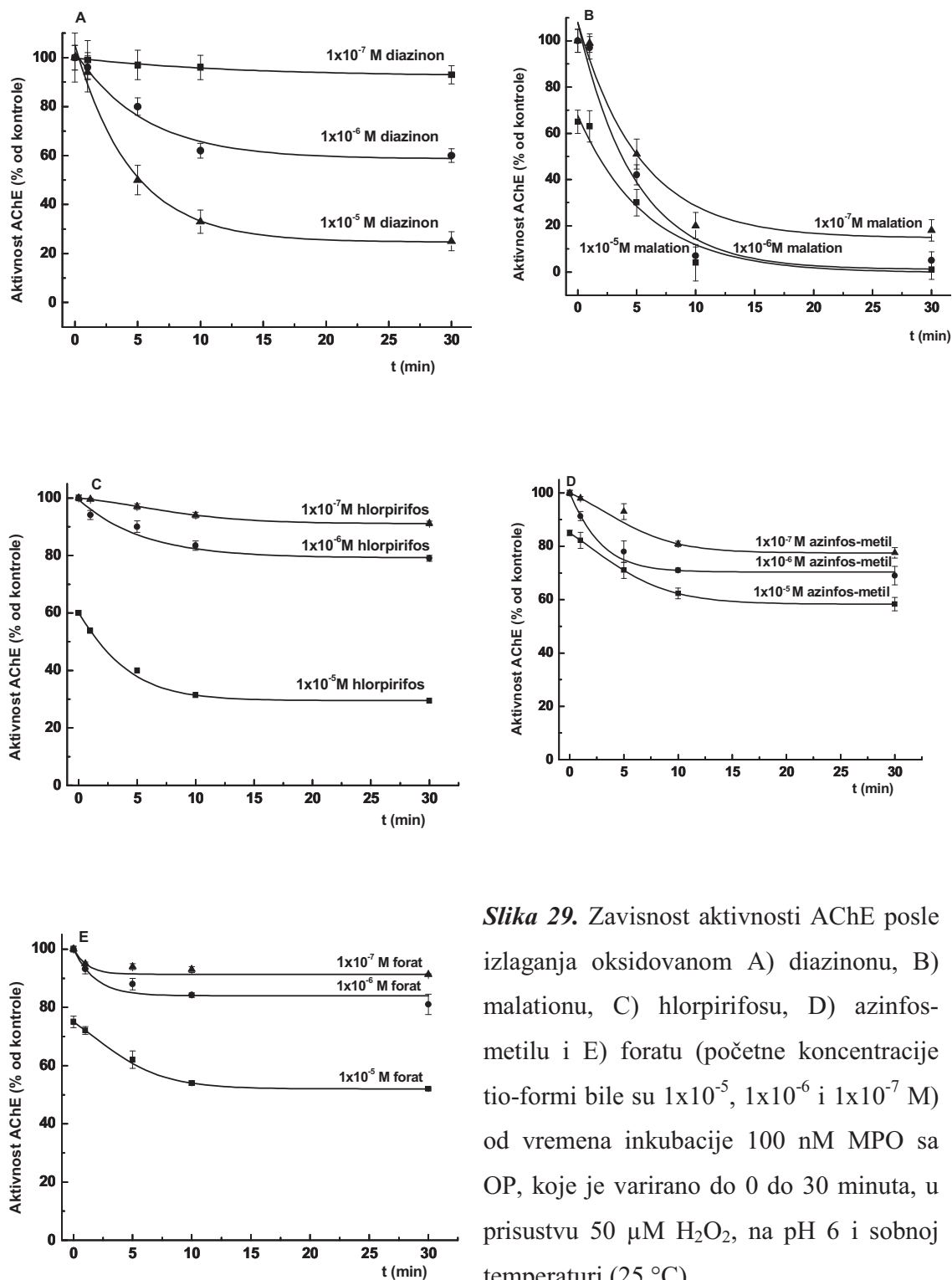
Na Slici 28. prikazana je zavisnost aktivnosti AChE posle izlaganja 1x10⁻⁵ M oksidovanim OP od koncentracije H₂O₂, za različite koncentracije MPO. U svim ispitanim slučajevima aktivnost AChE najpre opada sa povećanjem koncentracije H₂O₂ i dostiže minimum, a zatim raste i dostiže vrednost koja odgovara inhibiciji koju indukuje početna koncentracija polaznog jedinjenja. Sa grafika na Slici 28. se vidi da koncentracija H₂O₂ potrebna da se dostigne najveći procenat inhibicije AChE za datu koncentraciju MPO raste sa povećanjem koncentracije MPO. Sa druge strane, kada su OP oksidovani u prisustvu većih koncentracija H₂O₂, nije uočena promena u inhibiciji AChE. Ova pojava je posledica činjenice da je aktivnost MPO inhibirana kada je H₂O₂ u višku [200; 201]. Paralelni eksperimenti bez MPO pokazali su da sam H₂O₂ ne dovodi do oksidacije organo-tiofosfata pod istim eksperimentalnim uslovima. Iz prikazanih rezultata takođe je moguće zaključiti da je optimalna koncentracija H₂O₂ za oksidaciju ispitanih organo-tiofosfata u svim slučajevima bila oko 50 μM kada je koncentracija MPO 100 nM.



Slika 28. Zavisnost aktivnosti AChE od koncentracije H₂O₂ primenjene pri oksidaciji A) diazinona, B) malationa, C) hlorpirifosa, D) azinfos-metila i E) forata finalne koncentracije 1×10^{-5} M u prisustvu MPO koncentracije 0, 10, 50 i 100 nM, tokom 10 minuta na pH 6 i sobnoj temperaturi

4.2.2.2. Uticaj vremena inkubacije MPO sa OP na oksidaciju

U cilju utvrđivanja uticaja vremena inkubacije ispitivanih OP (koncentracija 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M) i MPO (100 nM) na efikasnost oksidacije, vreme inkubacije je varirano od 1 do 30 minuta. Pri oksidaciji OP u prisustvu MPO koncentracija H_2O_2 je bila konstantna (50 μ M). Reakcija oksidacije se odigravala u 50 mM fosfatnom puferu pH 6 na sobnoj temperaturi (25 °C). Efikasnost oksidacije (posmatrana kroz efekat oksidovanih OP na inhibiciju AChE) je praćena pomoću AChE testa, na prethodno opisan način (poglavlje 3.3). Zavisnost aktivnosti AChE posle izlaganja oksidovanim organo-tiofosfatima od vremena inkubacije predstavljena je na Slici 29. Aktivnost AChE u prisustvu oksidovanih uzoraka ispitivanih OP smanjivala se sa produživanjem vremena inkubacije, što ukazuje na porast koncentracije okso-formi odgovarajućih jedinjenja. Posle oko 30 minuta, u svim ispitivanim slučajevima, došlo je do konstantnog nivoa aktivnosti AChE, iz čega se zaključuje da je u toj tački nastala maksimalna količina oksona pod datim uslovima. Sa druge strane, sa Slike 29. može se videti da je promena aktivnosti AChE u svim ispitivanim slučajevima neznatna u toku poslednjih 20 minuta, te je kao optimalno vreme inkubacije MPO i oksidovanih OP odabrano 10 minuta, kako bi se maksimalno skratila procedura uz zadržavanje nivoa osetljivosti.



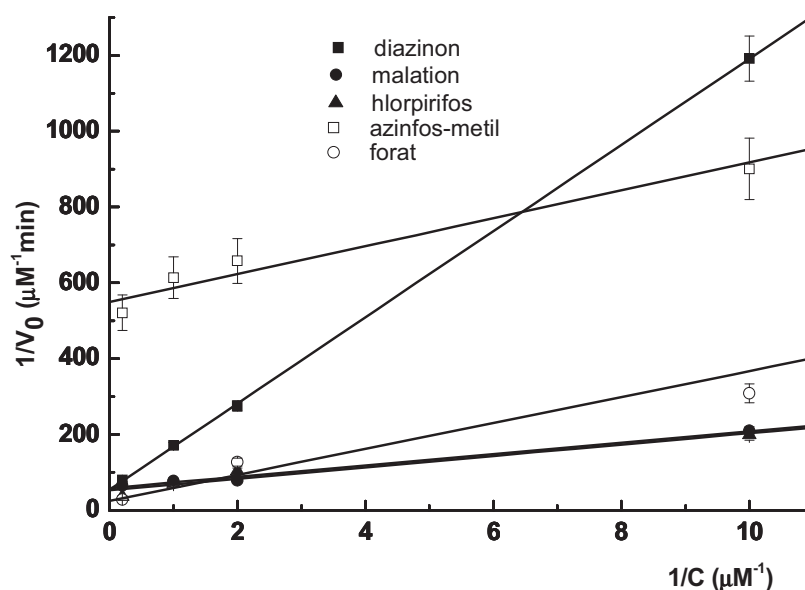
Slika 29. Zavisnost aktivnosti AChE posle izlaganja oksidovanom A) diazinonu, B) malationu, C) hlörpirifosu, D) azinfos-metilu i E) foratu (početne koncentracije tio-formi bile su 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M) od vremena inkubacije 100 nM MPO sa OP, koje je varirano do 0 do 30 minuta, u prisustvu $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, na pH 6 i sobnoj temperaturi (25°C)

4.2.2.2.1. Određivanje kinetičkih konstanti za proces oksidacije OP u prisustvu MPO

Iz podataka prikazanih u poglavlju 4.2.2.2. moguće je odrediti kinetičke parametre reakcije oksidacije OP u prisustvu MPO primenom AChE testa za određivanje koncentracije nastalih okso-oblika. Početne brzine procesa oksidacije određene su iz podataka prikazanih u prilogu (Slika P3). Koncentracije okso-oblika određene su iz zavisnosti aktivnosti AChE od koncentracije oksona (Slika 19) i prikazane u Tabeli 13. Zahvaljujući podacima u Tabeli 13. konstruisani su Lineweaver-Burk-ovi dijagrami (Slika 30), pomoću kojih su određene kinetičke konstante i zajedno sa početnim brzinama prikazane u Tabeli 14.

Tabela 13. Vremenska zavisnost koncentracije okso-oblika OP nastalih posle izlaganja organo-tiofosfata dejstvu 100 nM MPO tokom različitih vremenskih intervala

C _{početno} jedinjenje (M)	t (min)	Diazinon		Malation		Hlorpirifos		Azinfos-metil		Forat	
		A (% od kontrola)	C _{oksona} (M)	A (% od kontrola)	C _{oksona} (M)	A (% od kontrola)	C _{oksona} (M)	A (% od kontrola)	C _{oksona} (M)	A (% od kontrola)	C _{oksona} (M)
1x10 ⁻⁷	5	98	4,3x10 ⁻⁹	51	1,1x10 ⁻⁸	97	2,1x10 ⁻⁸	88	6,3x10 ⁻⁹	94	2,4x10 ⁻⁸
	10	96	6,8x10 ⁻⁹	20	3,9x10 ⁻⁸	94	4,0x10 ⁻⁸	82	8,2x10 ⁻⁹	93	2,5x10 ⁻⁸
	30	92	1,1x10 ⁻⁸	17	5,0x10 ⁻⁸	91	6,0x10 ⁻⁸	79	9,1x10 ⁻⁹	91	3,8x10 ⁻⁸
5x10 ⁻⁷	5	90	1,4x10 ⁻⁸	35	2,0x10 ⁻⁸	93	4,8x10 ⁻⁸	79	9,1x10 ⁻⁹	87	5,7x10 ⁻⁸
	10	77	2,8x10 ⁻⁸	8	1,1x10 ⁻⁷	88	7,3x10 ⁻⁸	74	1,1x10 ⁻⁸	86	5,8x10 ⁻⁸
	30	73	3,2x10 ⁻⁸	5	1,5x10 ⁻⁷	85	8,6x10 ⁻⁸	71	1,2x10 ⁻⁸	83	8,4x10 ⁻⁸
1x10 ⁻⁶	5	80	2,4x10 ⁻⁸	34	2,1x10 ⁻⁸	88	7,3x10 ⁻⁸	75	1,0x10 ⁻⁸	83	8,4x10 ⁻⁸
	10	62	4,5x10 ⁻⁸	7	1,1x10 ⁻⁷	81	1,0x10 ⁻⁷	71	1,2x10 ⁻⁸	81	9,7x10 ⁻⁸
	30	60	4,9x10 ⁻⁸	4	1,9x10 ⁻⁷	78	1,1x10 ⁻⁷	68	1,3x10 ⁻⁸	79	1,1x10 ⁻⁷
5x10 ⁻⁶	5	55	5,6x10 ⁻⁸	33	2,2x10 ⁻⁸	60	1,7x10 ⁻⁷	71	1,2x10 ⁻⁸	69	1,9x10 ⁻⁷
	10	35	9,5x10 ⁻⁸	6	1,3x10 ⁻⁷	52	1,9x10 ⁻⁷	64	1,4x10 ⁻⁸	64	2,6x10 ⁻⁷
	30	33	1,0x10 ⁻⁷	3	2,1x10 ⁻⁷	48	2,1x10 ⁻⁷	61	1,5x10 ⁻⁸	62	2,9x10 ⁻⁷



Slika 30. Lineweaver-Burk-ovi dijagrami za oksidaciju OP pomoću 100 nM MPO na 25 °C

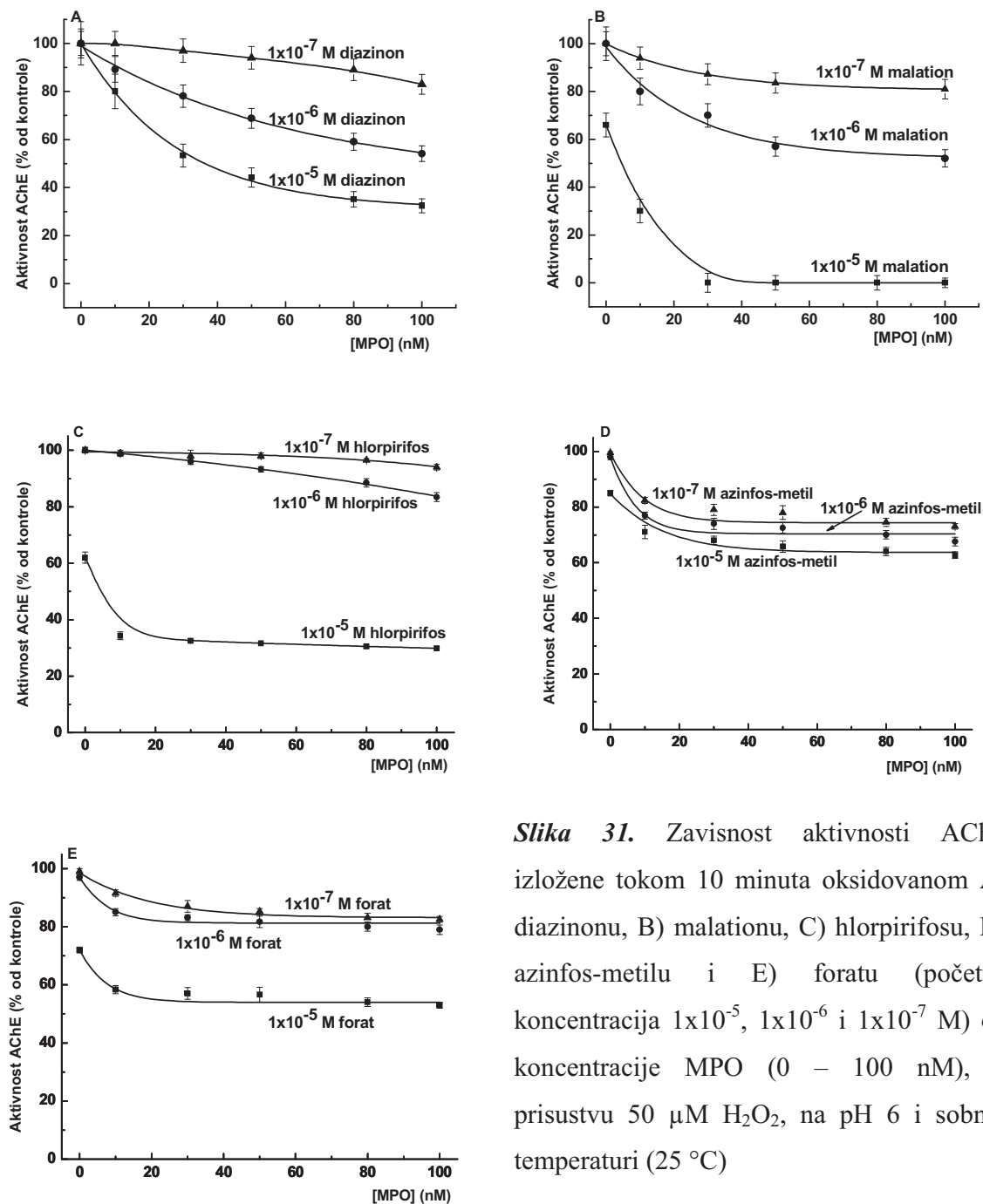
Tabela 14. Početne brzine i kinetičke konstante za oksidaciju OP u prisustvu MPO

Početno jedinjenje	Diazinon	Malation	Hlorpirifos	Azinfos-metil	Forat
C (μM)	V ₀ (μMmin ⁻¹)				
0,1	8,39x10 ⁻⁴	4,77 x10 ⁻³	5,02 x10 ⁻³	1,11 x10 ⁻³	3,24 x10 ⁻³
0,5	3,63 x10 ⁻³	1,27 x10 ⁻²	9,63 x10 ⁻³	1,52 x10 ⁻³	7,85 x10 ⁻³
1	5,85 x10 ⁻³	1,29 x10 ⁻²	1,41 x10 ⁻²	1,63 x10 ⁻³	1,33 x10 ⁻²
5	1,25 x10 ⁻²	1,53 x10 ⁻²	2,73 x10 ⁻²	1,92 x10 ⁻³	3,52 x10 ⁻²
K _m (μM)	2,081	0,256	0,283	0,067	1,367
V _{max} (μMmin ⁻¹)	0,0183	0,0171	0,0188	0,0018	0,0399
k _{cat} (min ⁻¹)	0,183	0,171	0,188	0,018	0,399

Iz rezultata priloženih u Tabeli 14. vidi se da je vrednost K_m najniža za azinfos-metil i iznosi $0,067 \mu\text{M}$, a zatim slede malation, hlörpirifos, forat i diazinon sa vrednostima $0,256$, $0,283$, $1,367$ i $2,081 \mu\text{M}$, respektivno. Budući da je K_m mera afiniteta enzima ka supstratu, iz ovih vrednosti možemo proceniti afinitet MPO ka ispitivanim OP. MPO ima, dakle, najveći afinitet ka azinfos-metilu, a najniži ka diazinonu.

4.2.2.3. Oksidacija OP u zavisnosti od koncentracije MPO

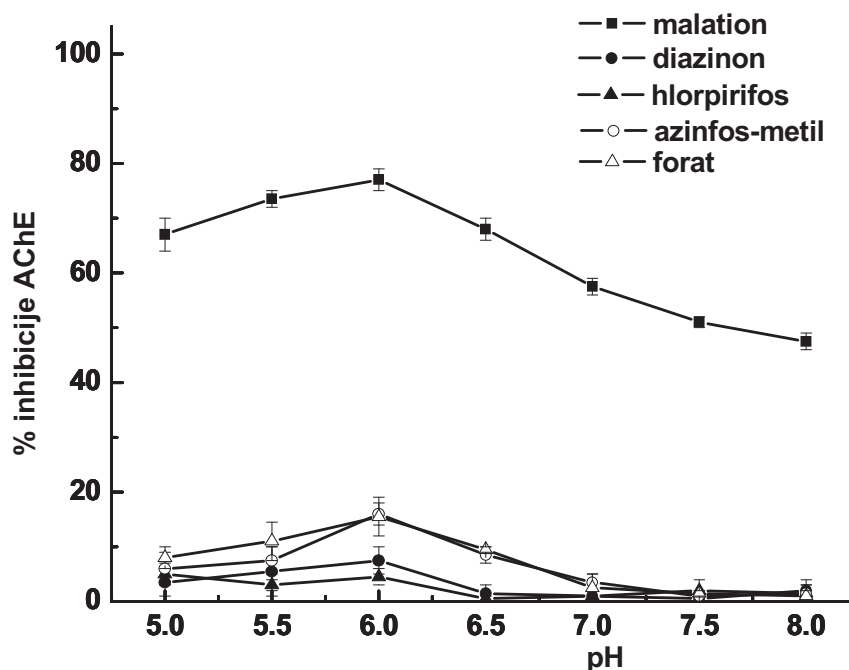
Uticaj koncentracije mijeloperoksidaze u rasponu od 10 do 100 nM na oksidaciju 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ispitivanih organo-tiofosfata određivan je posle 10 minuta inkubacije OP sa MPO. Koncentracija H_2O_2 bila je konstantna ($50 \mu\text{M}$), a oksidacija izvedena na $\text{pH } 6$ i sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Efikasnost oksidacije je praćena pomoću AChE testa, na prethodno opisan način (poglavljje 3.3). Uticaj koncentracije MPO na oksidaciju ispitivanih OP prikazan je na Slici 31. U svim ispitanim slučajevima koncentracije MPO iznad 10 nM dovele su do povećanja inhibicije AChE. Iz prikazanih rezultata se vidi da je inhibicija AChE najveća posle inkubacije ovog enzima sa OP koji su oksidovani u prisustvu 100 nM MPO.



