



УДК 543.054+543.635.62

## Нанопористые золь-гель материалы с иммобилизованными антителами для иммуноаффинного концентрирования пирена

Русанова Т.Ю., Левина Н.А., Юрасов Н.А., Горячева И.Ю.

ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов

Поступила в редакцию 14.04.2009 г.

### Аннотация

Предложен подход к иммуноаффинному концентрированию пирена из водных растворов, основанный на использовании сорбентов, полученных по золь-гель технологии и содержащих специфичные к пирену антитела. Показано, что полученные золь-гель материалы обладают высокой сорбционной емкостью, возможностью многократного использования (до 12 циклов сорбция/десорбция), позволяют выделять пирен из его разбавленных растворов с фактором концентрирования 100 при степени извлечения 96 %.

**Ключевые слова:** иммуноаффинные колонки, золь-гель технология, пирен

The approach for immunoaffinity preconcentration of pyrene from aqueous solutions was developed on the basis of sol-gel sorbents with specific anti-pyrene antibodies. It was shown that prepared sol-gel materials are characterized by high capacity and possibility for repeated application (to 12 absorption/desorption cycles). Pyrene could be isolated and enriched by a factor of 100 and recovery 96 %.

**Key words:** immunoaffinity columns, sol-gel technology, pyren

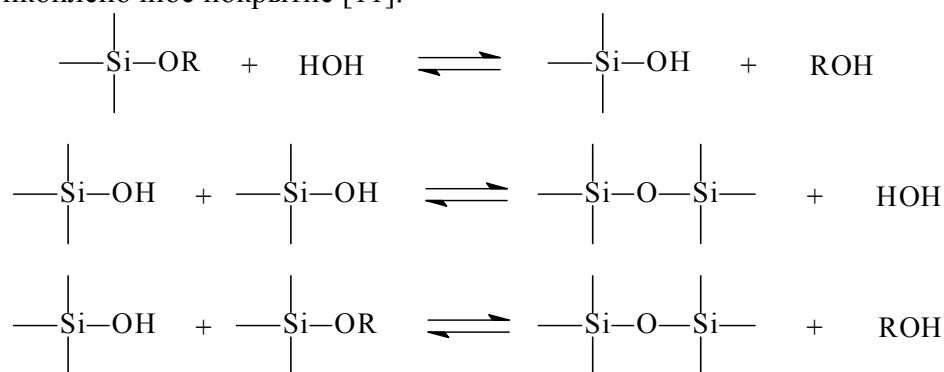
### Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к наиболее распространенным, приоритетным загрязнителям окружающей среды и обладают высокой канцерогенной и мутагенной активностью [1]. В связи с этим возникает необходимость мониторинга окружающей среды и контроля содержания ПАУ в питьевой воде и других объектах. Чаще всего для определения ПАУ используют хроматографические методы анализа с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции. В качестве твердофазных сорбентов используют различные материалы, например, фторуглеродный полимер [2], наночастицы серебра [3], сигаретные фильтры [4], хлопок [5] и т.д. В последние годы все большую популярность приобретает метод иммуноаффинного концентрирования благодаря своей высокой специфичности, эффективности извлечения аналитов из сложных смесей и высокой степени очистки пробы от мешающих компонентов. Получение сорбентов для иммуноаффинных колонок обычно основано на ковалентном связывании антител с полимерными материалами различной природы,

например, производными сефарозы [6]. Перспективными для применения в этой области являются и нанопористые золь-гель материалы, содержащие антитела внутри полимерной сетки [7-10]. Целью данной работы явилось получение золь-гель материалов на основе тетраметоксисилана (ТМОС), содержащих специфичные антитела к пирену, а также оценка возможности их использования в качестве сорбентов в иммуноаффинных колонках для выделения и концентрирования пирена из водных растворов с последующим хроматографическим определением.

### Теоретическая часть

Принцип золь-гель процесса заключается в переходе жидкого раствора алкоксида кремния (например, ТМОС) в гель в результате реакций гидролиза и поликонденсации, который затем превращается в монолитный композит, порошок или тонкопленочное покрытие [11].



