



УДК 543.38:543.9

Иммунохимические реакции, протекающие на поверхности пьезокварцевого сенсора, при определении стрептомицина в пищевых продуктах

Воронежцева О.В., Нартова Ю.В., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Еремин С.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 17.07.2009 г.

Аннотация

Изучены иммунохимические реакции, протекающие на поверхности пьезокварцевого сенсора, предназначенного для определения стрептомицина. Методом пьезокварцевого микровзвешивания и атомно-силовой микроскопии исследована ковалентная иммобилизация гаптен-белкового конъюгата на силанизированную поверхность электрода сенсора. Оценена аффинность и рассчитаны коэффициенты перекрестного реагирования поликлональных антител с соединениями родственной структуры. Разработана методика определения следовых концентраций стрептомицина в курином мясе с применением пьезокварцевого аффинного сенсора. Предел обнаружения составляет 0,6 нг/мл, диапазон определяемых содержаний 1 - 50 нг/мл.

Ключевые слова: аффинный пьезокварцевый сенсор, стрептомицин, поверхностная иммунохимическая реакция, иммуноаффинное рецепторное покрытие, атомно-силовая микроскопия, анализ пищевых продуктов.

Immunochemical reactions were estimated by quartz crystal, the streptomycin intended for definition. Bioreceptor coating based on hapten-protein conjugates was formed on the silanize surface of the sensor electrodes and investigated by method microbalance and atomic force microscopy. Polyclonal antibodies affinity was estimated. Coefficients of cross-reaction with structurally related compounds are counted. The methodic of detection of residual quantities of streptomycin in chicken meat by affine quartz crystal microbalance is developed. The limit detection of streptomycin is 0,6 ng·ml⁻¹, a linear range from 1-50 ng·ml⁻¹.

Key words: affine piezoquartz sensor, streptomycin, surface immunochemical reactions, immunoaffine receptor coating, atomic force microscopy, analysis of food

Введение

Стрептомицин - антибиотик, использующийся не только в ветеринарной, но и клинической практике для лечения людей. Поэтому крайне нежелательно попадание антибиотика в организм человека с пищевыми продуктами. Уровень

стрептомицина в животноводческой продукции строго нормируется и не должен превышать 500 мкг/кг в мясе и печени, 1000 мкг/кг в почках, 200 мкг/л в молоке [1]. В Германии также нормируется содержание стрептомицина в меде - 20 мкг/кг [2]. Еще более низкие значения ПДК установлены для детского питания.

Для определения аминогликозидных антибиотиков рекомендуются методы высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, капиллярный электрофорез, позволяющие проводить детектирование токсикантов на уровне 0,01 мкг/мл (10 мкг/кг) [2 - 6]. Однако такие методы требуют многостадийной пробоподготовки, дорогостоящего оборудования, что затрудняет их использование для серийных анализов. Поэтому систематический анализ пищевых продуктов на содержание антибиотиков в настоящее время в нашей стране практически не проводится. Следовательно, актуальной задачей является разработка новых, селективных и чувствительных способов определения стрептомицина в пищевой продукции. Такая задача может быть решена с применением пьезокварцевого аффинного сенсора.

Цель настоящего исследования - изучение закономерностей иммунохимического взаимодействия, протекающих на поверхности пьезокварцевого сенсора и обеспечивающих специфическое детектирование следовых концентраций стрептомицина, исследование процесса формирования иммуноаффинного слоя сенсора, разработка методики определения следовых концентраций антибиотика в пищевых продуктах.

Эксперимент

Реактивы: хлорид натрия, калия; дигидрофосфат, гидрофосфат, роданид калия; сульфат аммония, ацетон (х.ч., Россия); этиловый спирт (ч.д.а., Россия); диметилформамид; хлороформ; ацетонитрил (о.с.ч., "Quimica", Испания); стрептомицин; стрептомицин - белковый конъюгат (STP-cc-BSA) полученный сшивкой стрептомицина с бычьим сывороточным альбумином (BSA); поликлональные антитела к стрептомицину (An-STP и An-STP-BSA), любезно предоставлены профессором Р. Абулкнешей (Королевский университет, Великобритания).