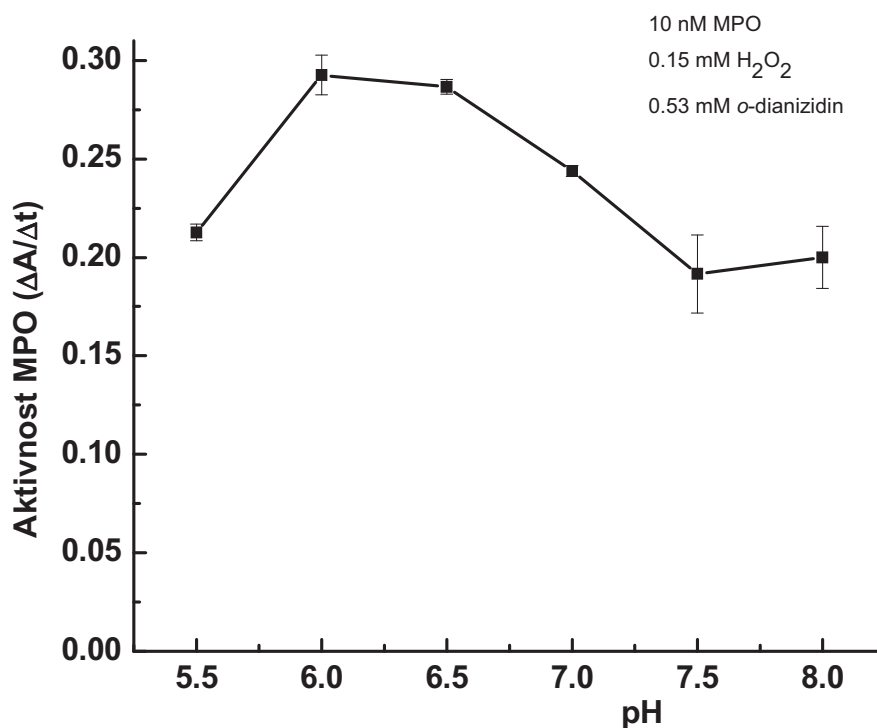
Slika 31. Zavisnost aktivnosti AChE izložene tokom 10 minuta oksidovanom A) diazinonu, B) malationu, C) hlörpirifosu, D) azinfos-metilu i E) foratu (početna koncentracija 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M) od koncentracije MPO (0 – 100 nM), u prisustvu $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, na pH 6 i sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)

4.2.2.4. Oksidacija OP u prisustvu MPO u zavisnosti od pH

U cilju pronalaženja optimalne pH vrednosti za prevođenje ispitivanih organo-tiofosfata u odgovarajuće okso-oblike, pH reakcione smeše je varirano u opsegu od 5,0 do 8,0. Ispitivani organo-tiofosfati koncentracije 1×10^{-7} M inkubirani su 10 minuta sa 100 nM MPO u prisustvu $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ na sobnoj temperaturi. Uticaj pH vrednosti reakcione smeše na oksidaciju OP u prisustvu MPO praćen je AChE testom (poglavlje 3.3). Dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 32. Sa prikazanog grafika vidi se da je optimalna pH vrednost za oksidaciju svih ispitivanih OP u prisustvu MPO 6,0. Ovi rezultati su u saglasnosti sa optimalnom pH vrednošću za aktivnost mijeloperoksidaze (Slika 33), kao i sa rezultatima određivanja optimalne pH vrednosti za oksidaciju drugih jedinjenja u prisustvu MPO [202].



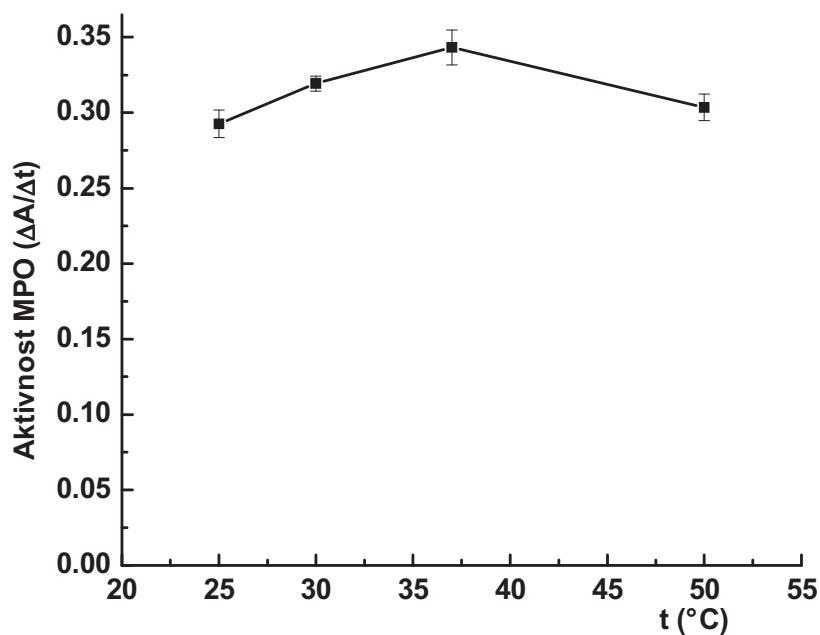
Slika 32. Zavisnost inhibicije AChE u prisustvu OP – okso-formi (nagrađenih inkubacijom 1×10^{-7} M OP u toku 10 minuta sa 100 nM MPO) od pH reakcione smeše



Slika 33. Određivanje optimalne pH vrednosti za aktivnost MPO koncentracije 10 nM

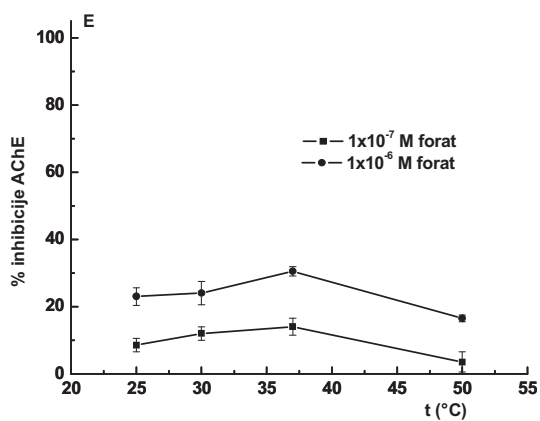
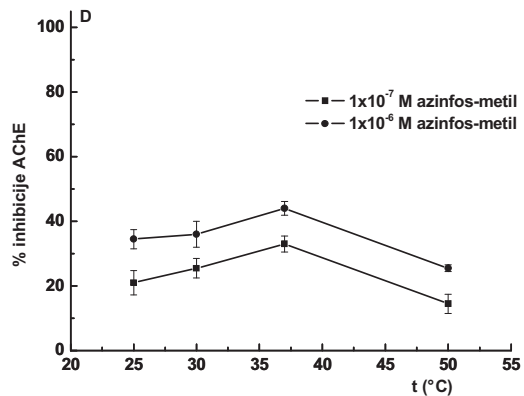
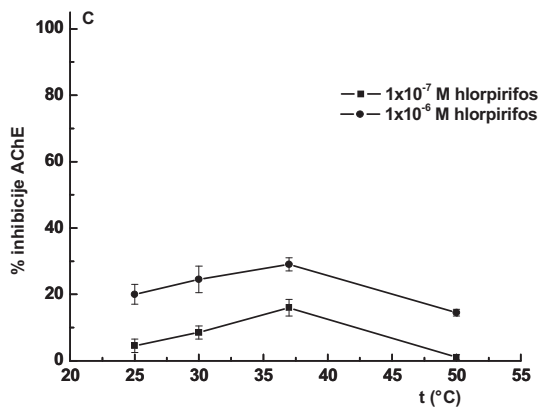
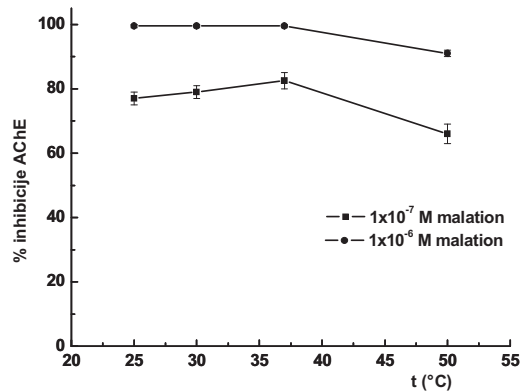
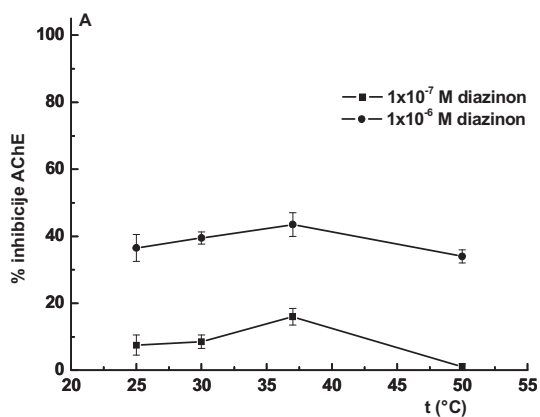
4.2.2.5. Zavisnost oksidacije OP u prisustvu MPO od temperature reakcione smeše

Optimalna temperatura za oksidaciju organo-tiofosfata ispitivana je u opsegu od 25 (sobna temperatura) do 50 °C. Najpre je određena optimalna temperatura za peroksidaznu aktivnost 10 nM MPO na pH 6 i rezultati su prikazani na Slici 34. Sa grafika se vidi da je mijeloperoksidaza najaktivnija na 37 °C, ali i da razlike u aktivnosti na ispitivanim temperaturama nisu velike.



Slika 34. Određivanje optimalne temperature za aktivnost MPO (10 nM) na pH 6

Organo-tiofosfati (diazinon, malation, hlorpirifos, azinfos-metil, forat) koncentracije 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M inkubirani su 10 minuta sa 100 nM MPO u prisustvu $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ u fosfatnom puferu pH 6, a oksidacija je dalje praćena AChE testom. Dobijeni rezultati su predstavljeni na Slici 35. Dati grafici pokazuju da je u slučaju svih ispitivanih OP optimalna temperatura za oksidaciju $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Takođe, efikasnost oksidacije raste za oko 10 % kada se temperatura poveća za $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Ipak, povećanje temperature iznad $37 \text{ }^\circ\text{C}$ dovodi do smanjenja efikasnosti oksidacije. Uprkosu utvrđenom optimumu od $37 \text{ }^\circ\text{C}$, dalja merenja su izvođena na sobnoj temperaturi, budući da se sa grafika na Slici 35. vidi da razlika u efikasnosti oksidacije nije značajna. Ovi rezultati su u saglasnosti sa temperaturnim optimumom koji je određen za aktivnost MPO (Slika 34), kao i sa temperaturnim optimumom za oksidaciju nekih drugih jedinjenja u prisustvu MPO [203].



Slika 35. Uticaj temperature reakcione smeše na inhibiciju AChE u prisustvu oksidovanog A) diazinona, B) malationa, C) hlörpirifosa, D) azinfos-metila i E) forata (početna koncentracija 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M). Oksidacija se odvijala u prisustvu 100 nM MPO, 50 μ M H_2O_2 , tokom 10 minuta, na pH 6.

4.2.2.5.1. Određivanje aktivacione energije oksidacije

Budući da je reakcija oksidacije organo-tiofosfata posmatrana u uslovima pseudo-prvog reda, iz podataka prikazanih u poglavlju 4.2.2.5. bilo je moguće izračunati konstante brzina na različitim temperaturama i prividnu energiju aktivacije za oksidaciju svakog pojedinačnog pesticida. Koncentracije tio-oblika OP određivanje su primenom AChE testa (poglavlje 3.3) i grafika na Slici 19 (kao razlika u koncentraciji početnog OP i nastalog okso-oblika). Konstante brzine reakcije određene su fitovanjem eksperimentanih podataka jednačinom:

$$V_0 = kC_0,$$

gde je V_0 početna brzina reakcije na određenoj temperaturi i za određenu početnu koncentraciju OP, k konstanta brzine reakcije na određenoj temperaturi, a C_0 početna koncentracija OP. Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

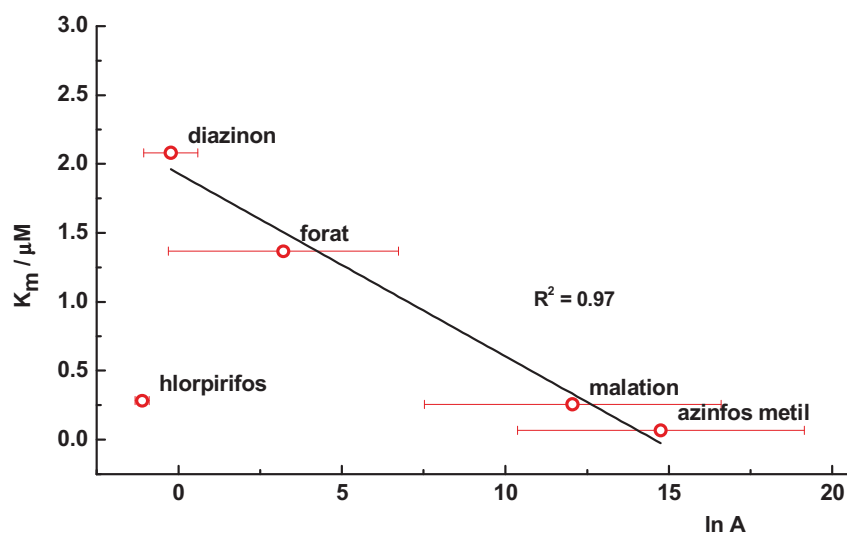
Tabela 15. Konstante brzina na temperaturama 25, 30 i 37 °C i prividne energije aktivacije za oksidaciju ispitivanih OP u prisustvu 100 nM MPO

OP	k (min ⁻¹)			E _a (KJ/mol)
	25 °C	30 °C	37 °C	
Diazinon	(5.07±0.72)×10 ⁻³	(5.35±1.52)×10 ⁻³	(6.15±0.42)×10 ⁻³	12.6±2.1
Malation	(2.62±0.43)×10 ⁻²	(3.00±0.06)×10 ⁻²	(5.19±0.08)×10 ⁻²	45.0±9.9
Hlorpirifos	(1.24±0.45)×10 ⁻²	(1.37±0.76)×10 ⁻²	(1.54±0.26)×10 ⁻²	13.8±0.5
Azinfos-metil	(1.49±0.91)×10 ⁻³	(1.81±1.12)×10 ⁻³	(3.35±1.55)×10 ⁻³	53.0±9.9
Forat	(1.34±0.39)×10 ⁻²	(1.39±0.14)×10 ⁻²	(1.94±0.44)×10 ⁻²	24.5±8.9

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 15. vidi se da konstante brzine oksidacije rastu sa povećanjem temperature, što je i očekivano. Uticaj temperature na brzinu nekog elementarnog reakcionog koraka opisuje Arenijusova jednačina:

$$k=Ae^{-E_a/RT}$$

gde je k konstanta brzine reakcije, A konstanta frekvencije sudara, E_a energija aktivacije, R gasna konstanta ($8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) i T temperature izražena u Kelvinovim stepenima. Iz logaritmovanog oblika ove jednačine i zavisnosti $\ln k$ od $1/T$ određene su vrednosti E_a i date u Tabeli 15. Prividne energije aktivacije se kreću od 12.6 i 13.8 KJ/mol za diazinon i hlorspirifos, dok za forat, malation i azinfos-metil iznose 24.5, 45 i 53 KJ/mol, respektivno. Takođe, dobijene vrednosti su veoma slične energijama aktivacije oksidacija OP sa drugim agensima [204]. Opisno, energija aktivacije je veličina energetske barijere koju reaktanti moraju da savladaju u prelaznom stanju da bi nastao proizvod. Što je temperatura viša, to je veća brzina kretanja molekula, a samim tim i broj sudara u jedinici vremena i energija sudara. Sa povišavanjem temperature povećava se i broj sudara u kojima molekuli imaju dovoljno energije da savladaju energiju aktivacije. Samim tim se povećava i brzina hemijske (enzimske) reakcije. Dakle, što je energija aktivacije manja, to je reakcija brža. Za složene hemijske procese takođe je moguće primeniti Arenijusov izraz, ali je fizički smisao parametara A i E_a drugačiji u odnosu na slučaj kada se posmatra elementarni reakcioni stupanj, a krajnja brzina hemijskog procesa zavisi od odnosa vrednosti predeksponencijalnog faktora A i vrednosti prividne E_a . Slično različitim vrednostima prividne energije aktivacije, vrednost A za oksidaciju OP pomoću MPO se nalazi u širokom intervalu vrednosti ($-1 < \ln A < 15$). S obzirom da je za elementarni reakcioni korak vrednost A u vezi sa frekvencijom sudara reagujućih vrsta pretpostavljeno je da se vrednost predeksponencijalnog faktora u Arenijusovom izrazu može povezati sa afinitetom MPO prema odgovarajućem OP, opisanom pomoću vrednosti Mihelis-Mentenove konstante K_m (Slika 36).



Slika 36. Korelacija vrednosti K_m i lnA za sve ispitivane OP

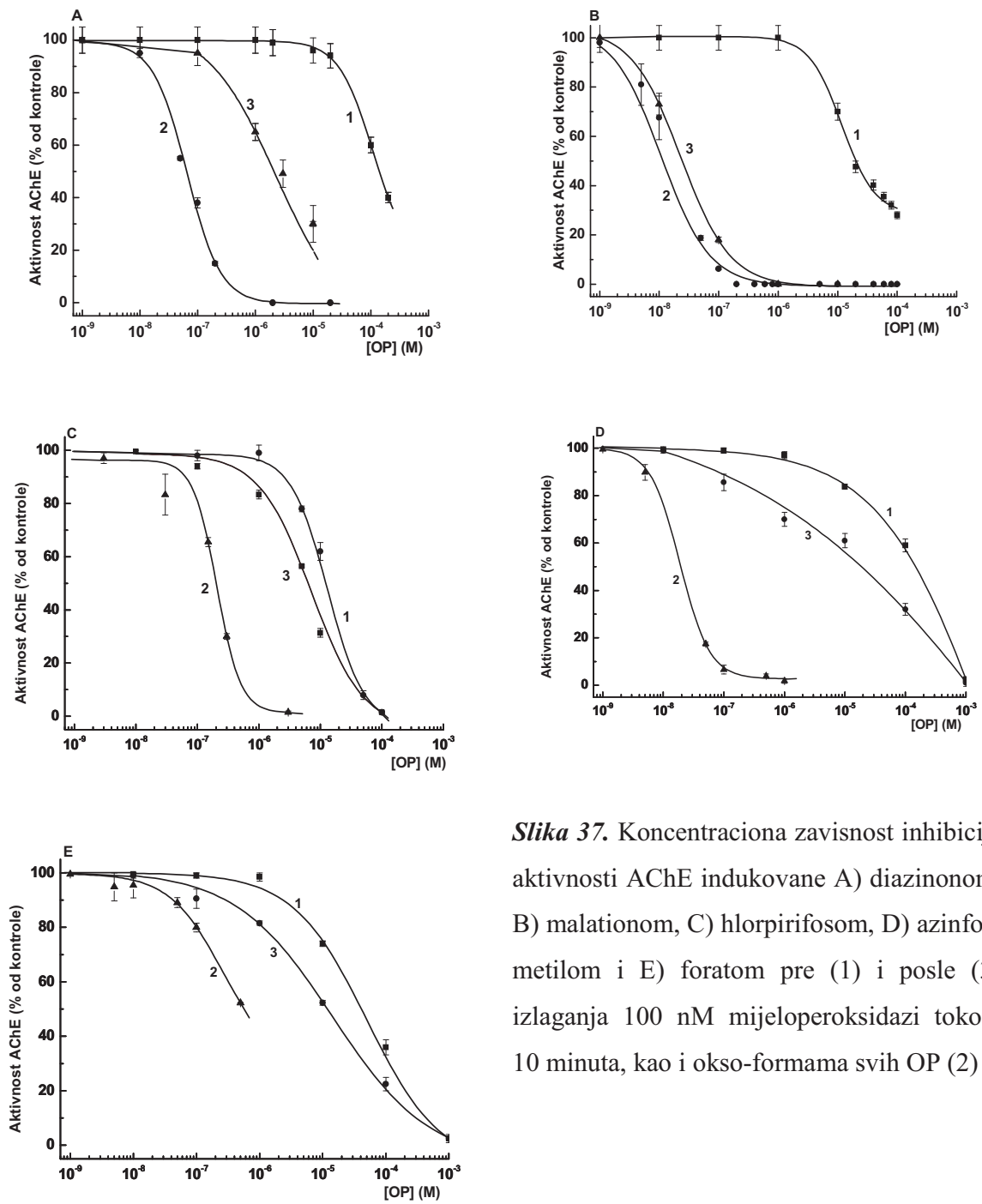
Svi ispitivani OP, izuzev hlörpirifosa, pokazuju da obrnutu korelaciju lnA i K_m. U slučaju hlörpirifosa nađena je mala prividna E_a, dok uprkos maloj vrednosti predeksponencijalnog faktora A pokazuje vrlo veliku brzinu oksidacije pomoću MPO koja takođe ima veliki afinitet prema ovom OP.