Золь-гель материалы отличаются простотой получения, оптической прозрачностью, твердостью, химической и термической стойкостью, а также обеспечивают удобный способ включения в них различных аналитических реагентов, в том числе и биомолекул (ферментов, антител, а иногда и целых клеток) с целью дальнейшего использования в биосенсорах, методах разделения и концентрирования и т.д. [12,13]. Благодаря определенному размеру пор биомолекулы удерживаются внутри полимерной сетки, в то время как небольшие молекулы способны диффундировать сквозь материал (рис. 1). Можно отметить следующие наиболее важные преимущества использования золь-гель материалов для иммобилизации биомолекул:

- регулируемый размер пор (путем изменения соотношения Si/H<sub>2</sub>O и условий проведения реакций);
- сохранение биомолекулами своих функций (ферменты сохраняют каталитическую способность, антитела – способность к иммунохимическому взаимодействию, клетки остаются жизнеспособными);
- жёсткая структура полимерной сетки геля затрудняет вымывание биомолекул;
- матрица геля оказывает защитное действие для биомолекулы (от мешающих компонентов образца, биодеградации и т.д.), обеспечивая при этом бóльший срок ее службы;
- поры геля заполнены водным раствором, за счет чего находящиеся внутри пор антитела сохраняют свою специфичность и аффинность;
- гидрофильная силикатная матрица уменьшает неспецифическую сорбцию неполярных соединений.

Принцип действия иммуоаффинной колонки представлен на рис. 2. Специфичные к аналиту антитела в избыточном количестве иммобилизованы на сорбенте. Жидкая проба вводится в колонку, при этом аналит (антиген) образует комплекс с антителами и, таким образом, прочно удерживается на сорбенте. Физически адсорбированные примеси удаляют промывкой колонки водными растворами (возможна добавка небольших количеств органических растворителей), а затем проводят элюирование аналита органическими растворителями, которые разрушают иммуокомплекс антиген-антитело [14]. Высокая специфичность антител и высокие константы связывания ими антигенов обеспечивают улучшенные характеристики разделения и концентрирования при использовании иммуоаффинных колонок.

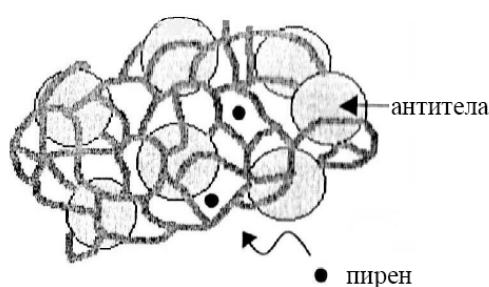


Рис. 1. Схематическое представление золь-гель материала с иммобилизованными антителами

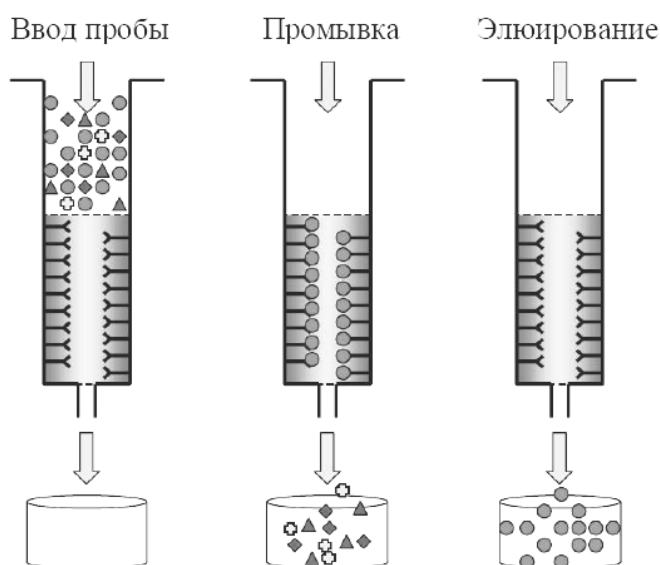


Рис. 2. Принцип действия иммуоаффинной колонки Y – антитела, ● – пирен, ▲ ◆ + – примеси

## Эксперимент

В работе были использованы следующие реагенты и материалы: тетраметоксисилан  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$  (Sigma, Бельгия, 99 %); пирен (“Fluka”, Германия, марка “*purum*” (99.9 %)); поликлональные антитела к пирену (любезно предоставлены R. Niessner и D. Knopp, Институт гидрохимии и химической бальнеологии, Технический Университет Мюнхена, Германия); полиэтиленгликоль 400 (“Federa”, Бельгия); ацетонитрил (HPLC-gradient grade, “Panreac”, Испания); колонки на 1 мл (Bond Elut, “Varian”) и полиэтиленовые пористые фильтры (диаметр 1/4 дюйма) (“Varian”).

В качестве промывочного буфера и для разбавления антител использовался фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) 0.01 М, pH 7.4. Исходный раствор пирена готовили растворением навески сухого вещества в ацетонитриле, рабочие растворы готовили в смеси ацетонитрил : вода в соотношении 1:9.