Для приготовления фосфатного буферного физиологического раствора (рН = 7.2) растворяли 8.0145 г NaCl, 0.2012 г KCl, 2.864 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.204 г KH_2PO_4 в 1 л бидистиллированной воды.

Для формирования подложки сенсора применяли γ -аминопропилтриэтоксисилан - APTS ("Reanal", Венгрия); в качестве кросс-реакента - глутаровый альдегид - GA ("Reanal", Венгрия).

Физическим преобразователем служил резонатор АТ - среза с собственной частотой колебаний 10 МГц с электродами диаметром 10 мм, полученными термическим напылением золота на шлифованную кварцевую пластинку (ЗАО «ЭТНА», Россия). Аналитический сигнал аффинного пьезокварцевого сенсора (Δf) измеряли на установке, описанной ранее [7]. Для отделения денатурированных белков использовали настольную центрифугу ЦЛН-2 (КиргизИНТИ, Киргистан).

Для оценки морфологии поверхности применяли атомно-силовой микроскоп Solver PRO-M (ЗАО «Нанотехнология-МДТ», Россия). Исследования проводили в полуконтактном режиме на сухих образцах.

Подготовка проб куриного мяса. Мясо предварительно гомогенизировали, а затем экстрагировали антибиотик следующими способами:

Способ 1. К 2,5 г пробы добавляли 10,0 мл ацетонитрила, перемешивали, охлаждали и центрифугировали 2 мин (7000 об/мин). Супернатант отделяли, выпаривали и полученный остаток растворяли в 980 мкл фосфатного буферного раствора;

Способ 2. 10,0 г пробы, смачивали 20 мл воды и тщательно перемешивали. Добавляли 100 мл ацетонитрила, 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и встряхивали в течение 1 часа на вибросмесителе, фильтровали под вакуумом. Экстракт очищали, используя 50 мл смеси гексана и дихлорэтана (3 : 2). Среднюю часть выпаривали и полученный остаток растворяли в 980 мкл фосфатного буферного раствора;

Способ 3. К 10,0 г пробы добавляли 20 мл дистиллированной воды. Перемешивали в течение 10 мин. Для повышения полноты экстрагирования добавляли ацетон в соотношении 1:1 и встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали в течение 10 мин (3000 об/мин), супернатант отделяли, выпаривали и полученный остаток растворяли в 980 мкл фосфатного буферного раствора;

Способ 4. К 10,0 г пробы добавляли 50 мл бидистиллированной воды и 10 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, для отделения белковых компонентов, перемешивали, охлаждали и центрифугировали 8 мин (7000 об/мин). Надосадочную жидкость использовали для анализа.

Обсуждение результатов

Изучение закономерностей иммунохимической реакции на поверхности аффинного пьезокварцевого сенсора. Для определения следовых концентраций стрептомицина применяли конкурентный формат анализа, при осуществлении которого на поверхности электродов сенсора иммобилизовали конъюгат BSA со стрептомицином, а в пробу, содержащую аналит, вводили заранее установленное количество антител, соответствующее 50 % - ному связыванию. Для разработки методики определения стрептомицина было необходимо:

изучить условия формирования иммуноаффинного слоя на поверхности электрода сенсора, предназначенного для детектирования низких концентраций антибиотика;

определить аффинность антител к определяемому соединению;

оценить перекрестное реагирование поликлональных антител к стрептомицину с другим ветеринарным антибиотикам.

Известно, что многослойное покрытие, полученное предварительной силанизацией поверхности электрода сенсора, активацией бифункциональным реагентом и ковалентным закреплением гаптен-белкового конъюгата, характеризуется повышенной устойчивостью при эксплуатации в жидких средах и высокой поверхностной концентрацией активных сайтов распознавания [8]. Свойства иммуноаффинного слоя существенно зависят от природы и строения иммобилизованного конъюгата, послонного увеличения массы и степени шероховатости поверхности. Процесс формирования покрытия сенсора контролировали методом пьезокварцевого микровзвешивания (рис. 1) и атомно-силовой микроскопии (рис.2). Поверхность золотого электрода, полученного методом магнетронного напыления, характеризуется довольно высокой степенью шероховатости (R_a), которая может негативно влиять на доступность активных центров распознавания, поскольку нахождение таких центров на нижнем уровне

неоднородной поверхности практически исключает возможность их связывания с объемными белковыми молекулами антител (рис. 2а).