4.2.3. Primena utvrđenih optimalnih uslova oksidacije OP u prisustvu MPO u modifikaciji AChE testa za detekciju OP

Po određivanju optimalnih uslova za oksidaciju organofosfata u prisustvu MPO, ispitana je inhibicija AChE pomoću oksidovanih organo-tiofosfata u opsegu koncentracija od 1x10⁻³ do 1x10⁻⁹ M. Rezultati su prikazani zajedno sa inhibicionim krivama pojedinačnih tio- (krive 1) i okso-oblika (krive 2) organofosfata na Slici 37. Na inhibicionim krivama se vidi da su okso-oblici za dva do tri reda veličine jači inhibitori od

tio-oblika pod istim eksperimentalnim uslovima. Uzorci organo-tiofosfata oksidovanih u prisustvu MPO pod optimalnim uslovima (10 minuta inkubacije sa 100 nM MPO u prisustvu 50 μ M H₂O₂ na sobnoj temperaturi u 50 mM fosfatnom puferu pH 6) takođe su pod istim eksperimentalnim uslovima (poglavlje 3.3) bili inkubirani sa AChE. % aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu posle inkubacije sa oksidovanim uzorcima OP u zavisnosti od njihove koncentracije prikazana je krivama 3 na Slici 37. Jasno se vidi da se posle inkubacije organo-tiofosfata sa MPO inhibicione krive (krive 3) pomeraju ka nižim opsezima koncentracija u odnosu na početna jedinjenja, tj. tio-oblike (krive 1), i to za jedan do tri reda veličine. Ova pojava može se pripisati formiranju odgovarajućih okso-oblika.

U Tabeli 16. prikazane su IC₅₀ vrednosti za oksidovane oblike ispitivanih organo-tiofosfata dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka sigmoidnom krivom. Poređenjem dobijenih IC₅₀ vrednosti sa IC₅₀ vrednostima za tio-oblike odgovarajućih OP iz Tabele 8. (poglavlje 4.1.1.), vidi se da je pomeranje najveće za malation, gde je IC₅₀ oksidovanog uzorka oko 1000 puta manja u odnosu na tio-oblik. Kod diazinona IC₅₀ oksidovanog oblika je oko 100 puta manja, kod hlörpirifosa oko 30 puta, kod azinfos-metila 10 puta, dok je kod forata IC₅₀ svega 2,5 puta manja u odnosu na neoksidovani organo-tiofosfat. Iz toga se može zaključiti da je prevođenje malationa u malaokson u prisustvu MPO najviše doprinelo sniženju nivoa detekcije pomoću ove metode, dok prevođenje forata u forat-okson ima najmanji efekat.

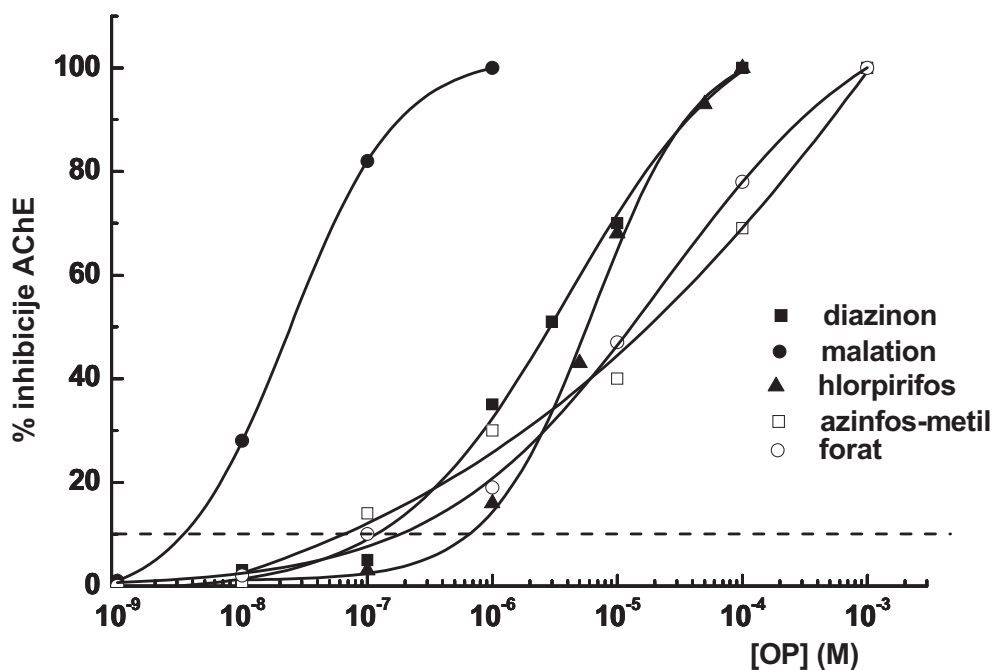


Slika 37. Koncentraciona zavisnost inhibicije aktivnosti AChE indukovane A) diazinonom, B) malationom, C) hlörpirifosom, D) azinfos-metilmom i E) foratom pre (1) i posle (3) izlaganja 100 nM mijeloperoksidazi tokom 10 minuta, kao i okso-formama svih OP (2)

Tabela 16. IC₅₀ vrednosti dobijene fitovanjem eksperimentlnih podataka sigmoidnom krivom za organofosfate oksidovane u prisustvu 100 nM MPO i 50 μM H₂O₂ tokom 10 minuta, na sobnoj temperaturi u 50 mM fosfatnom puferu pH 6

OP	IC ₅₀ (M)
Oksidovani diazinon	(2,10±0,95)x10 ⁻⁶
Oksidovani malation	(2,45±0,55)x10 ⁻⁸
Oksidovani hlörpirifos	(6,38±0,85)x10 ⁻⁶
Oksidovani azinfos-metil	(1,82±0,35)x10 ⁻⁵
Oksidovani forat	(1,14±0,05)x10 ⁻⁵

Oksidacija OP u prisustvu MPO pri optimizovanim uslovima može se upotrebiti za određivanje koncentracije organo-tiofosfata u uzorcima. Iz rezultata prikazanih na Slici 37. konstruisani su kalibracioni grafici za određivanje početnih koncentracija svih ispitivanih organo-tiofosfata i prikazani na Slici 38. Pomoću njih je moguće odrediti početnu koncentraciju organo-tiofosfata u uzorku na osnovu inhibicije aktivnosti AChE. To načelno važi samo za koncentracije OP < 10⁻⁶ M, tj. koncentracije tio-oblika pri kojima ne dolazi do inhibicije AChE, kako bismo bili sigurni da inhibicija AChE potiče samo od oksona. Ovo nije ograničavajući faktor za metodu, jer u realnim uzorcima relevantan opseg koncentracija OP i jeste < 10⁻⁶ M.



Slika 38. Kalibracioni grafici za određivanje početne koncentracije organo-tiofosfata u uzorku kada je utvrđeno koliko je njime inhibirana AChE

Podaci na Slici 38. omogućavaju određivanje i granice detekcije metode (koncentracija OP pri kojoj je aktivnost AChE inhibirana za 10%). U Tabeli 17. prikazane su koncentracije svakog od ispitivanih OP pri kojima dolazi do 10% inhibicije aktivnosti AChE.

Tabela 17. Limit detekcije (LD) metode za svaki od određivanih organo-tiofosfata posle oksidacije uzoraka u prisustvu MPO

OP	LD (M)
Diazinon	$(1,17 \pm 0,05) \times 10^{-7}$
Malation	$(3,40 \pm 0,05) \times 10^{-9}$
Hlorpirifos	$(6,61 \pm 0,05) \times 10^{-7}$
Azinfos-metil	$(6,53 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
Forat	$(1,85 \pm 0,05) \times 10^{-7}$

Iz prikazanog se vidi da je ovom metodom moguće detektovati najniže koncentracije malationa, reda veličine 1×10^{-9} M.

4.2.3.1. Određivanje efikasnosti oksidacije OP pomoću modifikovanog AChE testa

Na osnovu dobijenih rezultata AChE testa i UPLC analize određena je efikasnost oksidacije OP u prisustvu MPO. Ispitani su rastvori OP koncentracije 1×10^{-5} M, koji su oksidovani na način opisan u poglavlju 3.4, a čiji su UPLC hromatogrami prikazani na Slikama 21-25. Efikasnost oksidacije je određena kao odnos koncentracije nastalog okso-oblika i početnog tio-oblika. Koncentracije OP određivane su paralelno pomoću AChE testa na osnovu grafika datog na Slici 37. i UPLC analize. Rezultati su prikazani u Tabeli 18. U prisustvu MPO najefikasnija je oksidacija malationa, a zatim slede hlorpirifos, diazinon, forat i azinfos-metil.

Tabela 18. Efikasnost oksidacije (odnos koncentracije nastalog okso-oblika i početne koncentracije tio-oblika) OP početne koncentracije 1×10^{-6} M posle 10 minuta inkubacije sa 100 nM MPO određena pomoću UPLC analize i AChE testa.

OP	$C_{\text{tio-oblik}} (\times 10^{-7} \text{ M})$		$C_{\text{okso-oblik}} (\times 10^{-7} \text{ M})$		Efikasnost (%)	
	AChE test	UPLC	AChE test	UPLC	AChE test	UPLC
Diazinon	9,57±0,09	8,31±0,08	0,42±0,06	1,68±0,09	4	16
Malation	6,80±0,07	5,50±0,09	3,20±0,08	4,50±0,09	32	45
Hlorpirifos	9,08±0,05	8,19±0,04	0,92±0,08	1,81±0,05	9	18
Azinfos- metil	9,88±0,09	9,30±0,09	0,11±0,06	0,70±0,07	1	7
Forat	9,00±0,05	9,10±0,06	1,00±0,07	0,90±0,05	10	9

4.2.3.2. Uticaj smeše organofosfata na aktivnost AChE u nativnom obliku

Da bi se utvrdilo da li ispitivani organofosfati imaju sinergističko dejstvo, ispitan je uticaj njihove smeše na aktivnost AChE. Određena je aktivnost AChE koja je inkubirana sa sintetičkim smešama koje su sadržale neoksidovane i oksidovane OP. Smeše su sadržale jednake koncentracije svih ispitivanih OP, i to po 2×10^{-6} , 2×10^{-7} i 2×10^{-8} M. Ispitivane smeše su inkubirane 10 minuta sa 100 nM MPO. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli

19. i upoređene sa ranije dobijenim rezultatima za pojedinačne organo-tiofosfate istih koncentracija.

Tabela 19. Uticaj pojedinačnih organo-tiofosfata i sintetičke smeše pre i posle oksidacije u prisustvu 100 nM MPO na aktivnost AChE (vrednosti u tabeli su date kao srednja vrednost tri merenja)

OP	Inhibicija AChE (% od kontrole)						
	C _{početna} (M)	neokisidovano			okisidovano		
		2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁸
Diazinon	0	0	0	20	5	0	
Malation	15	0	0	100	91	40	
Hlorpirifos	8	0	0	23	1	0	
Azinfos- metil	7	0	0	32	19	2	
Forat	10	0	0	30	7	0	
Smeša*	11	0	0	66	29	10	

*Jednake koncentracije svakog pojedinačnog OP (po 2x10⁻⁶, 2x10⁻⁷ i 2x10⁻⁸ M)

Ukoliko mešanje ispitivanih organofosfata nema nikakav efekat na inhibicioni potencijal svake pojedinačne komponente iz smeše, procenat inhibicije AChE koji indukuje smeša trebalo bi da bude jednak zbiru inhibicija koje izazivaju pojedinačne komponente u koncentracijama istim kao u datoj smeši. Ukoliko je inhibicija AChE posle inkubacije enzima sa smešom manja od zbira inhibicija pojedinačnim OP, znači da se javlja

antagonistički efekat, dok je u slučaju da je veća reč o sinergizmu. U Tabeli 19. prikazane su srednje vrednosti tri merenja inhibicije aktivnosti AChE indukovane oksidovanim i neoksidovanim pojedinačnim OP i njihovom smešom. Za poređenje matematičkog zbira inhibicija izazvanih pojedinačnim OP sa inhibicijama izazvanim sintetičom smešom primenjen je test za analizu varijanse (One-way ANOVA). Antagonistički efekat se definiše kao statistički značajna razlika ($P < 0,05$) između inhibicija izazvanim smešom OP i inhibicije dobijene sabiranjem pojedinačnih uticaja OP na enzim. Primenom testa za analizu varijanse je utvrđeno da je zbir procenata inhibicije aktivnosti AChE pojedinačnim komponentama značajno veći od procenta inhibicije koja potiče od sintetičke smeše ispitivanih OP u istim koncentracijama. Iz toga sledi zaključak da ispitivana jedinjenja u smeši ispoljavaju antagonistički efekat.

4.3. Oksidacija OP elektrohemijski generisanim Cl_2 , Br_2 i I_2

Cilj ovog dela rada bilo je generisanje halogena iz 0,1 M rastvora Cl^- , Br^- ili I^- , koji bi se zatim upotrebili za oksidaciju organo-tiofosfata, čime bi se postigli veća efikasnost oksidacije, veći stepen inhibicije AChE i snizio nivo detekcije OP.

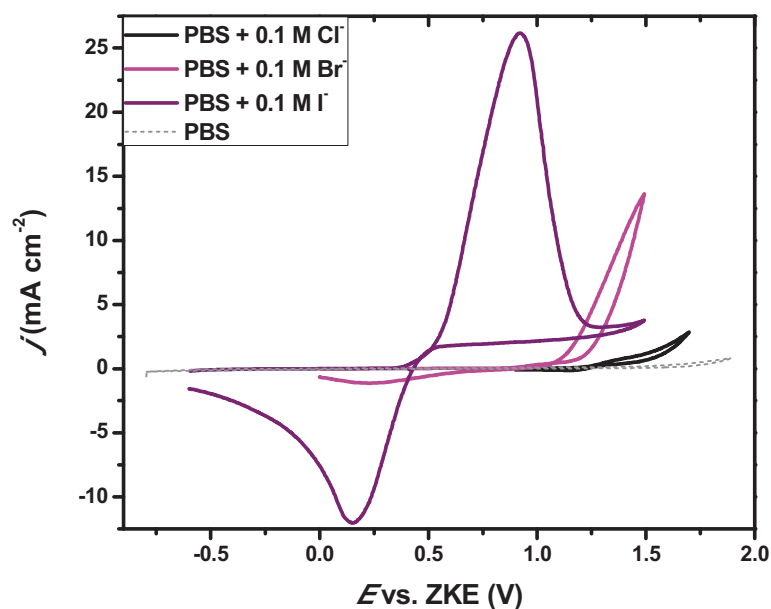
4.3.1. Elektrohemijsko generisanje halogena na elektrodi od staklastog ugljenika

Elektrohemijsko generisanje halogena moguće je ispitati tehnikom ciklične voltametrije (Slika 39). Dobijeni rezultati ukazuju da je, u saglasnosti sa vrednostima standardnih redoks-potencijala za reakciju $\text{X}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{X}^-$ (Tabela 20), jodid najpodložniji oksidaciji, dok je za generisanje značajnije količine Cl_2 potrebna duboka anodna polarizacija.

Tabela 20. Standardni elektrodni potencijali za reakciju $X_2 + 2e \rightarrow 2X^-$ [205]

Reakcija	E^0 / V vs. SVE*
$Cl_2 + 2e \rightarrow 2Cl^-$	+1,358
$Br_2 + 2e \rightarrow 2Br^-$	+1,066
$I_2 + 2e \rightarrow 2I^-$	+0,563

* SVE – standardna vodonična elektroda



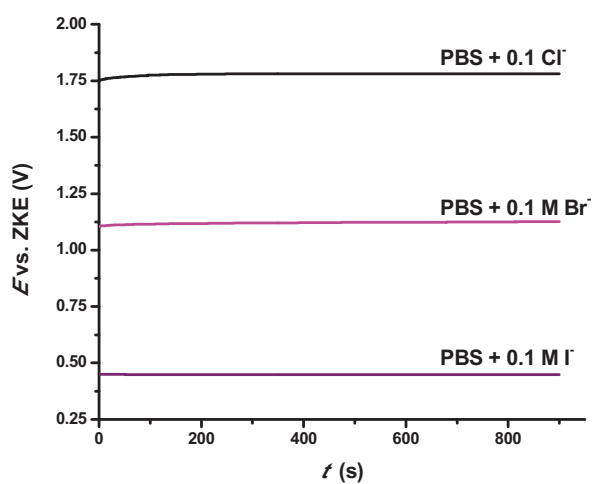
Slika 39. Ciklovoltamogrami rastvora 50 mM PBS + 0,1 M X^- ($X^- = Cl^-, Br^-, I^-$), brzina polarizacije 50 mV s^{-1} .

Hronopotenciometrijski eksperimenti (Slika 40.) takođe ukazuju na navedeni trend. Prema Tabeli 20, elektrohemijski generisani halogeni predstavljaju moćna oksidaciona sredstva koja mogu da oksiduju organo-tiofosfate u slučaju da su prisutni u rastvoru.

Međutim, sami eletrogenisani halogeni se u vodenoj sredini disproporcionišu prema jednačini reakcije:



Ravnoteža date reakcije je pomeren u smeru reaktanata i to najviše kod joda (Tabela 21).



Slika 40. Hronopotenciogrami rastvora 50 mM PBS + 0,1 M X⁻ (X⁻ = Cl⁻, Br⁻, I⁻), $j = 2 \text{ mA cm}^{-2}$

Tabela 21. Standardne konstante ravnoteže za reakciju disproporcionisanja $X_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + X^- + HXO$ [206]

Reakcija	K^0
$Cl_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + Cl^- + HClO$	$3 \cdot 10^{-4}$
$Br_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + Br^- + HBrO$	$6 \cdot 10^{-9}$
$I_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + I^- + HIO$	$3 \cdot 10^{-13}$

Reaktivnost nastalog X_2 u smislu pomenute reakcije disproporcionisanja je lako uočljiva sa ciklovoltamograma ispitivanih rastvora (Slika 39). Naime, povratni pik u smeru katodne polarizacije je najizraženiji kod rastvora koji sadrži I^- , dok je kod rastvora hlorida skoro potpuno odsutan. Nastale kiseline tipa HXO su vrlo slabe, ali i same predstavljaju vrlo moćna oksidaciona sredstva, pri čemu je, posmatrajući vrednosti standardnih redoks-potencijala u kiseljoj sredini (Tabela 22), najpotentnije oksidaciono sredstvo HClO, a najslabije HIO.