Для определения концентрации пирена использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию со спектрофотометрическим детектированием (хроматографическая система Стайер, “Аквилон”, Россия). Разделение проводилось на колонке Luna 5 мкм C18(2) 15 см × 4.6 мм (“Phenomenex”) при комнатной

температуре и скорости потока 1 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил : вода в соотношении 80 : 20. Объем пробы составлял 20 мкл. Регистрацию проводили при  $\lambda=234$  нм.

Приготовление сорбента с иммобилизованными антителами осуществляли следующим образом. ТМОС и 2.5 мМ HCl в молярном соотношении Si : H<sub>2</sub>O = 1 : 8 в присутствии 10 % ПЭГ-400 встряхивали в течение 1 мин и выдерживали в УЗ-ванне (Сапфир, рабочая частота 35 кГц) 30 мин. Затем добавляли равный объем раствора антител (10 мкг/мл, рН 7.4). Раствор перемешивали в течение 5 сек и оставляли на 10 мин до гелеобразования. Образовавшийся гель промывали ФСБ и выдерживали в холодильнике (4°C) под слоем ФСБ в течение 24 часов. Через сутки гель (0,27 г) размельчали и помещали в стандартную колонку для твердофазной экстракции между двумя пористыми фильтрами. Для измерения удельной площади поверхности и размера пор сорбента использовали анализатор Quantochrome Nova.

### Обсуждение результатов

При получении золь-гель материалов с иммобилизованными антителами за основу был взят метод, описанный в работе [10] и использованный для концентрирования тринитротолуола. Однако в данном случае в золь-гель матрицу были иммобилизованы антитела, специфичные к пирену. Необходимо отметить, что процедура получения золь-гель материала проводится в две стадии, на первой из которых получается золь на основе ТМОС и водного раствора кислоты, а раствор антител вводится в реакционную смесь на второй стадии, чтобы предотвратить воздействие на антитела УЗ-облучения. Параметры полученного геля, измеренные с использованием анализатора удельной площади поверхности и размера пор Quantochrome Nova, представлены в таблице.

Эксперименты по сорбции пирена полученным золь-гель сорбентом осуществляли в динамических условиях. Водные растворы пирена, содержащие 10 % ацетонитрила, пропускали через колонку с помощью шприца со скоростью 1 капля в секунду. Затем колонку промывали фосфатно-солевым буферным раствором и далее элюировали пирен органическим растворителем. Концентрацию пирена на выходе из колонки и в элюате определяли хроматографически. Нижняя граница определяемых содержаний пирена с использованием ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием составила 15 нг/мл.

На первом этапе работы показано, что при пропускании 1 мл раствора пирена с концентрациями от 50 до 1000 нг/мл, через колонку, наполненную золь-гель сорбентом (50 мг в пересчете на сухой материал), пирен сорбируется практически полностью. Доля сорбированного пирена, рассчитанная на основе площадей хроматографического пика для растворов до и после колонки, представлена в табл. 2. Более высокие концентрации не изучались ввиду следовых количеств пирена в объектах окружающей среды и его низкой растворимости в водных растворах.

Таблица 1. Характеристики сорбента, полученного по золь-гель технологии

Удельная площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г	472
Объем пор, м <sup>3</sup> /г	0,25
Средний радиус пор, нм	1,6

После промывки колонки 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора, пирен элюировали органическим растворителем, приводящим к разрушению

иммунокомплекса антиген-антитело [14]. В качестве возможных элюентов апробированы ацетонитрил и этанол. Как видно из рис. 3 практически полная десорбция пирена из колонки достигалась при элюировании 2 мл ацетонитрила, что и использовалось нами в дальнейших экспериментах.

Таблица 2. Сорбция пирена золь-гель сорбентом, содержащим антитела

Масса пирена, введенного в колонку, нг	Доля сорбированного пирена, %
50	100
100	100
500	98
1000	97

Использованные колонки регенерировали пропусканием избытка органического растворителя и фосфатно-солевого буферного раствора и повторяли сорбцию. На рис. 4 представлена зависимость степени извлечения пирена из раствора с концентрацией 50 нг/мл при многократном использовании колонки. Как видно из рисунка, колонки позволяют проводить до 12 циклов сорбция-десорбция без потери сорбционной активности.

Контроль вымывания антител из колонки проводили методом абсорбционной УФ-спектроскопии ( $\lambda = 280$  нм). Показано, что вымывания антител при промывке колонки как водными, так и органическими растворами не происходит.