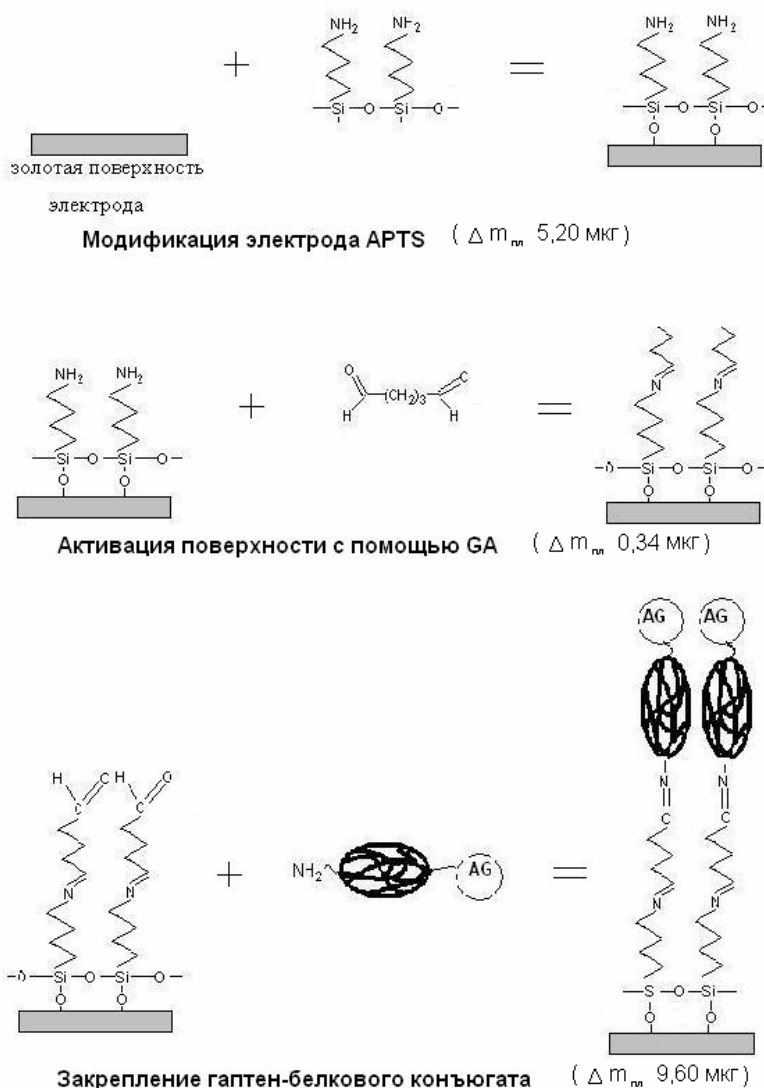


Рис. 1. Формирование рецепторного слоя ($\Delta m_{пл}$ - поэтапное увеличение массы слоя)

Поэтому основной задачей силанизации с помощью APTS является выравнивание поверхности и получение прочно связанной с металлическим электродом за счет гидроксильных групп подложки с активными терминальных NH_2 - группами, обеспечивающими прочные связи с кросс-реагентом. Было установлено, что нанесение 5%-го раствора γ -аминопропилтриэтоксисилана (расход реагента 2 мкл/см²) приводит к максимальному сглаживанию поверхностного слоя ($R_a=45$) и уменьшению разницы между «верхним» и «нижним» уровнями неоднородности поверхности (Δh) (рис. 2б). При применении на этой стадии больших объемов и концентраций APTS происходит существенное увеличение присоединенной массы ($\Delta m_{пл}$), которое сужает диапазон определяемых содержаний или даже приводит к перегрузке сенсора и срыву аналитического сигнала.

Применение в качестве бифункционального реагента глутарового альдегида, способствует образованию гибкого линкерного мостика между силанизированной поверхностью и присоединяемой биомолекулой. При активации GA наблюдается

незначительное увеличение массы рецепторного слоя (0,34 мкг), но возрастает шероховатость поверхности ($R_a=83$) (рис. 2в), что может быть связано с закреплением GA на возвышенностях силикоанового покрытия.