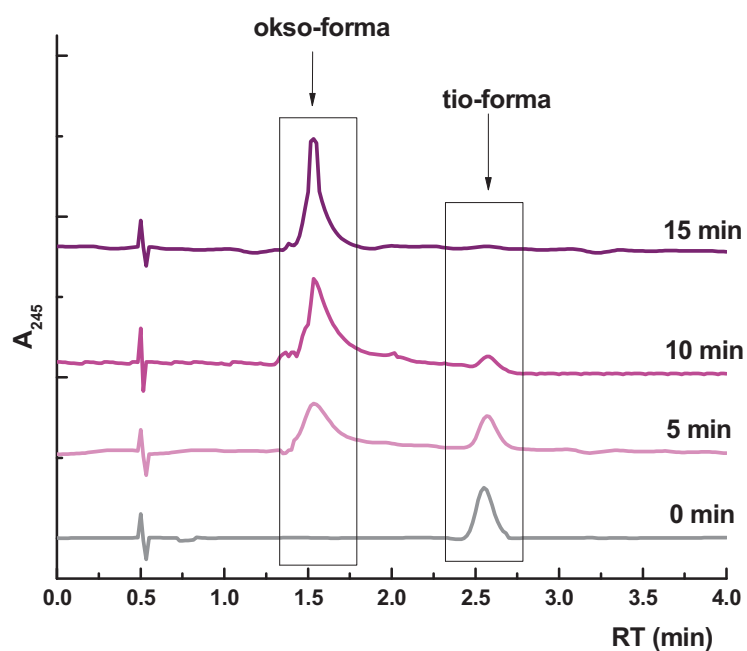
Tabela 22. Standardni elektrodni potencijali za redoks-reakcije HXO vrsta u kiseljoj sredini [206]

Reakcija	E^0 / V vs. SVE
$2HClO + 2H^+ + 2e \rightarrow Cl_2 + 2H_2O$	+1,63
$HClO + H^+ + 2e \rightarrow Cl^- + H_2O$	+1,49
$2HBrO + 2H^+ + 2e \rightarrow Br_2 + 2H_2O$	+1,59
$HBrO + H^+ + 2e \rightarrow Br^- + H_2O$	+1,07
$2HIO + 2H^+ + 2e \rightarrow I_2 + 2H_2O$	+1,45
$HIO + H^+ + 2e \rightarrow I^- + H_2O$	+0,54

Za razliku od HClO, koja je stabilna u vodenoj sredini, HBrO i HIO su vrlo reaktivne i praktično ne mogu ni da se izoluju u čistom obliku [206]. Dakle, kao konačan rezultat elektrohemijskog generisanja X_2 u vodenoj sredini, pored samog X_2 dobijaju se u izvesnoj količini reaktivne vrste tipa HXO koje pored X_2 takođe mogu da oksiduju prisutan organo-tiofosfat. Imajući u vidu navedene vrednosti standardnih redoks potencijala, stabilnosti X_2 u smislu disproporcionisanja u X^- i HXO i reaktivnosti HXO, pretpostavljeno je da najefikasnija oksidacija organo-tiofostata u odgovarajuće okso-oblike može da se očekuje u slučaju oksidacije elektrognerisanim Br_2 , što je kasnije i potvrđeno.

4.3.2. Oksidacija OP elektrognerisanim X₂ (X = Cl, Br, I)

U preliminarnim eksperimentima oksidacija organo-tiofosfata u odgovarajuću okso-formu u toku elektrohemijskog tretmana rastvora organo-tiofosfata bila je praćena pomoću UPLC-a, pri čemu je uočena efikasna transformacija tio-forme u okso-formu. Na primeru oksidacije 1×10^{-5} M rastvora diaziona elektrognerisanim Br₂ (Slika 41) može se uočiti da nakon 15 minutnog anodnog tretmana rastvora pri ranije navedenim uslovima (odjeljak 3.8.) koncentracija diazinona pada ispod granice detekcije UPLC-a, dok paralelno sa smanjenjem hromatografskog signala diazinona raste signal diazoksona. Nakon 15 min anodnog tretmana u rastvoru je detektovan jedino diazokson (Tabela 23). Pored toga, važno je napomenuti da degradacija nastalog proizvoda nije uočena nakon 2 sata po izvršenom elektroodnom tretmanu. Efekat anodnog tretmana na proizvode oksidacije (okso-forme) ispitana je merenjem inhibicije AChE anodno tretiranim rastvorom okso-formi ispitivanih organo-tiofosfata. AChE testom (odjeljak 3.3) nije utvrđena razlika u stepenu inhibicije koju daje rastvor odgovorajućeg okso-oblika ispitivanih organo-tiofosfata pre i nakon 15 min anodnog tretmana, što znači da ovakav tretman ne dovodi do promena u strukturi ispitivanih oksona. Na osnovu pomenutih preliminarnih rezultata zaključeno je da oksidacija organo-tiofosfata anodno generisanim X₂ predstavlja relativno lak i jednostavan način za oksidaciju ispitivanih organo-tiofosfata u okso-oblike, čime se značajno snižava njihova granica detekcije.

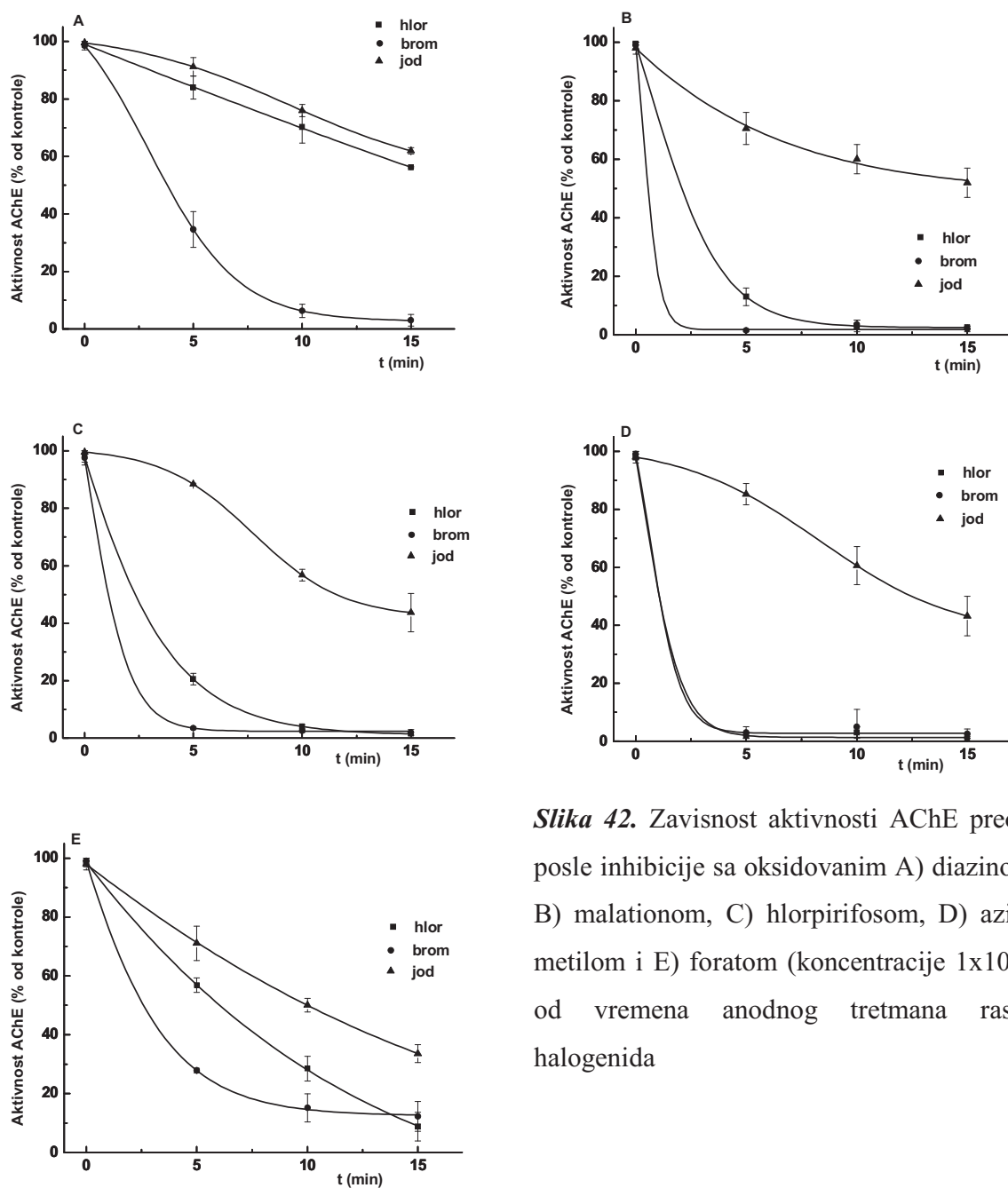


Slika 41. UPLC hromatogrami 1×10^{-5} M rastvora diazinona u toku elektrohemijske oksidacije pomoću elektrognerisanog Br_2

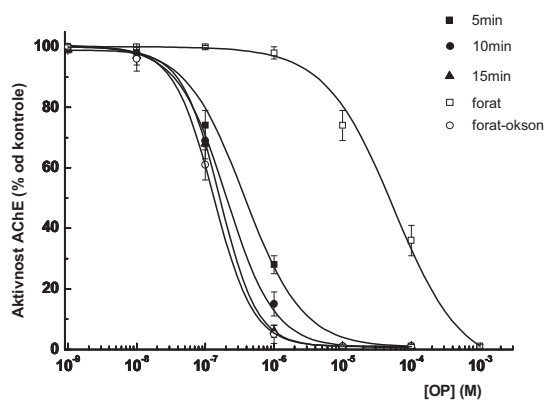
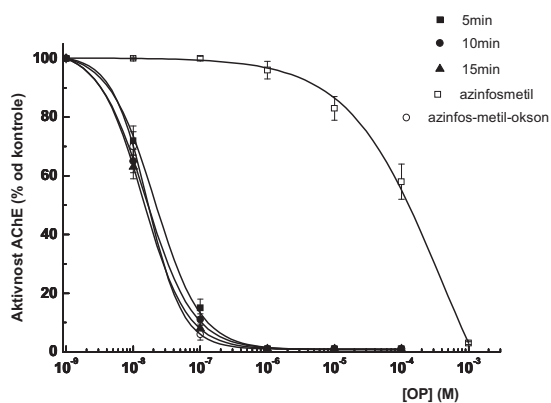
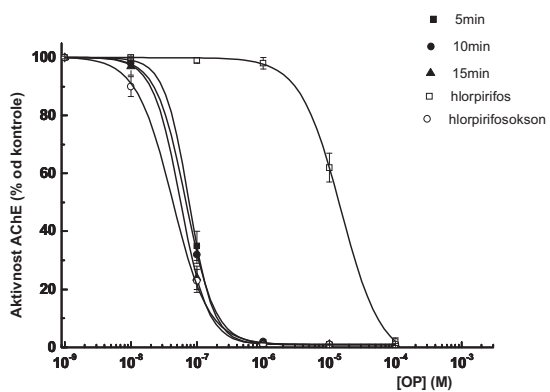
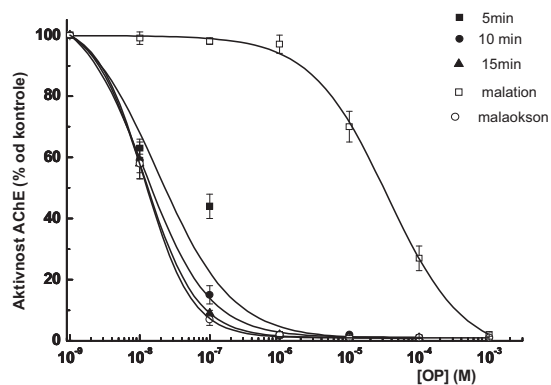
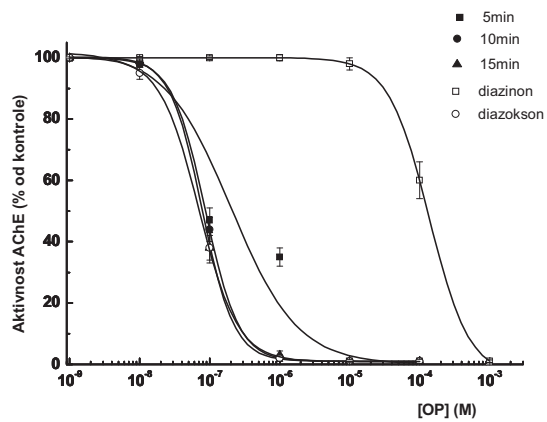
Tabela 23. Koncentracije diazinona i diazoksona u reakcionj smeši posle inkubacije diazinona sa elektrohemijski generisanim bromom tokom 0, 5, 10 i 15 minuta određene UPLC analizom pomoću kalibracionih grafika datih u prilogu (Slika P2).

$t_{\text{inkubacije}} \text{ (min)}$	$C_{\text{diazinon}} \text{ (M)}$	$C_{\text{diazokson}} \text{ (M)}$
0	$1,00 \times 10^{-5}$	0
5	$(0,90 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(0,12 \pm 0,05) \times 10^{-5}$
10	$(0,75 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(0,26 \pm 0,05) \times 10^{-5}$
15	$(0,01 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(0,98 \pm 0,05) \times 10^{-5}$

Diazinon, malation, hlorpirifos, azinfos-metil i forat (koncentracija od 1×10^{-3} do 1×10^{-9} M) oksidovani su pomoću elektrohemijski generisanih hlora, broma i joda na prethodno opisan način (poglavlje 3.8.) u ukupnoj zapremini od 20 mL. Oksidacija je praćena u toku vremena elektrolize uzimanjem jednakih alikvota zapremine 400 μ L na početku eksperimenta i nakon 5, 10 i 15 min. Nakon tog vremena, višak elektrognerisanog halogena uklonjen je dodatkom 10 μ L 0,1 M rastvora $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Količina nastalih odgovarajućih okso-oblika praćena je pomoću AChE testa (poglavlje 3.3). Iz literature je poznato [143], a na osnovu preliminarnih eksperimenata potvrđeno da dodatak $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ne utiče na rezultate AChE testa. Svi eksperimenti su rađeni na sobnoj temperaturi i čuvani na ledu do trenutka analize. Rezultati su prikazani na Slikama 42, 43 i 44. Slika 42. sadrži grafike na kojima su prikazane zavisnosti stepena oksidacije ispitivanih organofosfata koncentracije 1×10^{-6} M od vremena anodnog tretmana rastvora halogenida. Iz prikazanog se vidi da oksidacija pomoću generisanog joda ne vodi potpunoj inhibiciji AChE ni nakon 15 minuta anodnog tretmana, kao i hlorom u slučaju diazinona. Primenom hlora u slučaju forata, bilo je dovoljno i 10 minuta da se dostigne isti stepen oksidacije kao u slučaju kada je primenjen jod, u skladu sa tim da su hlorne vrste nastale anodnim tretmanom jaća oksidaciona sredstva od jodnih analoga. Kod oksidacije elektrohemijski generisanim bromom za isti efekat bilo je dovoljno 5 minuta za prevođenje malationa, hlorpirifosa i azinfos-metila u odgovarajuće okso-oblike i potpunu inhibiciju AChE, a za diazinon i forat bilo je potrebno 10 minuta. Ovi rezultati prikazani su i na Slici 43.



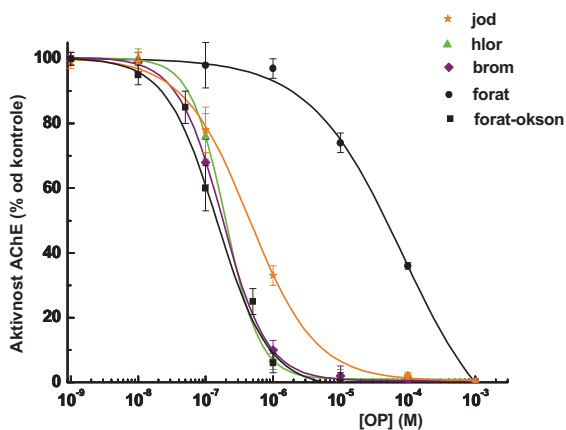
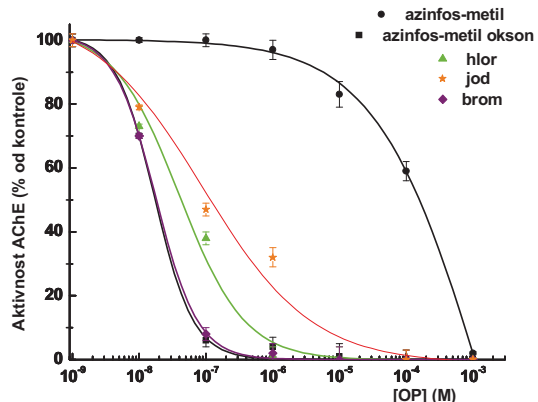
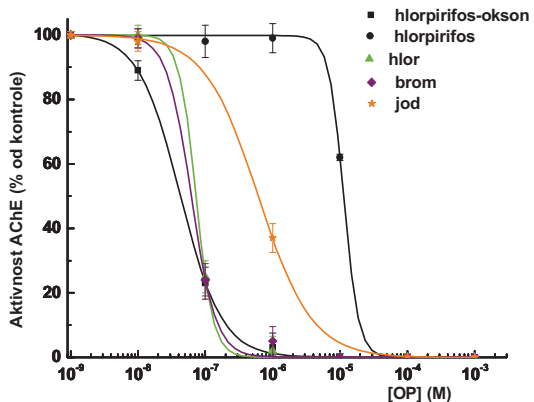
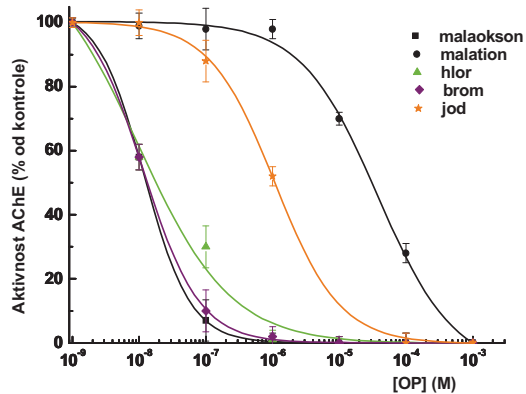
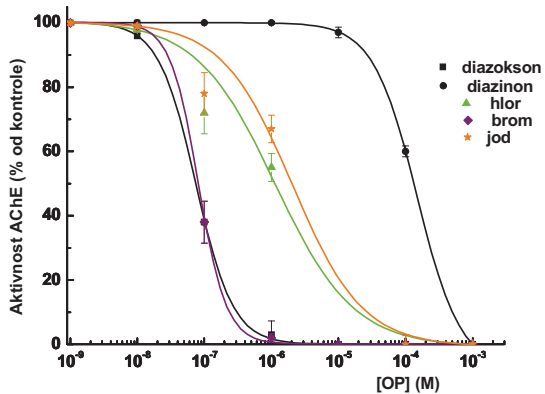
Slika 42. Zavisnost aktivnosti AChE preostale posle inhibicije sa oksidovanim A) diazinonom, B) malationom, C) hlorpirifosom, D) azinfos-metilom i E) foratom (koncentracije 1×10^{-6} M) od vremena anodnog tretmana rastvora halogenida



Slika 43. Inhibicione krive tio- i okso-oblika ispitivanih OP, kao i okso-oblika dobijenih tokom 5, 10 i 15 minuta anodnog tretmana tio-oblika

U cilju lakšeg poređenja dobijenih rezultata, na Slici 44. prikazane su inhibicione krive svih ispitivanih organofosfata, kako oksidovanih 15 minuta pomoću elektrohemijski generisanih halogena, tako i komercijalnih tio- i okso-formi OP. Iz prikazanog se jasno vidi da je u svim slučajevima došlo do pomaranja inhibicionih krivih ka okso-oblicima, kao i da je najefikasnija oksidacija postignuta upotrebom generisanog broma, što je u skladu sa ranije iznesenim zaključcima (Slika 42). Najmanji stepen oksidacije OP dobijen je oksidacijom pomoću joda, dok se generisani hlor uvek ponašao kao bolji oksidans od joda, a u slučaju hlorspirifosa i forata oksidovao OP jednako efikasno kao brom.

Iz podataka prikazanih na Slici 44. određene su vrednosti IC_{50} za okso-forme dobijene oksidacijom OP u prisustvu halogena i prikazane u Tabeli 24. Iz datih vrednosti jasno se može zaključiti da je elektrogenerisani Br_2 najpotentniji oksidans u ovoj grupi pod datim uslovima za sve ispitivane OP. Kada se ove vrednosti uporede sa IC_{50} vrednostima za tio-oblike odgovarajućih OP iz Tabele 8. (poglavlje 4.1.1.), vidi se da je promena najveća za azinfos-metil, gde je IC_{50} oko 10000 puta manje za uzorak oksidovan elektrogenerisanim bromom u toku 15 minuta. Za diazinon, malation i hlorspirifos IC_{50} se smanjilo oko 1000 puta, a u slučaju forata oko 400 puta u odnosu na neoksidovani uzorak.