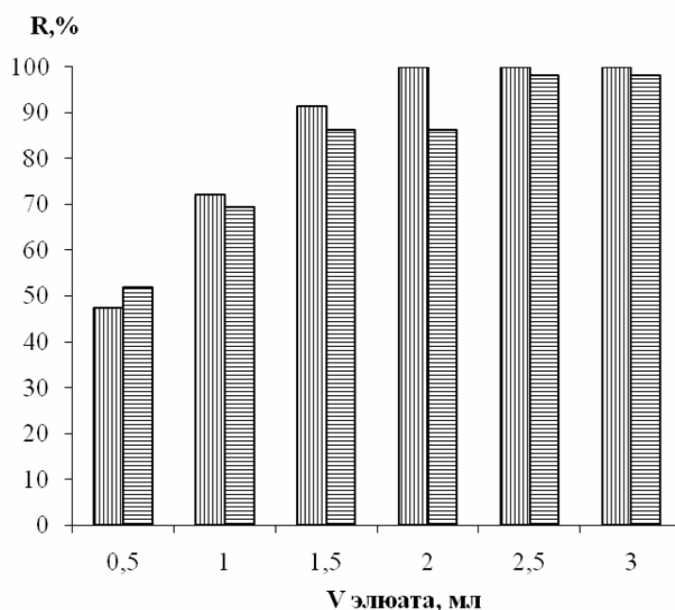


Рис. 3. Степень извлечения пирена (после пропускания 1 мл раствора с  $C_{исх}=50$  нг/мл) при элюировании различными объемами ацетонитрила (вертикальная штриховка) и этанола (горизонтальная штриховка)

Для оценки неспецифической сорбции пирена на золь-гель сорбенте проводили эксперименты с использованием золь-гель материала, приготовленного по такой же методике, но без введения антител. Так, при пропускании 250 мл раствора пирена с концентрацией 0,5 нг/мл доля сорбции пирена на колонке с антителами и без антител составила 96 и 47 % соответственно, что говорит о значительном вкладе иммунохимического взаимодействия в удерживание пирена на сорбенте.

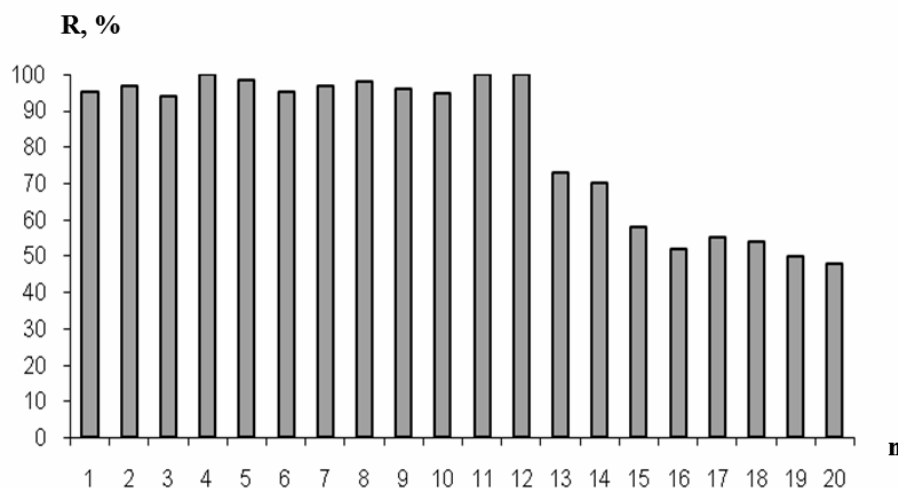


Рис. 4. Степень извлечения пирена ( $C_{исх}=50$  нг) при многократном использовании колонки

Степень извлечения пирена из водных растворов различной концентрации с использованием разработанной иммуноаффинной колонки представлена в табл. 3. Как видно из таблицы, колонки позволяют концентрировать пирен из растворов, содержащих до 125 нг с высокой степенью извлечения. При этом величина фактора концентрирования пирена из его растворов с концентрацией 0,5 нг/мл достигает 100 (при пропуске 250 мл раствора и его элюировании 2,5 мл растворителя) при степени извлечения 96 %. После предварительного выделения и концентрирования пирена из анализируемых водных растворов определяли его содержание методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таблица. 3. Степень извлечения пирена из водных растворов