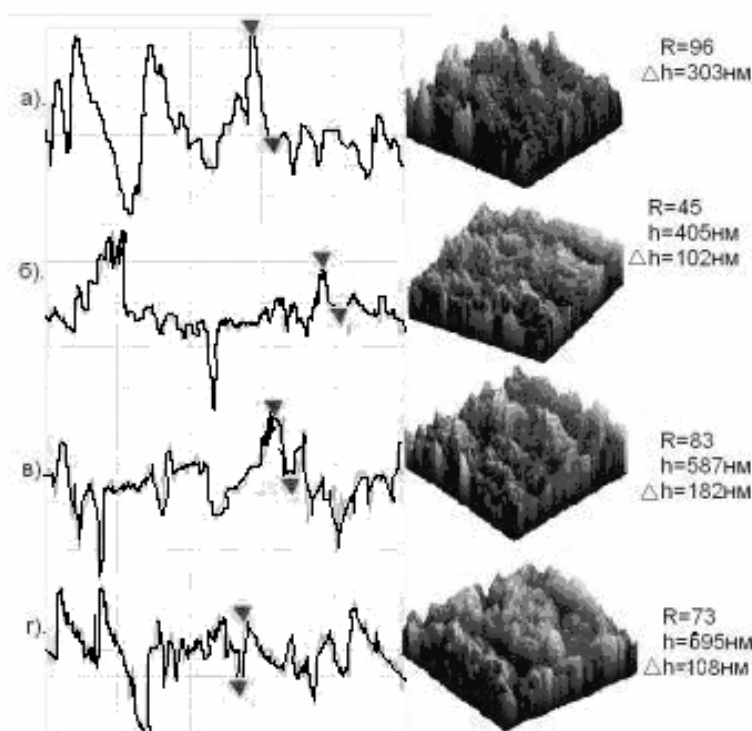


Рис. 2. Послойное изменение морфологии поверхности покрытия пьезокварцевого иммуносенсора

Максимальное увеличение массы иммуноаффинного слоя наблюдается на стадии закрепления гаптен-белкового конъюгата. Существенные перепады «низменностей» и «возвышенностей» на поверхности сенсора способствуют присоединению конъюгата преимущественно на выступающих точках поверхности, а большой объем биомолекул приводит к частичному перекрыванию нижних уровней, поэтому степень шероховатости снижается ($R = 73$) (рис. 2г). Таким образом, образуется покрытие с хорошей пространственной доступностью активных центров, имеющее небольшую массу (15,50 мкг) и высокую гидролитическую устойчивость.

Предварительно полученная зависимость аналитического сигнала сенсора от концентрации специфичных антител (рис. 3) позволила установить рабочую концентрацию, соответствующую 50 %-ному связыванию и позволяющую достичь оптимального соотношения активных центров на поверхности сенсора и количества молекул антител, не связавшихся в гомогенный аффинный комплекс со стрептомицином. Использование концентрации антител за пределами линейной зависимости, приводит к искажению сигнала сенсора из-за неспецифического связывания в области малых концентраций и нарушения линейной зависимости Δf от изменения массы в области больших концентраций.

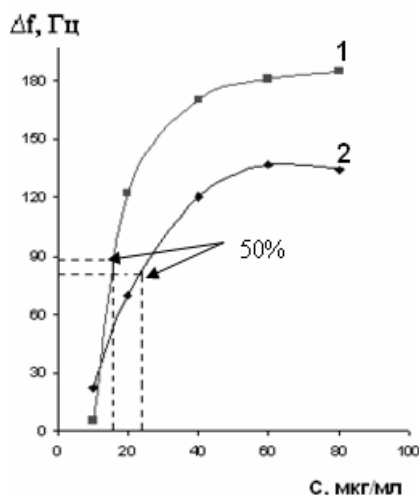


Рис. 3. Выбор оптимальной концентрации антител
1 – (An-STP-BSA) и 2 – (An-STP) к стрептомицину

Концентрация, соответствующая 50 % связыванию для антител An-STP-BSA и An-STP, составляет 17 и 23 мкг/мл соответственно.