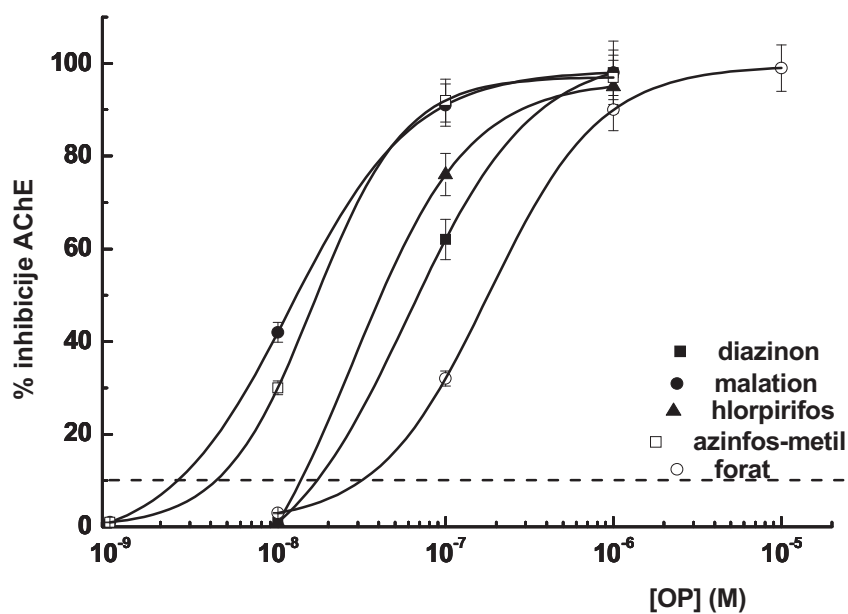


Slika 44. Inhibicione krive tio- i okso-oblika ispitivanih OP, kao i okso-oblika dobijenih oksidacijom tio-oblika tokom 15 minuta pomoću elektrohemijski generisanih hlora, broma i joda

Tabela 24. IC₅₀ vrednosti za ispitivane OP oksidovane pomoću elektrohemijski generisanih hlora, broma i joda

OP	IC ₅₀ (M)		
	Cl ₂	Br ₂	I ₂
Oksidovani diazinon	$(1,00 \pm 0,51) \times 10^{-6}$	$(8,17 \pm 0,96) \times 10^{-8}$	$(2,06 \pm 0,23) \times 10^{-6}$
Oksidovani malation	$(1,79 \pm 0,35) \times 10^{-8}$	$(1,39 \pm 0,74) \times 10^{-8}$	$(1,07 \pm 0,31) \times 10^{-6}$
Oksidovani hlorspirifos	$(7,50 \pm 0,78) \times 10^{-8}$	$(6,14 \pm 0,55) \times 10^{-8}$	$(6,21 \pm 0,28) \times 10^{-7}$
Oksidovani azinfos-metil	$(4,11 \pm 0,91) \times 10^{-8}$	$(1,80 \pm 0,12) \times 10^{-8}$	$(1,15 \pm 0,58) \times 10^{-7}$
Oksidovani forat	$(2,04 \pm 0,34) \times 10^{-7}$	$(1,82 \pm 0,39) \times 10^{-7}$	$(4,53 \pm 0,53) \times 10^{-7}$

Kao i u slučaju oksidacije OP u prisustvu MPO, pomoću podataka prikazanih na Slici 44. moguće je konstruisati kalibracione grafike za određivanje početnih koncentracija ispitivanih OP u uzorcima. Grafici su prikazani na Slici 45. Iz ovih grafika takođe su određene i granice detekcije metode (koncentracija OP koja inhibira aktivnost AChE za 10%) posle oksidacije uzoraka pomoću elektorgenerisanog broma i prikazane u Tabeli 25.



Slika 45. Kalibracioni grafici za određivanje početne koncentracije OP u uzorku oksidovanom elektrogenisanim bromom ako je poznato koliko je njime inhibirana AChE

Tabela 25. Limit detekcije metode za svaki od određivanih organo-tiofosfata posle oksidacije pomoću elektrohemijski generisanog broma

OP	LD (M)
Diazinon	$(1,74 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
Malation	$(2,50 \pm 0,05) \times 10^{-9}$
Hlorpirifos	$(1,30 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
Azinfos-metil	$(4,38 \pm 0,05) \times 10^{-9}$
Forat	$(3,28 \pm 0,05) \times 10^{-8}$

4.4. Poređenje efekta oksidacije OP različitim metodama na njihovo određivanje pomoću AChE testa

Kako bi se uporedile enzimsko i oksidacija OP pomoću elektrognerisanih halogena, IC₅₀ vrednosti dobijene pod optimalnim uslovima oksidacije u oba slučaja prikazane su u Tabeli 26.

Tabela 26. IC₅₀ vrednosti za ispitivane OP, oksidovane pod optimalnim uslovima u prisustvu MPO (enzimska oksidacija) i elektrognerisanog Br₂ (elektrohemijska oksidacija)

OP	IC ₅₀ (M)	
	Enzimsko oksidacija	Elektrohemijska oksidacija
Oksidovani diazinon	$(2,10 \pm 0,95) \times 10^{-6}$	$(8,17 \pm 0,96) \times 10^{-8}$
Oksidovani malation	$(2,45 \pm 0,55) \times 10^{-8}$	$(1,39 \pm 0,74) \times 10^{-8}$
Oksidovani hlörpirifos	$(6,38 \pm 0,85) \times 10^{-6}$	$(6,14 \pm 0,55) \times 10^{-8}$
Oksidovani azinfos-metil	$(1,82 \pm 0,35) \times 10^{-5}$	$(1,80 \pm 0,12) \times 10^{-8}$
Oksidovani forat	$(1,14 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(1,82 \pm 0,39) \times 10^{-7}$

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je oksidacija pomoću elektrohemijski generisanog broma u svim ispitivanim slučajevima efikasnija od enzimsko oksidacije pomoću MPO. U zavisnosti od OP, stepen oksidacije se razlikuje. Kod malationa, koji je u oba slučaja dao najbolji rezultat, ta razlika je neznatna i red veličine je isti. Što se tiče ostalih ispitivanih OP, IC₅₀ vrednosti dobijene u slučaju oksidacije elektrohemijski generisanim bromom su za oko dva reda veličine manje od onim dobijenih oksidacijom pomoću MPO u slučaju diazinona, hlörpirifosa i forata, a čak 1000 puta kada je reč o azinfos-metilu.

Upoređene su i vrednosti limita detekcije metode posle oksidacija OP u prisustvu MPO i elektrognerisanog broma (Tabela 27). Iz prikazanih rezultata jasno se vidi da je granica detekcije metode niža za ceo red veličine kada se uzorak oksiduje elektrohemijski. Ovo jedino ne važi u slučaju malationa, kada je limit detekcije nezavisan od načina oksidacije. Razlog tome je što se u oba slučaja oksidacijom stvara tolika koncentracija malaoksona koja potpuno inhibira AChE, pa se razlika ne može primetiti.

Tabela 27. Granice detekcije (LD) za ispitivane OP oksidovane pod optimalnim uslovima u prisustvu MPO (enzimska oksidacija) i elektrognerisanog Br₂ (elektrohemijska oksidacija)

OP	LD (M)	
	Enzimaska oksidacija	Elektrohemijska oksidacija
Diazinon	$(1,17 \pm 0,05) \times 10^{-7}$	$(1,74 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
Malation	$(3,40 \pm 0,05) \times 10^{-9}$	$(2,50 \pm 0,05) \times 10^{-9}$
Hlorpirifos	$(6,61 \pm 0,05) \times 10^{-7}$	$(1,30 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
Azinfos-metil	$(6,53 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	$(4,38 \pm 0,05) \times 10^{-9}$
Forat	$(1,85 \pm 0,05) \times 10^{-7}$	$(3,28 \pm 0,05) \times 10^{-8}$

Rezultati pokazuju da je elektrohemijska oksidacija organo-tiofosfata znatno efikasnija. U oba slučaja, nastali okso-oblici stabilni su najmanje 1 h. Metoda enzimske oksidacije znatno kraće traje, robustnija je, izvođenje je jednostavnije, a otpad koji ostaje posle procesa je neškodljiv po okolinu. Takođe, opisana oksidacija OP anodnim tretmanom zahteva relativno komplikovanu instrumentaciju i isključuje mogućnost primene metode van posebno opremljenih laboratorija. U poređenju sa anodnim tretmanima koji za cilj imaju snižavanje granica detekcije OP opisanim u literaturi [143] opisana metoda indirektno elektrohemijske oksidacije OP ima za prednost visoku efikasnost (granice detekcije su skoro iste onima za čiste okso-forme i praktično limitirane granicom detekcije

AChE testa), dok u odnosu na iste pruža mogućnost efikasne oksidacije uzoraka relativno malih zapremina (reda 1 mL).

4.5. Odredjivanje koncentracije OP u realnim uzorcima

Budući da je oksidacija u prisustvu MPO dala optimalne rezultate za snižavanje granice detekcije OP pomoću AChE testa, ova modifikovana metoda primenjena je i za određivanje pesticida u realnim uzorcima. Kao uzorak upotrebljen je bistri sok od jabuke u koji su dodati diazinon i malation koncentracije 1×10^{-5} M, kao i smeša u kojoj se ova dva OP nalaze u jednakim koncentracijama (ukupno 1×10^{-5} M). U uzorcima je pre početka analize pH doveden na pH 6. Uzorci su zatim oksidovani u prisustvu 100 nM MPO i 50 μ M H_2O_2 tokom 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani u Tabeli 28, zajedno sa rezultatima inhibicije AChE u prisustvu OP istih koncentracija u vodi, kako neoksidovanih, tako i oksidovanih pod istim uslovima. Iz prikazanog se vidi da je slaganje za neoksidovane uzorke pesticida u soku i u vodi veoma dobro, dok oksidovani uzorci pokazuju velike razlike u procentu inhibicije AChE. Moguće je da neka jedinjenja prisutna u soku ometaju inhibiciju AChE pomoću OP, te se ova metoda mora još modifikovati u smislu pripreme uzoraka, kako bi se mogla koristiti za ispitivanja u realnim sistemima.

Tabela 28. Aktivnost AChE posle izlaganja neoksidovanim i oksidovanim diazinonu i malationu koncentracije 1×10^{-5} M, koji se nalaze i soku ili vodi, pojedinačno i u smeši. Oksidacija OP se odvijala u prisustvu 100 nM MPO i 50 μ M H₂O₂ tokom 10 minuta, na sobnoj temperaturi.

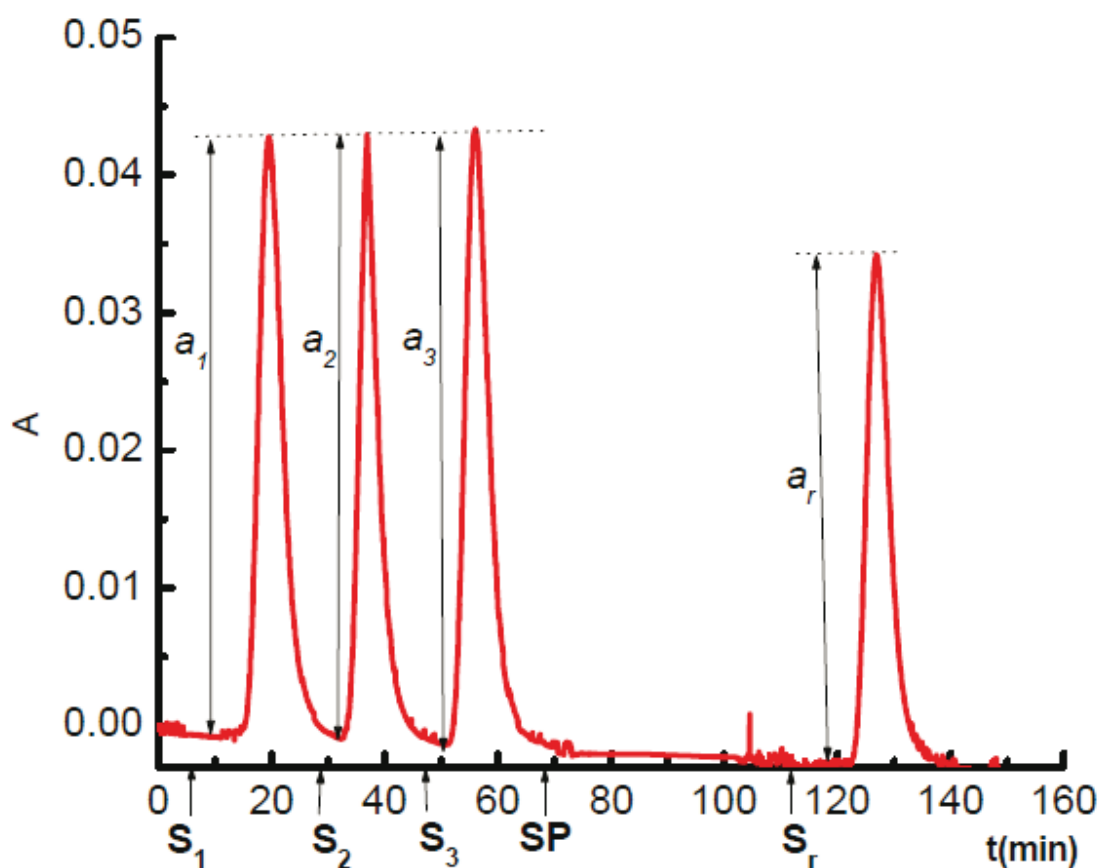
OP	C (M)	Aktivnost AChE (% od kontrole)			
		neoksidovan		oksidovan	
		sok	voda	sok	voda
Diazinon	1×10^{-5}	98±3	95±5	74±2	25±4
Malation	1×10^{-5}	80±6	72±2	60±2	0±1
Smeša*	1×10^{-5}	89±2	83±2	69±3	10±4

*jednake koncentracije diazinona i malationa ($0,5 \times 10^{-5}$ M)

4.6. FIA sistem za detekciju OP

Efekat ispitivanih OP pre i posle oksidacije ispitan je i na imobilizovanom enzimu pomoću FIA sistema. Testirane su različite brzine protoka, od 0,1 do 1 mL/min. Inhibicija enzima određivana je poređenjem enzimske aktivnosti pre i posle prolaska 200 μ L rastvora pesticida željene koncentracije kroz bioanalitičku kolonu za određeni period vremena.

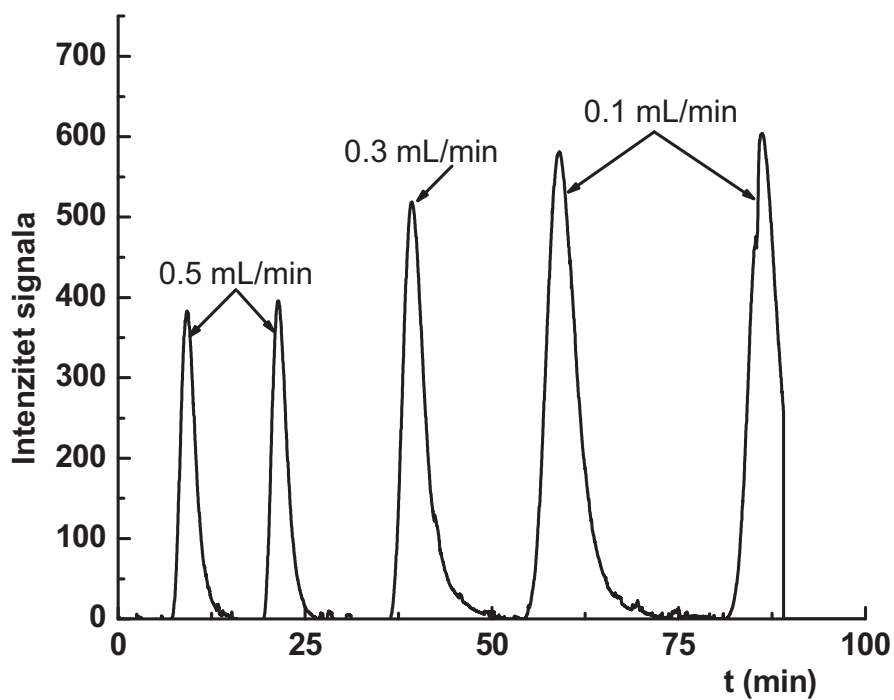
Procedura za određivanje uticaja OP na imobilizovanu AChE je uključivala sledeće korake: određivanje početne aktivnosti enzima u bioanalitičkoj koloni, injektovanje uzorka koji sadrži pesticid i injektovanje supstrata radi određivanja preostale enzimske aktivnosti (Shema 7). Noseći pufer je propušan kroz sistem dok se bazna linija ne stabilizuje, a zatim je smeša od ASChI i DTNB injektovana i beležen je odgovor. Procedura je ponavljana najmanje tri puta (S_1 , S_2 , S_3), a prosečna vrednost signala (a_1 , a_2 , a_3) je korišćena u daljim računima. Zatim je injektovan uzorak koji sadrži pesticid (SP). Određivanje preostale aktivnosti enzima (a_r) je postizano pomoću još jedne injekcije supstrata (S_r). Preostala aktivnost enzima izražavana je kao procenat od intenziteta signala pre injekcije uzorka. Posle svakog ciklusa inhibicije, enzim je reaktiviran injektovanjem 4 mM 2-PAM.



Shema 7. Određivanje uticaja OP na imobilizovanu AChE u FIA sistemu

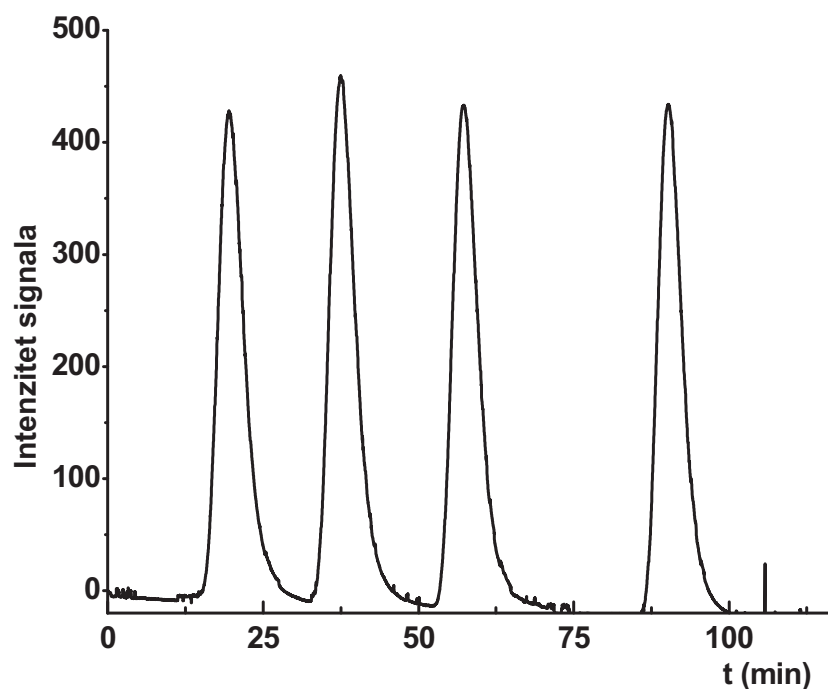
4.6.1. Određivanje radnih parametara FIA sistema

Pre određivanja uticaja oksidovanih OP na imobilizovanu AChE, bilo je neophodno uspostaviti radne parametre FIA sistema. Najpre je ispitano kako brzina protoka utiče na visinu signala. Na Slici 46. su prikazani rezultati. Jasno se može videti da je signal veći što je brzina protoka pufera kroz sistem manja. Ovaj rezultat je očekivan, budući da sa manjim protokom supstrat duže vreme provede u kontaktu sa imobilizovanim enzimom. Najbolji signal dobijen je pri brzini protoka 0,1 mL/min.