Объем раствора, мл	Концентрация раствора, нг/мл	Масса пирена в растворе, нг	Масса пирена в элюате, нг	Степень извлечения, %
10	10	100	104	104
10	5	50	49.6	99
20	5	100	92.8	93
100	5	500	295	59
250	0,5	125	120	96
500	0,5	250	167	67

## Заключение

Получены золь-гель материалы на основе тетраметоксисилана, содержащие антитела специфичные к пирену. Показано, что полученные материалы могут быть использованы в качестве сорбентов для иммуноаффинных колонок с высокой сорбционной емкостью и возможностью многократного использования (до 12 циклов). Выбраны оптимальные параметры элюирования пирена из колонки. Величина фактора концентрирования пирена из его растворов с концентрацией 0,5 нг/мл достигает 100 при степени извлечения 96 %. Показано, что иммобилизованные антитела прочно удерживаются в золь-гель матрице, сохраняя свою активность и стабильны по отношению к органическим растворителям.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 08-03-00725.*

## Список литературы

1. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксиантов. М.: Химия, 1996. 319 с.
2. Oliferova L., Statkus M., Tsysin G., Shpigun O., Zolotov Yu. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents // *Anal. Chim. Acta*. 2005. Vol. 538. P. 35–40.
3. Romanovskaya G.I., Olenin A.Yu., Vasil'eva S.Yu., Krutyakov Yu.A. Chemically modified silver nanoparticles as a new sorbent for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solutions // *Doklady Chemistry*. 2008. Vol. 422. No. 1. P. 236–239.
4. Hua-Ding Liang, De-Man Han, Xiu-Ping Yan. Cigarette filter as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water // *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1103. P. 9–14.
5. Jing-fu Liu, Yu-guang Chi, Gui-bin Jiang, Chao Tai, Jing-tian Hu. Use of cotton as a sorbent for on-line precolumn enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters prior to liquid chromatography determination // *Microchem. J.* 2004. Vol. 77. P. 19–22.
6. Cun Li, Zhanhui Wang, Xingyuan Cao, Ross C. Beier, Suxia Zhang, Shuangyang Ding, Xiaowei Li, Jianzhong Shen. Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues // *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1209. P. 1–9.
7. Schoringhumer K., Cichna-Markl M. Sample clean-up with sol-gel enzyme and immunoaffinity columns for the determination of bisphenol A in human urine // *Journal of Chromatography B*. 2006. Vol. 850. № 1-2. P. 361–369.
8. Brenn-Struckhova Z., Cichna-Markl M., Bo1hm C., Razzazi-Fazeli E. Selective sample cleanup by reusable sol-gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples // *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79, p. 710–717.
9. Pulido-Tofino P., Barrero-Moreno J.M., Perez-Conde M.C. Analysis of isotretinoin at trace level by solid phase competitive fluoroimmunosensing after enrichment in a sol-gel immunosorbent // *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 562. P. 122–127.
10. Altstein M., Bronshtein A., Glattstein B., Zeichner A., Tamiri T., Almog J. Immunochemical approaches for purification and detection of TNT traces by antibodies entrapped in a sol-gel matrix // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 2461–2467.
11. Brinker C.J., Sherer G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, San Diego, 1990.
12. Lev O., Tsionsky M., Rabinovich L., Glezer V., Sampath S., Pankratov I. Organically modified sol-gel sensors // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67. P. 22A–30A.
13. Collinson M.M. Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials // *Trends Anal. Chem.* 2002. Vol. 21. P. 30–38.
14. Егоров А.М., Осипов А.П. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991, 288 с.

---

**Русанова Татьяна Юрьевна** - к.х.н., доцент кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета, тел. (факс) (8452)516960

**Rusanova Tatiana Yu.** – PhD, assoc. professor of analytical chemistry and chemical ecology department, Saratov state university, e-mail: [tatyanar@mail.ru](mailto:tatyanar@mail.ru)

**Левина Надежда Алексеевна** - студентка химического факультета СГУ

**Юрасов Николай Александрович** - аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии СГУ

**Горячева Ирина Юрьевна** - д.х.н., профессор кафедры общей и неорганической химии СГУ

**Levina Nadezhda A.** – student of chemical department, Saratov state university, e-mail: [lna1988@mail.ru](mailto:lna1988@mail.ru)

**Yurasov Nikolai A.** – post-graduate student of analytical chemistry and chemical ecology department, Saratov state university

**Goryacheva Irina Yu.** – D.Sci.(Chemistry), professor of common and inorganic chemistry department, Saratov state university, e-mail: [goryachevaiy@info.sgu.ru](mailto:goryachevaiy@info.sgu.ru)