Возможность использования антител для молекулярного распознавания оценивалась по константе аффинности ($K_{Аф}$), характеризующей сродство и специфичность иммунореагентов, рассчитанной по методике Скэтчарда как отношение констант скоростей образования (k_o) и разрушения (k_p) гетерогенного иммунокомплекса (табл. 1). Для всех исследованных иммунореагентов значение константы k_o ($\approx 10^5$) свидетельствует о практически мгновенном связывании в аффинный комплекс, а достаточно низкая величина k_p ($\approx 10^{-5}$) указывает на прочность поверхностного комплекса, что создает дополнительные трудности при его разрушении на стадии регенерации.

Таблица 1. Константы скорости прямой и обратной иммунохимической реакции и $K_{Аф}$ антител к стрептомицину

| антитела | $k_o \cdot 10^{-5}$, моль ⁻¹ ·л с ⁻¹ | $k_p \cdot 10^5$, с ⁻¹ | $K_{Аф} \cdot 10^{-10}$, М ⁻¹ |
|------------|--|---------------------------------------|--|
| Anti-STP | 2,55 | 1,31 | 1,95 |
| An-STP-BSA | 1,30 | 1,20 | 1,08 |

Константы аффинности изученных антител свидетельствуют о высоком сродстве к стрептомицину и могут быть применены для определения следовых концентраций антибиотика.

Для оценки селективности определения стрептомицина были рассчитаны коэффициенты перекрестного реагирования (ПР%) поликлональных антител с антибиотиками родственного строения (в структуру которых входят молекулы аминокислот) и назначения, а также другими соединениями, присутствующими в фармацевтических препаратах на основе стрептомицина (табл. 2):

$$ПР\% = 100 \times C_{анал.} / C_{инд. соед.}$$

где $C_{инд.соед.}$, $C_{анал.}$ – концентрация определяемого и мешающего соединения соответственно.

Таблица 2. Коэффициенты перекрестного реагирования (ПР%) поликлональных антител An-STP-BSA к стрептомицину

| Аналит | ПР, % | Аналит | ПР, % |
|--------------|--------|-------------|-------|
| Стрептомицин | 100,00 | Эрихромицин | 5,34 |
| Ампициллин | 2,74 | Ласалоцид | 3,42 |
| Бацитрацин | 5,78 | Сахароза | <1,00 |
| Гентамицин | 2,51 | Тетрациклин | 1,66 |

Антибиотики сходного строения имеют значения ПР% порядка 2-6% и следовательно не должны оказывать существенного влияния на результаты определения стрептомицина в пробах при совместном присутствии. Сахароза (ПР% <1,00), входящая в состав фармацевтических препаратов в качестве наполнителя, также практически не оказывает мешающего влияния на определение стрептомицина, даже в количествах, существенно превышающих содержание аналита.

Разработка методики определения стрептомицина. Определение стрептомицина осуществляли в проточно-инжекционном режиме. Предварительные исследования показали, что при извлечении антибиотика из куриного мяса по способу 4 удается достичь максимальной степени извлечения (93 %, другими способами 90 % и ниже). Перед началом измерений через проточную ячейку пропускали фосфатный буферный раствор до стабилизации сигнала сенсора. При определении стрептомицина к пробе, содержащей аналит, добавляли 50 мкл раствора антител (An-STP-BSA) с концентрацией 17 мкг/мл, затем пробу вводили в поток раствора-носителя. При этом гаптен-белковый конъюгат, иммобилизованный на поверхности сенсора, и стрептомицин анализируемой пробы конкурировали за ограниченное количество антител. Аналитический сигнал сенсора был обратно пропорционален содержанию стрептомицина в пробе.

Методика была апробирована на модельных растворах и образцах куриного мяса. В табл. 3 приведены метрологические характеристики разработанной методики.

Таблица 3. Метрологические характеристики методики определения стрептомицина с помощью аффинного пьезокварцевого сенсора

| Пара иммунореагентов | C_{\min} , нг/мл | Диапазон определяемых содержаний, нг/мл | Уравнение градуировочной функции |
|-------------------------|--------------------|---|----------------------------------|
| An-STP + STP-cc-BSA | 8,0 | 10 - 50 | $y = -1,3x + 67,1$ |
| An-STP-BSA + STP-cc-BSA | 0,6 | 1 - 50 | $y = -1,2x + 112,0$ |

Более широкий диапазон определяемых содержаний и низкий предел обнаружения стрептомицина наблюдается при использовании антител An-STP-BSA, поэтому эта антисыворотка была использована при определении стрептомицина в курином мясе.