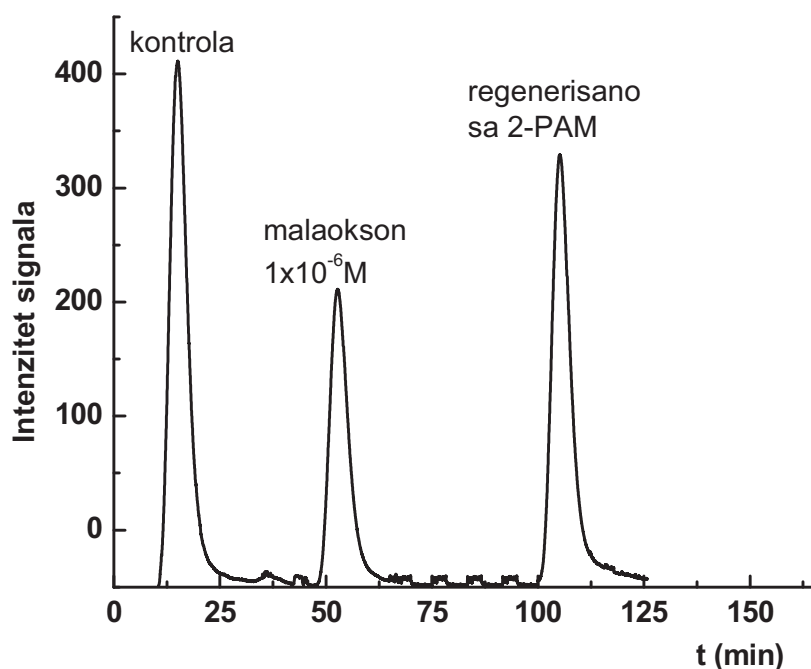
Slika 46. Visina FIA signala u zavisnosti od brzine protoka

Sledeći parametar koji je određivan bila je stabilnost kontrole pri brzini protoka od 0,1 mL/min tokom vremena. Iz rezultata prikazanih na Slici 47. vidi se da se površina signala neznatno menja sa vremenom, što se može smatrati da je to u granicama eksperimentalne greške.



Slika 47. Stabilnost kontrolne probe pri brzini protoka 0,1 mL/min

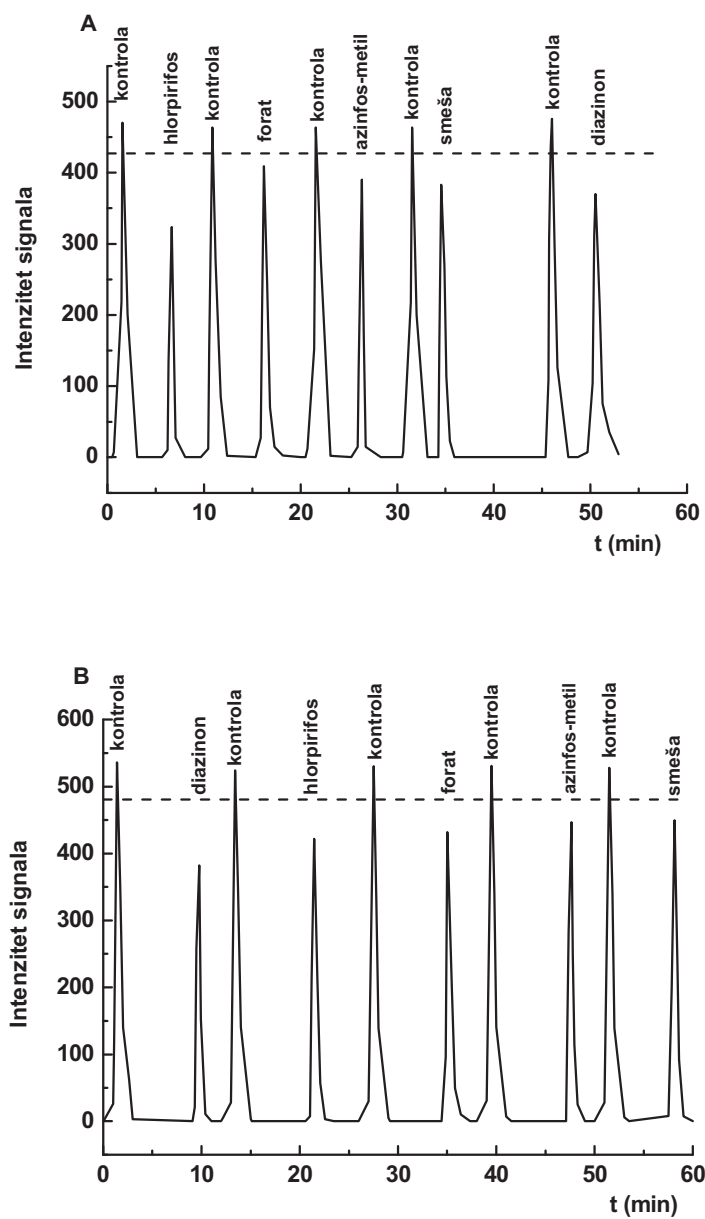
Ispitano je i da li će enzim posle izlaganja 2-PAM-u potpuno povratiti svoju aktivnost. Po prethodno opisanoj proceduri dobijen je kontrolni signal. Zatim je imobilizovana AChE inhibirana u priustvu malaoksiona koncentracije 1×10^{-6} M. Posle toga, enzim je izložen dejstvu 4 mM 2-PAM. Protok je tokom cele analize bio konstantan i iznosio 0,1 mL/min. Rezultati su prikazani na Slici 48. Može se uočiti da je regenerisani signal manji od kontrolnog, što znači da enzim nije povratio svoju punu aktivnost. Ovaj rezultat ukazuje na to da je upotreba imobilizovane AChE u ovom sistemu ograničena na određen broj ciklusa. Onog trenutka kada enzim nije mogao biti reaktiviran do bar 90 % početne aktivnosti, kolona je ponovo punjena.



Slika 48. Regeneracija imobilizovane AChE sa 2-PAM u FIA sistemu

4.6.2. Inhibicija imobilizovane AChE u prisustvu OP

Po utvrđivanju radnih parametara sistema, bilo je moguće ispitati kako uzorci organo-tiofosfata oksidovani u prisustvu MPO deluju na imobilizovanu AChE. Odgovor imobilizovane AChE na neoksidovane i oksidovane OP praćen je u prisustvu svakog ispitivanog OP koncentracije 1×10^{-7} M pojedinačno i u smeši. Sva jedinjenja ispitana su pri brzinama protoka 0,1 i 0,5 mL/min. Signali dobijeni na taj način prikazani su na Slici 49. Neoksidovani uzorci istih koncentracija OP nisu inhibirali enzim (Tabela 29). Posle svake inhibicije oksidovanim OP, AChE je reaktivirana pomoću 2-PAM pri protoku od 0,1 mL/min (izabran je minimalan protok kako bi reaktivacija enzima bila pouzdana), kako bi povratila početnu aktivnost (kontrolna vrednost). Kao što se sa Slike 49. može videti, u toku eksperimenta kontrolni signal se nije značajno smanjivao.



Slika 49. FIA signali pri protoku A) 0,5 mL/min i B) 0,1 mL/min pre (kontrola) i posle inhibicije AChE u prisustvu OP koncentracije 1×10^{-7} M

Kao granica detekcije uzeto je smanjenje signala za 10 % od vrednosti kontrolnog signala. Može se primetiti da snižavanje protoka FIA sistema sa 0,5 na 0,1 mL/min dovodi do povećanja kontrolnih signala za oko 10 %, dok se signali dobijeni merenjem zaostale aktivnosti posle ubrizgavanja OP smanjuju (Tabela 29). Na osnovu toga, može se zaključiti da snižavanje protoka FIA sistema sa 0,5 na 0,1 mL/min vodi ka povećanju detekcionog limita ove metode.

Oksidacija OP u sklopu njihovog određivanja u protočnim sistemima sa imobilizovanim enzimom je i ranije proučavana. Hloroperoksidaza u citratnom puferu korišćena je kao oksidaciono sredstvo pri određivanju OP pomoću bioanalitičkog eseja zasnovanog na inhibiciji AChE u FIA sistemu sa termalnim sočivima kao detektorom [127; 198]. I brom je korišćen kao in situ oksidans za vodene uzorke u FIA sistemu. Nije poznato kolika je efikasnost te oksidacije, kao ni da li ima nekih neželjenih proizvoda [106; 107; 108; 109].

Tabela 29. Uticaj brzine protoka na odgovor imobilizovane AChE u FIA sistemu za oksidovane OP koncentracije 1×10^{-7} M

Protok (mL/min)	Intenzitet signala (% od kontrole)		
	0,1	0,5	0,1
OP	Neoksidovan	Oksidovan	
Diazinon	100	78±5	70±7
Malation	100	65±5	59±2
Hlorpirifos	100	84±4	77±3
Azinfos-metil	96	80±3	80±5
Forat	100	67±3	57±4
Sintetička smeša*	100	80±5	72±2

*sadrži $0,2 \times 10^{-7}$ M svakog OP

5. ZAKLJUČAK

Određivanje OP pomoću AChE testa je modifikovano. Enzim AChE inhibiran je sledećim organofosfatima: diazinon, diazokson, malation, malaokson, hlörpirifos, hlörpirifos-okson, azinfos-metil, azinfos-metil-okson, forat i forat-okson. Za ispitivane OP određene su IC_{50} vrednosti. U cilju snižavanja granice detekcije metode primenjena je oksidacija OP.

Diazinon, malation, hlörpirifos, azinfos-metil i forat su najpre oksidovani u prisustvu MPO, pri čemu je utvrđeno da su optimalni uslovi za oksidaciju $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 100 nM MPO , $10 \text{ minuta inkubacije MPO i OP}$, $\text{pH } 6$ i sobna temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Proizvodi oksidacije su identifikovani kao odgovarajući oksoni pomoću UPLC i GC/MS analize. Takođe je pokazano da su oksoni dobijeni na ovaj način stabilni tokom 1h. Oksidacija OP u prisustvu MPO pod optimalnim uslovima primenjena je kao modifikacija AChE testa za detekciju OP. Na taj način dobijene su IC_{50} vrednosti od 2,5 do 1000 puta manje nego za neoksidovane OP. Određene su i granice detekcije za svaki ispitivani OP: $1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$ za diazinon, $3,40 \times 10^{-9} \text{ M}$ za malation, $6,61 \times 10^{-7} \text{ M}$ za hlörpirifos, $6,53 \times 10^{-8} \text{ M}$ za azinfos-metil i $1,85 \times 10^{-7} \text{ M}$ za forat. Utvrđeno je da se u prisustvu MPO najefikasnije oksiduje malation, a zatim slede diazinon, hlörpirifos, forat i azinfos-metil. Kada se svi ispitivani organo-tiofosfati nađu u smeši ispoljavaju antagonistički efekat.

Diazinon, malation, hlörpirifos, azinfos-metil i forat oksidovani su i pomoću elektrohemijski generisanih hlora, broma i joda. Utvrđeno je da je oksidacija najefikasnija pri inkubaciji OP sa bromom tokom 15 minuta. Proizvodi oksidacije su identifikovani pomoću UPLC analize. Indirektna elektrohemijska oksidacija je primenjena kao modifikacija u AChE testu, pri čemu su dobijene IC_{50} vrednosti 400 do 10000 puta manje od onih za neoksidovane OP. Granice detekcije za svaki ispitivani organo-tiofosfat, dobijene pri ovoj modifikaciji testa, su $1,74 \times 10^{-8} \text{ M}$ za diazinon, $2,50 \times 10^{-9} \text{ M}$ za malation, $1,30 \times 10^{-8} \text{ M}$ za hlörpirifos, $4,38 \times 10^{-9} \text{ M}$ za azinfos-metil i $3,28 \times 10^{-8} \text{ M}$ za forat. Upoređen je efekat enzimske i elektrohemijske oksidacije kao modifikacije AChE testa i nađeno da su IC_{50} vrednosti 100 do 1000 puta niže kada se OP oksiduju elektrohemijski. S tim u skladu, granice detekcije dobijene primenom elektrohemijske oksidacije OP su za red veličine niže

od onih koje se dobijaju pri enzimskoj oksidaciji. Oksidacija OP pomoću elektrogenerisanih halogena je i ekonomičnija u odnosu na enzimsku. Ipak, oksidacija u prisustvu MPO kraće traje, jednostavnija za izvođenje, a otpad koji ostaje u procesu je neškodljiv po okolinu. Ova metoda je i pogodnija za terensko izvođenje analiza. Uvođenjem imobilizovane AChE i FIA sistema u test snižava nivo detekcije za još jedan red veličine.

6. LITERATURA

- [1] K.H. Büchel, Chemistry of pesticides, John Wiley & Sons, Inc., 1983.
- [2] R.I. Krieger, Handbook of Pesticide Toxicology: Principles, Academic Press, 2001.
- [3] G. Matolcsy, M. Nándasy, V. Andriská, and S. Terčny, Pesticide chemistry, Elsevier, 1988.
- [4] D.J. Minić, Hemija pesticida, dobijanje i primena, Dušan Minić, Beograd, 1994.
- [5] A. Moretto, and M.K. Johnson, Toxicology of pesticides: experimental, clinical and regulatory perspectives, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987.
- [6] S. Bon, M. Vigny, and J. Massoulié, Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. Proceedings of the National Academy of Sciences 76 (1979) 2546-2550.
- [7] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, and I. Silman, Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. Science 253 (1991) 872-879.
- [8] D.A. Dougherty, and D.A. Stauffer, Acetylcholine Binding by a Synthetic Receptor: Implications for Biological Recognition. Science 250 (1990) 1558-1560.
- [9] T.L. Rosenberry, and E. Neumann, Interaction of ligands with acetylcholinesterase. Use of temperature-jump relaxation kinetics in the binding of specific fluorescent ligands. Biochemistry 16 (1977) 3870-3878.
- [10] K.C. Gulla, M.D. Gouda, M.S. Thakur, and N.G. Karanth, Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1597 (2002) 133-139.
- [11] D. Barceló, S. Lacorte, and J.L. Marty, Validation of an enzymatic biosensor with liquid chromatography for pesticide monitoring. Trends Anal. Chem. 14 (1995) 334-340.
- [12] L.D. Betowski, and T.L. Jones, The analysis of organophosphorus pesticide samples by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and high-

performance liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. *Environmental Science & Technology* 22 (1988) 1430-1434.

[13] C.G. Cabanillas, and R. Bushway, Analysis of Phosmet and Azinphos-Methyl in Apples by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 14 (1991) 3603 - 3613.

[14] X. Guardino, J. Obiols, M.G. Rosell, A. Farran, and C. Serra, Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 823 (1998) 91-96.

[15] B. Fried, J. Sherma, and E. Corporation, *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker, 2003.

[16] X. Cheng, Q. Wang, S. Zhang, W. Zhang, P. He, and Y. Fang, Determination of four kinds of carbamate pesticides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a polyamide-modified carbon paste electrode. *Talanta* 71 (2007) 1083-1087.

[17] K.S. Liapis, P. Aplada-Sarlis, and N.V. Kyriakidis, Rapid multi-residue method for the determination of azinphos methyl, bromopropylate, chlorpyrifos, dimethoate, parathion methyl and phosalone in apricots and peaches by using negative chemical ionization ion trap technology. *Journal of Chromatography A* 996 (2003) 181-187.

[18] L. Pogacnik, Development and application of photothermal biosensor for detection of organophosphate and carbamate pesticides, Polytechnic School of Environmental Sciences, University of Nova Gorica, Nova Gorica, 2001.

[19] M.P. Byfield, and R.A. Abuknesha, Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 9 (1994) 373-399.

[20] J. Davis, D. Huw Vaughan, and M.F. Cardosi, Elements of biosensor construction. *Enzyme and Microbial Technology* 17 (1995) 1030-1035.

[21] R.S. Phadke, Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems* 27 (1992) 203-206.

[22] L.D. Mello, and L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77 (2002) 237-256.

- [23] J. Fitzpatrick, L. Fanning, S. Hearty, P. Leonard, B.M. Manning, J.G. Quinn, and R. O'Kennedy, Applications and Recent Developments in the use of Antibodies for Analysis. *Analytical Letters* 33 (2000) 2563-2609.
- [24] M. Wilchek, and E.A. Bayer, The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* 171 (1988) 1-32.
- [25] E. Boer, and R. Beumer, Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 50 (1999) 119-130.
- [26] M. Wolcott, DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 54 (1991) 387-401.
- [27] S. Frieder, and S. Florian, Chapter 2 Physicochemical, Biochemical and Technological Fundamentals of Biosensors, Techniques and Instrumentation in *Analytical Chemistry*, Elsevier, 1992, pp. 7-84.
- [28] J.H.T. Luong, A. Mulchandani, and G.G. Guilbault, Developments and applications of biosensors. *Trends in Biotechnology* 6 (1988) 310-316.
- [29] D. Gibson, P. Coombs, and D. Pimbley, Automated conductance method for the detection of Salmonella in foods: collaborative study. *Journal of AOAC International* 75 (1992) 293-297.
- [30] P. Feng, Commercial assay systems for detecting foodborne Salmonella: a review. *Journal of Food Protection* 55 (1992) 927-934.
- [31] S.S. Deshpande, and R.M. Rocco, Biosensors and their potential use in food quality control. *Food Technology* 48 (1994) 146-150.
- [32] P. Buhlmann, E. Pretsch, and E. Bakker, Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews* 98 (1998) 1593-1687.
- [33] I. Karube, and M. Suzuki, *Microbiosensors for Food Analysis, Biosensor Design and Application*, American Chemical Society, 1992, pp. 10-25.
- [34] R. Koncki, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti, and M. Mascini, Disposable strip potentiometric electrodes with solvent-polymeric ion-selective membranes fabricated using screen-printing technology. *Analytica Chimica Acta* 385 (1999) 451-459.
- [35] U. Krull, Biosensors for chemical analysis. *Chemtech* 20 (1990) 372-377.

- [36] R.F. Taylor, I.G. Marenchic, and R.H. Spencer, Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control. *Analytica Chimica Acta* 249 (1991) 67-70.
- [37] K. Wan, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, and A.P. Soldatkin, Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method. *Sensors and Actuators B: Chemical* 58 (1999) 399-408.
- [38] K. Wan, J.M. Chovelon, and N. Jaffrezic-Renault, Enzyme-octadecylamine Langmuir-Blodgett membranes for ENFET biosensors. *Talanta* 52 (2000) 663-670.
- [39] R.-I. Stefan, J.F.v. Staden, and H.Y. Aboul-Enein, Electrochemical Sensor Arrays. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 29 (1999) 133-153.
- [40] J.L. Brooks, B. Mirhabibollahi, and R.G. Kroll, Experimental enzyme-linked amperometric immunosensors for the detection of salmonellas in foods. *Journal of Applied Microbiology* 73 (1992) 189-196.
- [41] I. Hamid, D. Ivnitski, P. Atanasov, and E. Wilkins, Fast amperometric assay for *E. coli* O157:H7 using partially immersed immunoelectrodes. *Electroanalysis* 10 (1998) 758-763.
- [42] J. Rishpon, and D. Ivnitski, An amperometric enzyme-channeling immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997) 195-204.
- [43] W. Seitz, Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19 (1988) 135-173.
- [44] B.A.A. Dremel, B.P.H. Schaffar, and R.D. Schmid, Determination of glucose in wine and fruit juice based on a fibre-optic glucose biosensor and flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 225 (1989) 293-301.
- [45] M. Mehrvar, C. Bis, J.M. Scharer, M.M. Young, and J.H. Luong, Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances. *Analytical Sciences* 16 (2000) 677-692.
- [46] K. Mosbach, Thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 6 (1995) 179-182.
- [47] P. Bataillard, Calorimetric sensing in bioanalytical chemistry: Principles, applications and trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 12 387-394.
- [48] K. Ramanathan, B.R. Jönsson, and B. Danielsson, Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Analytica Chimica Acta* 427 (2001) 1-10.

- [49] K. Ramanathan, M. Rank, J. Svitel, A. Dzgoev, and B. Danielsson, The development and applications of thermal biosensors for bioprocess monitoring. *Trends in Biotechnology* 17 (1999) 499-505.
- [50] B. Xie, M. Mecklenburg, B. Danielsson, O. Ohman, P. Norlin, and F. Winqvist, Development of an integrated thermal biosensor for the simultaneous determination of multiple analytes. *Analyst* 120 (1995) 155-160.
- [51] J.W. Grate, S.L. Rose-Pehrsson, D.L. Venezky, M. Klusty, and H. Wohltjen, Smart sensor system for trace organophosphorus and organosulfur vapor detection employing a temperature-controlled array of surface acoustic wave sensors, automated sample preconcentration, and pattern recognition. *Analytical Chemistry* 65 (1993) 1868-1881.
- [52] C. O'Sullivan, R. R. Vaughan, and G.G. Guilbault, Piezoelectric immunosensors-theory and applications. *Analytical Letters* 32 (1999) 2353-2377.
- [53] F. Scheller, F. Schubert, D. Pfeiffer, R. Hintsche, I. Dransfeld, R. Renneberg, U. Wollenberger, K. Riedel, M. Pavlova, M. Kuhn, H.-G. Muller, P.m. Tan, W. Hoffmann, and W. Moritz, Research and development of biosensors. A review. *Analyst* 114 (1989) 653-662.
- [54] B. Eggins, *Biosensors, An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, 1996.
- [55] G. Boisdé, *Chemical and Biochemical Sensing with Optical Fibers and Waveguides*, Artech House, Massachusetts, 1996.
- [56] A. Scott, *Biosensors for food analysis*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1998.
- [57] P.D. Patel, (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 96-115.
- [58] P.A. Paredes, J. Parellada, V.M. Fernandez, I. Katakis, and E. Dominguez, Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1233-1243.
- [59] F. Amárita, C.R. Fernández, and F. Alkorta, Hybrid biosensors to estimate lactose in milk. *Analytica Chimica Acta* 349 (1997) 153-158.

- [60] B. Leca, and J.-L. Marty, Reusable ethanol sensor based on a NAD⁺-dependent dehydrogenase without coenzyme addition. *Analytica Chimica Acta* 340 (1997) 143-148.
- [61] V.C. Dall'Orto, C. Danilowicz, I. Rezzano, M.D. Carlo, and M. Mascini, Comparison between Three Amperometric Sensors for Phenol Determination in Olive Oil Samples. *Analytical Letters* 32 (1999) 1981-1990.
- [62] Y.C. Lee, and M.H. Huh, Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids. *Journal of Food Biochemistry* 23 (1999) 173-185.
- [63] M. Situmorang, D. Brynn Hibbert, J. Justin Gooding, and D. Barnett, A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis. *Analyst* 124 (1999) 1775-1779.
- [64] I. Abdel-Hamid, D. Ivnitski, P. Atanasov, and E. Wilkins, Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria. *Analytica Chimica Acta* 399 (1999) 99-108.
- [65] E. Medyantseva, M. Vertlib, G. Budnikov, and M. Tyshlek, *Appl. Biochem. Microbiol.* 34 (1998) 202-205.
- [66] G.S. Nunes, P. Skládal, H. Yamanaka, and D. Barceló, Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques. *Analytica Chimica Acta* 362 (1998) 59-68.
- [67] D. Barceló, M. López de Alda, M.P. Marco, and S. Rodríguez-Mozaz, Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure and Applied Chemistry* 76 (2004) 723-754.
- [68] J. Parellada, A. Narváez, M.A. López, E. Domínguez, J.J. Fernández, V. Pavlov, and I. Katakis, Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Analytica Chimica Acta* 362 (1998) 47-57.
- [69] C. Mouvet, R.D. Harris, C. Maciag, B.J. Luff, J.S. Wilkinson, J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, R. Abuknesha, and G. Ismail, Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta* 338 (1997) 109-117.

- [70] E. Mallat, C. Barzen, R. Abuknesha, G. Gauglitz, and D. Barceló, Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *Analytica Chimica Acta* 427 (2001) 165-171.
- [71] A. Rose, C. Nistor, J. Emnéus, D. Pfeiffer, and U. Wollenberger, GDH biosensor based off-line capillary immunoassay for alkylphenols and their ethoxylates. *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 1033-1043.
- [72] L.X. Tiefenauer, S. Kossek, C. Padeste, and P. Thiébaud, Towards amperometric immunosensor devices. *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997) 213-223.
- [73] C. Ercole, M.D. Gallo, M. Pantalone, S. Santucci, L. Mosiello, C. Laconi, and A. Lepidi, A biosensor for *Escherichia coli* based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sensors and Actuators B: Chemical* 83 (2002) 48-52.
- [74] V. Koubová, E. Brynda, L. Karasová, J. Skvor, J. Homola, J. Dostálek, P. Tobiska, and J. Rosický, Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 74 (2001) 100-105.
- [75] B. Hock, M. Seifert, and K. Kramer, Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 239-249.
- [76] T. Wink, J. de Beer, W.E. Hennink, A. Bult, and W.P. van Bennekom, Interaction between Plasmid DNA and Cationic Polymers Studied by Surface Plasmon Resonance Spectrometry. *Analytical Chemistry* 71 (1999) 801-805.
- [77] M. Farré, O. Pasini, M. Carmen Alonso, M. Castillo, and D. Barceló, Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. *Analytica Chimica Acta* 426 (2001) 155-165.
- [78] K.R. Rogers, and M. Mascini, Biosensors for field analytical monitoring. *Field Analytical Chemistry & Technology* 2 (1998) 317-331.
- [79] C. Tran-Minh, *Biosensors*, Chapman&Hall and Masson, 1993.
- [80] J.L. Marty, N. Mionetto, S. Lacorte, and D. Barceló, Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 265-271.

- [81] D.M. Ivnickii, and J. Rishpon, A potentiometric biosensor for pesticides based on the thiocholine hexacyanoferrate (III) reaction. *Biosensors and Bioelectronics* 9 (1994) 569-576.
- [82] C. Ristori, C. Del Carlo, M. Martini, A. Barbaro, and A. Ancarani, Potentiometric detection of pesticides in water samples. *Analytica Chimica Acta* 325 (1996) 151-160.
- [83] K. Stein, and G. Schwedt, Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. *Analytica Chimica Acta* 272 (1993) 73-81.
- [84] R. Basanta, Measurement of cholinesterase activity inhibition for the detection of organophosphorus and carbamate pesticides in water. *International Journal of Environmental Studies* 48 (1995) 211 - 219.
- [85] K.R. Rogers, and L.R. Williams, Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 14 (1995) 289-294.
- [86] C. Dumschat, H. Müller, K. Stein, and G. Schwedt, Pesticide-sensitive ISFET based on enzyme inhibition. *Analytica Chimica Acta* 252 (1991) 7-9.
- [87] R.E. Gyurcsányi, Z. Vágföldi, K. Tóth, and G. Nagy, Fast Response Potentiometric Acetylcholine Biosensor. *Electroanalysis* 11 (1999) 712-718.
- [88] P. Skládal, G.S. Nunes, H. Yamanaka, and M.L. Ribeiro, Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis* 9 (1997) 1083-1087.
- [89] C. La Rosa, F. Pariente, L. Hernández, and E. Lorenzo, Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides. *Analytica Chimica Acta* 308 (1995) 129-136.
- [90] C. Cremisini, S. Di Sario, J. Mela, R. Pilloton, and G. Palleschi, Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 273-280.
- [91] J.-L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, and G. Reverdy, A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 255-263.

- [92] A. Günther, and U. Bilitewski, Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system. *Analytica Chimica Acta* 300 (1995) 117-125.
- [93] D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, and S. Alegret, Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite. *Analytica Chimica Acta* 290 (1994) 343-348.
- [94] A. Roda, P. Rauch, E. Ferri, S. Girotti, S. Ghini, G. Carrea, and R. Bovara, Chemiluminescent flow sensor for the determination of Paraoxon and Aldicarb pesticides. *Analytica Chimica Acta* 294 (1994) 35-42.
- [95] P. Moris, I. Alexandre, M. Roger, and J. Remacle, Chemiluminescence assays of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta* 302 (1995) 53-59.
- [96] C. García de María, T. Manzano Muñoz, and A. Townshend, Reactivation of an immobilized enzyme reactor for the determination of acetylcholinesterase inhibitors Flow injection determination of paraoxon. *Analytica Chimica Acta* 295 (1994) 287-296.
- [97] J.M. Abad, F. Pariente, L. Hernández, H.D. Abruña, and E. Lorenzo, Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2848-2855.
- [98] S.V. Dzydevich, A.A. Shul'ga, A.P. Soldatkin, A.M.N. Hendji, N. Jaffrezic-Renault, and C. Martelet, Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides. *Electroanalysis* 6 (1994) 752-758.
- [99] J.L. Marty, K. Sode, and I. Karube, Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis* 4 (1992) 249-252.
- [100] K.I. Dave, C.E. Miller, and J.R. Wild, Characterization of organophosphorus hydrolases and the genetic manipulation of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Chemico-Biological Interactions* 87 (1993) 55-68.
- [101] D.P. Dumas, S.R. Caldwell, J.R. Wild, and F.M. Raushel, Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989) 19659-65.

- [102] D.P. Dumas, H.D. Durst, W.G. Landis, F.M. Raushel, and J.R. Wild, Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 277 (1990) 155-159.
- [103] K. Lai, K.I. Dave, and J.R. Wild, Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 16579-16584.
- [104] A. Mulchandani, P. Mulchandani, and W. Chen, Enzyme biosensor for determination of organophosphates. *Field Anal. Chem. Tech.* 2 (1998) 363-369.
- [105] A.L. Simonian, T.A. Good, S.S. Wang, and J.R. Wild, Nanoparticle-based optical biosensors for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides. *Analytica Chimica Acta* 534 (2005) 69-77.
- [106] S. Kumaran, and C. Tran-Minh, Determination of organophosphorous and carbamate insecticides by flow injection analysis. *Anal. Biochem.* 200 (1992) 187-194.
- [107] S. Kumaran, and M. Morita, Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta* 42 (1995) 649-655.
- [108] Y.A. Kim, H.S. Lee, Y.C. Park, and Y.T. Lee, A convenient method for oxidation of organophosphorus pesticides in organic solvents. *Environ. Res.* 84 (2000) 303-309.
- [109] H.S. Lee, Y.A. Kim, Y.A. Cho, and Y.T. Lee, Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere* 46 (2002) 571-576.
- [110] M.I. Arufe, J.L. Romero, J.J. Gamero, and M.J. Moreno, Oxidation of cholinesterase-inhibiting pesticides: A simple experiment to illustrate the role of bioactivation in the toxicity of chemicals. *Biochemical Education* 28 (2000) 174-177.
- [111] P. Herzprung, L. Weil, K. Quentin, and I. Zombola, Determination of organophosphorous compounds and carbamates by their inhibition of cholinesterases, part 2: Estimation of detection limits for insecticide-determination by concentration, oxidation and inhibition values. *Vom Wasser* 74 (1990) 339-35.
- [112] H. Schulze, R. Schmid, and T. Bachmann, Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 268-272.

- [113] J. Michalski, A. Okruszek, and W. Stec, Stereochemistry of oxidation of organophosphorus thiono-compounds and P^{III} compounds by nitric acid and dinitrogen tetroxide. *Chem. Commun. D* (1970) 1495 - 1497.
- [114] W.J. Stec, A. Okruszek, and J. Michalski, Organophosphorus compounds of sulfur and selenium. Stereochemistry of oxidation of thiono- and selenophosphoryl compounds with hydrogen peroxide. *J. Org. Chem.* 41 (1976) 233-238.
- [115] R. Luckenbach, and M. Kern, Stereospezifische Überführung chiraler acyclischer tertiärer Phosphinsulphide in die entsprechenden tertiären Phosphioxide mit Dymethylsulphoxid (DMSO). *Chemische Berichte* 108 (1975) 3533-3537.
- [116] A.W. Herriott, Peroxy acid oxidation of phosphinothioates, a reversal of stereochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 3304-3305.
- [117] E.M. Bellet, and J.E. Casida, Products of peracid oxidation of organothiophosphorus compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22 (1974) 207-211.
- [118] Y. Segall, and J.E. Casida, Oxidative conversion of phosphorothiolates to phosphinyloxysulfonates probably via phosphorothiolate -oxides. *Tetrahedron Letters* 23 (1982) 139-142.
- [119] J. Helinski, Z. Skrzypczynski, J. Wasiak, and J. Michalski, Efficient oxygenation of thiophosphoryl and selenophosphoryl groups using trifluoroacetic anhydride. *Tetrahedron Letters* 31 (1990) 4081-4084.
- [120] K.S. Bruzik, and W.J. Stec, Reversible oxidation of phosphylthionates and phosphylselenonates with trifluoroacetic anhydride. *The Journal of Organic Chemistry* 55 (1990) 6131-6135.
- [121] F. Sánchez-Baeza, G. Durand, D. Barceló, and A. Messeguer, Dimethyldioxirane conversion of phosphine sulfides and phosphorothioates into their corresponding oxygen analogues. *Tetrahedron Letters* 31 (1990) 3359-3362.
- [122] J.A. Jackson, C.E. Berkman, and C.M. Thompson, Stereoselective and chemoselective oxidation of phosphorothionates using MMPP. *Tetrahedron Letters* 33 (1992) 6061-6064.

- [123] L.A. Wozniak, and W.J. Stec, Oxidation in organophosphorus chemistry: Potassium peroxymonosulphate. *Tetrahedron Letters* 40 (1999) 2637-2640.
- [124] A. Skowronska, and E. Krawczyk, A general method for the conversion of thiophosphoryl and selenophosphoryl groups into phosphoryl groups by ozone oxidation. *Synthesis* 6 (1983) 509-510.
- [125] M. Terreni, M. Pregolato, G. Resnati, and E. Benfenati, Selective sulfur oxygenation in phosphoroamidate, thionophosphate, and thiophosphate agrochemicals by perfluoro-cis-2,3-dialkyloxaziridine. *Tetrahedron* 51 (1995) 7981-7992.
- [126] A. Arnone, M. Pregolato, G. Resnati, and M. Terreni, Conversion of Thio- and Selenophosphoryl into Phosphoryl Group by Perfluoro cis-2,3-Dialkyloxaziridines. *The Journal of Organic Chemistry* 62 (1997) 6401-6403.
- [127] J. Hernandez, N.R. Robledo, L. Velasco, R. Quintero, M.A. Pickard, and R. Vazquez-Duhalt, Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides. *Pestic. Biochem. Phys.* 61 (1998) 87-94.
- [128] J.B. Knaak, M.A. Stahmann, and J.E. Casida, Insecticide metabolism in plants, peroxidase and ethylenediaminetetraacetic acid-ferrous iron-catalyzed oxidation and hydrolysis of parathion. *J. Agric. Food Chem.* 10 (1962) 154-158.
- [129] H. Schulze, R.D. Schmid, and T.T. Bachmann, Activation of phosphorothionate pesticides based on a cytochrome P450 BM-3 (CYP102 A1) mutant for expanded neurotoxin detection in food using acetylcholinesterase biosensors. *Anal. Chem.* 76 (2004) 1720-1725.
- [130] J. Muff, C. Andersen, R. Erichsen, and E. Søgaard, Electrochemical oxidation of pesticide polluted drainage water in its natural matrix. in: N. Kalogerakis, (Ed.), 2nd European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes, 2009.
- [131] C. Comninellis, Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochimica Acta* 39 (1994) 1857-1862.
- [132] C. Comninellis, and A. Nerini, Anodic oxidation of phenol in the presence of NaCl for wastewater treatment. *Journal of Applied Electrochemistry* 25 (1995) 23-28.

- [133] D. Arapoglou, A. Vlyssides, C. Israilides, A. Zorpas, and P. Karlis, Detoxification of methyl-parathion pesticide in aqueous solutions by electrochemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 98 (2003) 191-199.
- [134] A. Vlyssides, E.M. Barampouti, S. Mai, D. Arapoglou, and A. Kotronarou, Degradation of Methylparathion in Aqueous Solution by Electrochemical Oxidation. *Environmental Science & Technology* 38 (2004) 6125-6131.
- [135] A.G. Vlyssides, P.K. Karlis, N. Rori, and A.A. Zorpas, Electrochemical treatment in relation to pH of domestic wastewater using Ti/Pt electrodes. *Journal of Hazardous Materials* 95 (2002) 215-226.
- [136] H.C. Yatmaz, and Y. Uzman, Degradation of Pesticide Monochrotophos from Aqueous Solutions by Electrochemical Methods. *International Journal of Electrochemical Science* 4 (2009) 614 - 626.
- [137] A. Vlyssides, D. Arapoglou, S. Mai, and E.M. Barampouti, Electrochemical detoxification of four phosphorothioate obsolete pesticides stocks. *Chemosphere* 58 (2005) 439-447.
- [138] H. Cheng, W. Xu, J. Liu, H. Wang, Y. He, and G. Chen, Pretreatment of wastewater from triazine manufacturing by coagulation, electrolysis, and internal microelectrolysis. *Journal of Hazardous Materials* 146 (2007) 385-392.
- [139] Y. Song-hu, and L. Xiao-hua, Comparison treatment of various chlorophenols by electro-Fenton method: relationship between chlorine content and degradation. *Journal of Hazardous Materials* 118 (2005) 85-92.
- [140] M.A. Oturan, and E. Brillas, Electrochemical Advanced Oxidation Processes (EAOPs) for Environmental Applications. *Portugaliae Electrochimica Acta* 25 (2007) 1-18.
- [141] S. Irmak, H.I. Yavuz, and O. Erbatur, Degradation of 4-chloro-2-methylphenol in aqueous solution by electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes. *Applied Catalysis B: Environmental* 63 (2006) 243-248.
- [142] B. Boye, E. Brillas, and M.M. Dieng, Electrochemical degradation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in aqueous medium by peroxi-

coagulation and photoperoxi-coagulation. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 540 (2003) 25-34.

[143] G.A. Evtugyn, E.P. Rizaeva, E.E. Stoikova, V.Z. Latipova, and H.C. Budnikov, The application of cholinesterase potentiometric biosensor for preliminary screening of the toxicity of waste waters. *Electroanalysis* 9 (1997) 1124-1128.

[144] K. Agner, *Acta Chemica Scandinavica* 2 (1941) 1-64.

[145] J. Schultz, and K. Kaminker, Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 96 (1962) 465-467.

[146] D.F. Bainton, J. Ulliyot, and M. Farquhar, The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 134 (1971) 907-934.

[147] B.A. Nichols, and D.F. Bainton, *Laboratory Investigation* 29 (1973) 27-40.

[148] A. Daugherty, J.L. Dunn, D.L. Rateri, and J.W. Heinecke, Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation* 94 (1994) 437-444.

[149] R.M. Nagra, B. Becher, W.W. Tourtellotte, J.P. Antel, D. Gold, T. Paladino, R.A. Smith, J.R. Nelson, and W.F. Reynolds, Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 78 (1997) 97-107.

[150] S.J. Klebanoff, A peroxidase-mediated antimicrobial system in leukocytes. *Journal of Clinical Investigation* 46 (1967) 1078.

[151] S.J. Klebanoff, IODINATION OF BACTERIA: A BACTERICIDAL MECHANISM. *The Journal of Experimental Medicine* 126 (1967) 1063-1078.

[152] S.J. Klebanoff, Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide Antibacterial System. *J. Bacteriol.* 95 (1968) 2131-2138.

[153] A.J. Sbarra, and M.L. Karnovsky, The Biochemical Basis of Phagocytosis: I. METABOLIC CHANGES DURING THE INGESTION OF PARTICLES BY POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES *Journal of Biological Chemistry* 234 (1959) 1355-1362.

- [154] G.Y.N. Iyer, M.F. Islam, and J.H. Quastel, Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 192 (1961) 535-541.
- [155] S.J. Chanock, J. el Benna, R.M. Smith, and B.M. Babior, The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 24519-24522.
- [156] L.M. Henderson, and J.B. Chappell, NADPH oxidase of neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1273 (1996) 87-107.
- [157] L.M. Henderson, S. Thomas, G. Banting, and J.B. Chappell, The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of gp91-phox. *Biochem. J.* 325 (1997) 701-705.
- [158] D. Dolphin, A. Forman, D.C. Borg, J. Fajer, and R.H. Felton, Compounds I of Catalase and Horse Radish Peroxidase: $\dot{\text{F}}\text{-Cation}$ Radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68 (1971) 614-618.
- [159] S.J. Klebanoff, Oxygen metabolites from phagocytes. in: J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman, (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, Ltd, New York, 1992, pp. 541-588.
- [160] S.J. Klebanoff, Myeloperoxidase. *P. Assoc. Am. Physician* 111 (1999) 383-389.
- [161] M.L. Savenkova, D.M. Mueller, and J.W. Heinecke, Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 20394-400.
- [162] P.G. Furtmüller, U. Burner, and C. Obinger, Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate. *Biochemistry* 37 (1998) 17923-17930.
- [163] S.V. Lymar, and J.K. Hurst, Role of Compartmentation in Promoting Toxicity of Leukocyte-Generated Strong Oxidants. *Chemical Research in Toxicology* 8 (1995) 833-840.
- [164] P.G. Furtmüller, M. Zederbauer, W. Jantschko, J. Helm, M. Bogner, C. Jakopitsch, and C. Obinger, Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (2006) 199-213.
- [165] P.G. Furtmüller, J.r. Arnhold, W. Jantschko, H. Pichler, and C. Obinger, Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of

human myeloperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (2003) 551-557.

[166] A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* 41 (1991) 1485-1492.

[167] J. Uetrecht, and N. Zahid, N-chlorination of phenytoin by myeloperoxidase to a reactive metabolite. *Chemical Research in Toxicology* 1 (1988) 148-151.

[168] D.C. Mays, L.J. Pawluk, G. Apseloff, W.B. Davis, Z.-W. She, A.L. Sagone, and N. Gerber, Metabolism of phenytoin and covalent binding of reactive intermediates in activated human neutrophils. *Biochemical Pharmacology* 50 (1995) 367-380.

[169] S.M. Furst, and J.P. Uetrecht, Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxidase system of activated neutrophils. *Biochemical Pharmacology* 45 (1993) 1267-1275.

[170] G. Battistuzzi, M. Bellei, M. Zederbauer, P.G. Furtmüller, M. Sola, and C. Obinger, Redox Thermodynamics of the Fe(III)/Fe(II) Couple of Human Myeloperoxidase in Its High-Spin and Low-Spin Forms. *Biochemistry* 45 (2006) 12750-12755.

[171] A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem. J.* 252 (1988) 529-536.

[172] H. Hoogland, A. van Kuilenburg, C. van Riel, A.O. Muijsers, and R. Wever, Spectral properties of myeloperoxidase Compounds II and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 916 (1987) 76-82.

[173] J. Zeng, and R.E. Fenna, X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 226 (1992) 185-207.

[174] T.J. Fiedler, C.A. Davey, and R.E. Fenna, X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoxidase at 1.8 Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 11964-11971.

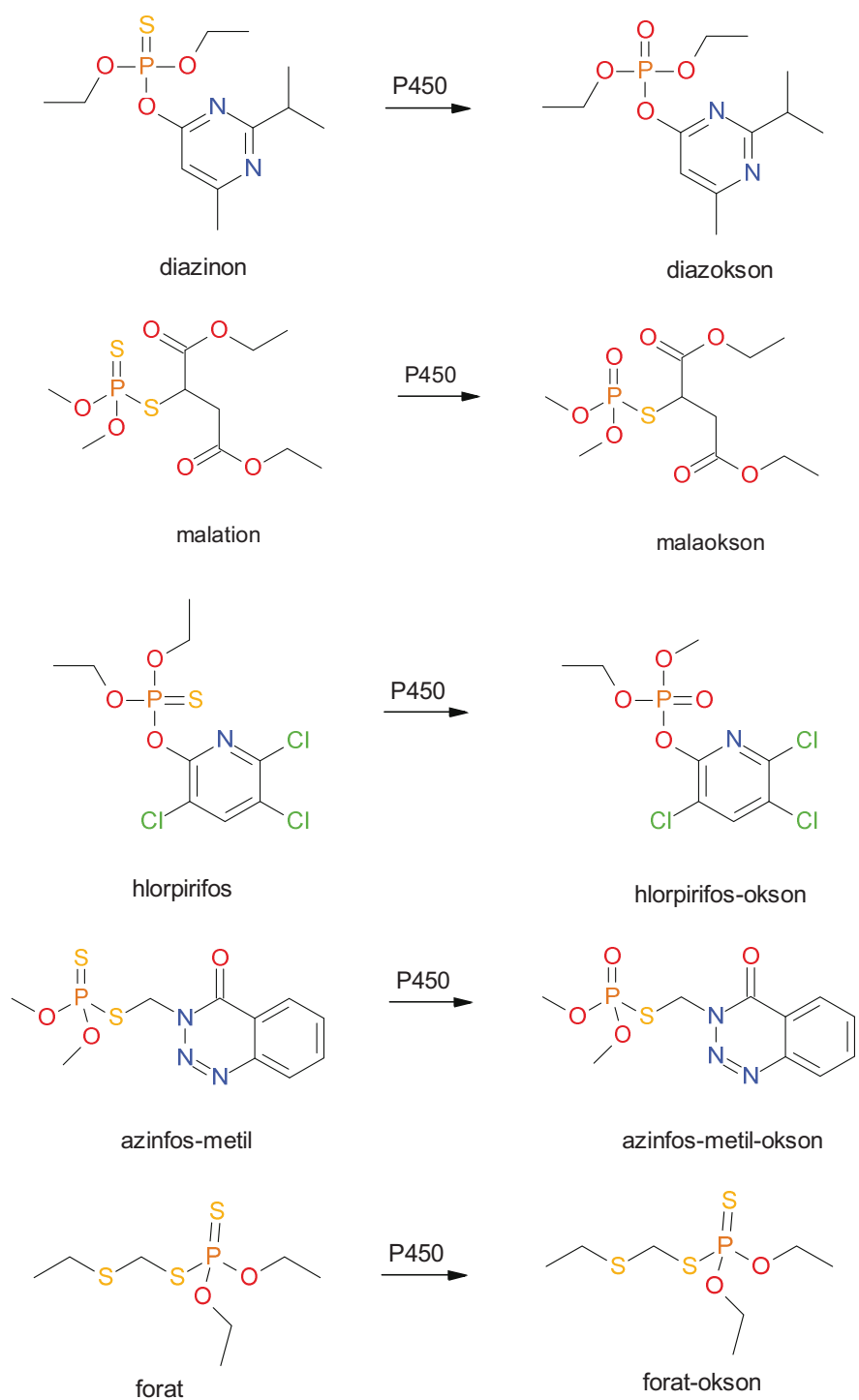
[175] R. Fenna, J. Zeng, and C. Davey, Structure of the Green Heme in Myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316 (1995) 653-656.

- [176] R.E. Fenna, Myeloperoxidase, Handbook of Metalloproteins, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [177] E. Malle, P. Furtmüller, and W. Sattler, Myeloperoxidase: A target for new drug development? *Br J Pharmacol* 152 (2007) 838-854.
- [178] P.C. Andrews, and N.I. Krinsky, The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 4211-4218.
- [179] R. Wever, W.M. Kast, J.H. Kasinoedin, and R. Boelens, The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 709 (1982) 212-219.
- [180] J. Arnhold, E. Monzani, P.G. Furtmüller, M. Zederbauer, L. Casella, and C. Obinger, Kinetics and Thermodynamics of Halide and Nitrite Oxidation by Mammalian Heme Peroxidases. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2006 (2006) 3801-3811.
- [181] T. Odajima, and I. Yamazaki, Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. I. Reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 206 (1970) 71-77.
- [182] R.J. Beers, and I.W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 133-140.
- [183] L. Pogacnik, and M. Franko, Optimisation of FIA system for detection of organophosphorus and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition. *Talanta* 54 (2001) 631-641.
- [184] D. Krstic, M. Colovic, M. Bavcon Kralj, M. Franko, K. Krinulovic, P. Trebse, and V. Vasic, Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* 23 (2008) 562-573.
- [185] D. Krstic, M. Colovic, M. Bavcon Kralj, M. Franko, K. Krinulovic, P. Trebse, and V. Vasic, The influence of malathion and its decomposition products on free and immobilized acetylcholinesterase. *Russ. J. Phys. Chem. A* 82 (2008) 663-668.

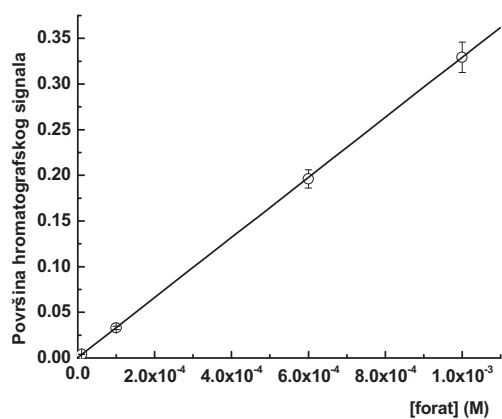
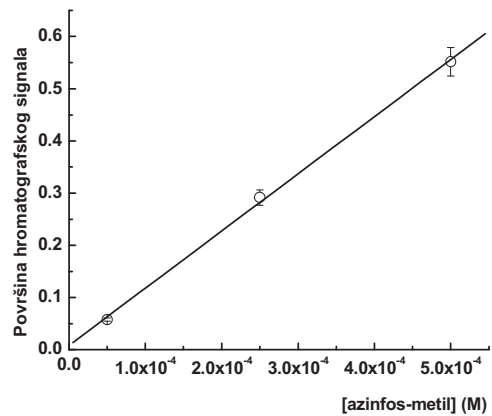
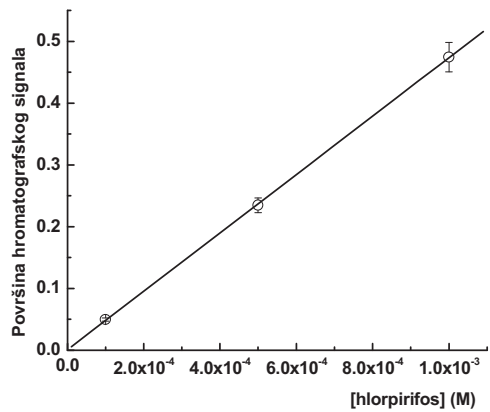
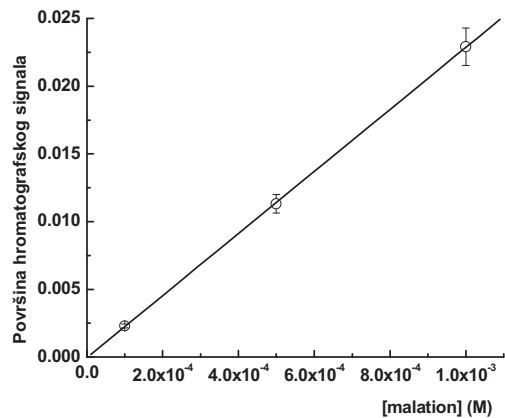
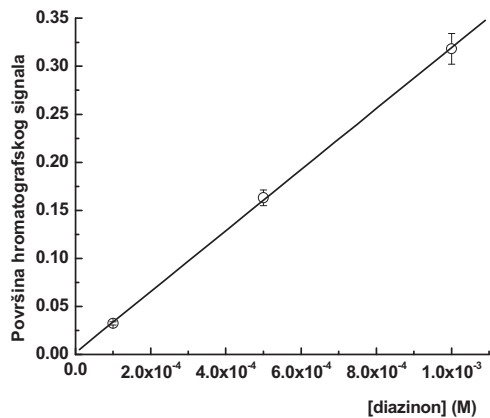
- [186] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres jr, and R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-90, IN1, 91-95.
- [187] T. Lazarević Pašti, T. Momić, A. Onjia, L. Vujisić, and V. Vasić, Myeloperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides as a pre-step in their determination by AChE based bioanalytical methods. *Microchimica Acta* 170 (2010) 289-297.
- [188] T. Lazarevic-Pasti, M. Colovic, J. Savic, T. Momic, and V. Vasic, Oxidation of diazinon and malathion by myeloperoxidase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (2011) 140-144.
- [189] A. Bard, and L. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Willey & Sons, INC., New York, 2000.
- [190] P.P. Bradley, D.A. Priebe, R.D. Christensen, and G. Rothstein, Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *J Invest Dermatol* 78 (1982) 206-209.
- [191] J.M. Dypbukt, C. Bishop, W.M. Brooks, B. Thong, H. Eriksson, and A.J. Kettle, A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine* 39 (2005) 1468-1477.
- [192] J. Casida, *Pest toxicology: The primary mechanisms of pesticide action*. *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 609-619.
- [193] A.P. Kulkarni, and E. Hodgson, Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. *Pharmacol. Therapeut.* 8 (1980) 379-475.
- [194] L.G. Sultatos, Mammalian toxicology of organophosphorous pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43 (1994) 271-289.
- [195] H. Fallscheer, and J. Cook, Report on enzymatic methods for insecticides *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 39 (1956) 691-697.
- [196] Q. Zhang, and S.O. Pehkonen, Oxidation of diazinon by aqueous chlorine: kinetics, mechanisms, and product studies. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1760-1766.

- [197] C.J.G.M. Smulders, T.J.H. Bueters, S. Vailati, R.G.D.M. van Kleef, and H.P.M. Vijverberg, Block of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Organophosphate Insecticides. *Toxicological Sciences* 82 (2004) 545-554.
- [198] A. Boškin, C. Tran, and M. Franko, Oxidation of organophosphorus pesticides with chloroperoxidase enzyme in the presence of an ionic liquid as co-solvent. *Environ. Chem. Lett.* 7 (2009) 267-270.
- [199] N. Ohashi, Y. Tsuchiya, T. Sasano, and A. Hamada, Ozonation products of organophosphorous pesticides in water. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 40 (1994) 185-192.
- [200] T. Momić, Z. Vujčić, and V. Vasić, Kinetics of inhibition of peroxidase activity of myeloperoxidase by quercetin. *International Journal of Chemical Kinetics* 40 (2008) 384-394.
- [201] T. Momic, J. Savic, and V. Vasic, Oxidation of quercetin by myeloperoxidase. *Res. Lett. Phys. Chem.* 2009 (2009).
- [202] R. Turkall, and M. Tsan, Oxidation of glutathione by the myeloperoxidase system. *J. Reticuloendothel Soc.* 31 (1982) 353-360.
- [203] A.B. Abdel-Naim, and A.M. Mohamadin, Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of chloroacetonitrile to cyanide. *Toxicology Letters* 146 (2004) 249-257.
- [204] X. Fei, and G. Sun, Oxidative Degradation of Organophosphorous Pesticides by N-Halamine Fabrics. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (2009) 5604-5609.
- [205] S. Mentus, *Elektrohemija*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1999.
- [206] I. Filipovic, and S. Lipanovic, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga Zagreb, Zagreb, 1973.

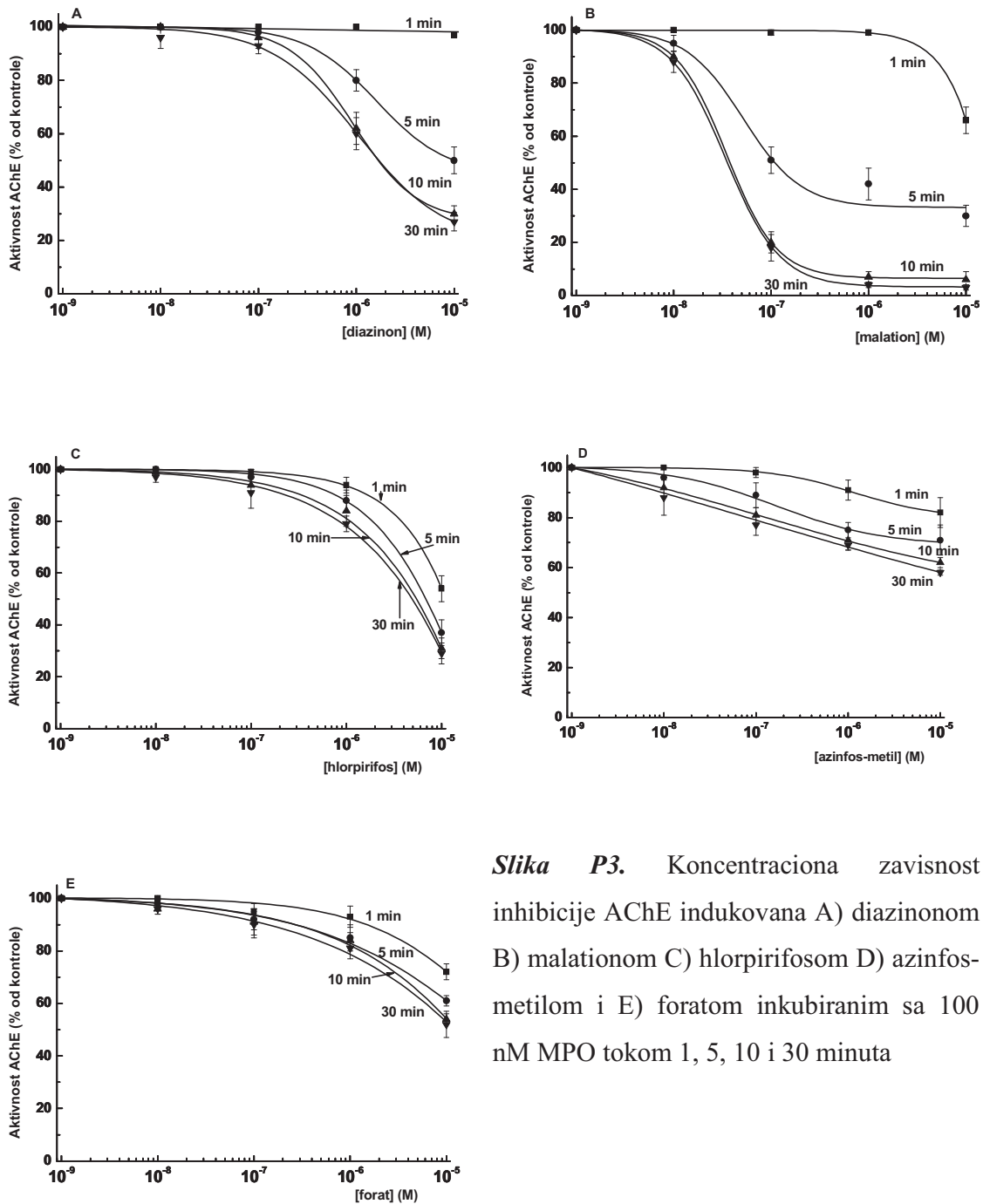
7. PRILOZI



Slika P1. Metabolička transformacija organo-tiofosfata pod uticajem citohroma P450



Slika P2. Kalibracioni grafici za određivanje koncentracija OP pomoću UPLC analize



Slika P3. Koncentraciona zavisnost inhibicije AChE indukovana A) diazinonom B) malationom C) hlorpirifosom D) azinfos-metilom i E) foratom inkubiranim sa 100 nM MPO tokom 1, 5, 10 i 30 minuta

BIOGRAFIJA

Tamara Lazarević-Pašti je rođena 14.06.1984. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju. Školske 2003/2004. godine upisala se na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar. Diplomirala je 10.07.2008. godine sa prosečnom ocenom 8,82 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer biohemija, upisala je školske 2008/2009. godine. Od novembra 2008. godine zaposlena je u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke “Vinča”, kao istraživač-saradnik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а ТАМАРА ЛАЗАРЕВИЋ - ПАШТИ

број уписа 14/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ПРИМЕНА ОКСИДАЦИЈЕ ОРГАНО-ТИОФОСФАТНИХ ПЕСТИЦИДА У МЕТОДАМА ЗА ЊИХОВУ ДЕТЕКЦИЈУ НА БАЗИ ИНХИБИЦИЈЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19. 3. 2010.

Тамара Лазаревић - Пашти

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а ТАМАРА ЛАЗАРЕВИЋ - ПАШТИ

број уписа 14/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ПРИМЕНА ОКСИДАЦИЈЕ ОРГАНО-ТИОФОСФАТНИХ ПЕСТИЦИДА У МЕТОДАМА ЗА ЊИХОВУ ДЕТЕКЦИЈУ НА БАЗИ ИНХИБИЦИЈЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19. 3. 2010.

Тамара Лазаревић - Пашт

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ТАМАРА ЛАЗАРЕВИЋ - ПАШТИ

Број уписа 14/2008

Студијски програм ДОКТОР БИОХЕМИЈСКИХ НАУКА

Наслов рада „ПРИМЕНА ОКСИДАЦИЈЕ ОРГАНО-ПРОСОФАТНИХ ПЕСТИЦИДА У МЕТОДАМА
ЗА ЊИХОВУ ДЕТЕКЦИЈУ НА БАЗИ ИНХИБИЦИЈЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ“

Ментор ПРОФ. ДР ЈУБА МАНДИЋ И ДР ВЕСНА ВАСИЋ

Потписани ТАМАРА ЛАЗАРЕВИЋ - ПАШТИ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19. 3. 2012.

Tamara Lazarevic-Pastir

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„ПРИМЕНА ОКСИДАЦИЈЕ ОРГАНО-ТИОФОСФАТНИХ ПЕСТИЦИДА У МЕТОДАМА
ЗА ЊИХОВУ ДЕТЕКЦИЈУ НА БАЗИ ИНХИБИЦИЈЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.3.2012.

Јашара Јовановић-Раћ