Правильность определения стрептомицина с помощью аффинного пьезокварцевого сенсора проверена методом “введено – найдено” (табл. 4).

Таблица 4. Проверка правильности определения стрептомицина с помощью аффинного пьезокварцевого сенсора ($n = 3$, $P = 0,95$)

| Введено, нг/мл | Найдено, нг/мл | % открытия | S_r |
|----------------|----------------|------------|-------|
| 1,00 | 1,00±0,01 | 100±10 | 0,01 |
| 10,00 | 10,00±0,02 | 100±20 | 0,03 |
| 50,00 | 49,80±0,01 | 100±10 | 0,01 |

Статистическая обработка результатов с помощью критерия Стьюдента не выявила систематической погрешности. Низкие значения S_r свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов анализа.

Результаты определения стрептомицина в мясной продукции (табл. 5) не выявили превышения содержания стрептомицина относительно нормируемых показателей (в табл.5 приведены также пересчитанные результаты в мг/кг). Продолжительность анализа не превышала 20 мин.

Таблица 5. Результаты определения стрептомицина в курином мясе

| Объект исследования | Найдено | | S_r |
|--------------------------|------------|-----------|-------|
| | нг/мл | мг/кг | |
| Грудки куриные Канада | 45,00±0,05 | 0,03±0,01 | 0,01 |
| Грудки куриные Москва | 50,00±0,10 | 0,02±0,01 | 0,02 |
| Грудки куриные Липецк | 28,00±0,02 | 0,02±0,01 | 0,01 |

Следовательно, можно констатировать, что изучение закономерностей иммунохимической реакции, протекающей на поверхности пьезокварцевого сенсора, применение высокоаффинных и специфичных иммунореагентов позволило разработать высокочувствительную и селективную методику определения остаточных концентраций стрептомицина в пищевых продуктах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Липецкой области (грант № 09-03-97566_p_центр_a).

Список литературы

1. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
2. Buijnsvoort M., Ottink S.J.M., Jonker K.M., Boer E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // J.Chromatogr. 2004. V. 1–2. P. 137–142.
3. Zhen Y.F., Xiao C.X., Li X.Q., Cai J.N., Hong H.H., Huaxue Fenxi Определение остатков линкозамидов и макролидов в тканях животных методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (LC/MS/MS) // Chin. J. Anal. Chem. 2007. V. 9. P. 1290–1294.
4. Lima J., Delerue – Martos C., Vaz C. Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection // Analyst. 2000. V. 125. P. 1281 – 1284.
5. Федорчук В.А. Вольтамперометрическое определение стрептомицина и левомицетина в лекарственных препаратах и пищевых продуктах. Дисс. ... канд. хим. наук. Томск. 2003 131 с.

6. Kaufmann A., Maden K. Determination of 11 Aminoglycosides in Meat and liver by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // Journal of AOAC International. 2005. V. 88. P. 1118–1125.

7. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Оценка методов иммобилизации иммунореагентов на поверхности пьезокварцевых сенсоров для определения сульфопрепаратов в жидких средах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т.6. Вып 1. С. 99-107.

8. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А. Разработка пьезокварцевого иммуносенсора для проточно-инжекционного анализа высоко- и низкомолекулярных соединений // Вест. Моск. университета. 2002. Т. 43. Вып 6. С. 391-403.

9. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Применение проточного пьезокварцевого иммуносенсора для определения сульфаметоксазола в объектах окружающей среды // Журн. аналит. химии. 2006. Т.61. Вып 7. С. 744-750.

Воронежцева Ольга Вячеславовна – аспирант, Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк, тел. 8(4742)328155

Нартова Юлия Викторовна – к.х.н., доц. Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк, тел. 8(4742)328155

Ермолаева Татьяна Николаевна – д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии Липецкий государственный технический университет, Липецк

Еремин Сергей Александрович – д.х.н., профессор, вед. научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ

Voronezhstseva Olga V. – Post-graduate Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Nartova Julia V. – professor, Candidate of Science (Chemistry), associate Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – D.Sc (Chemistry), Professor, Head of the Chemistry Department, Russia, Lipetsk State Technical University, Chemistry Department, Lipetsk, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

Eremin Sergey A. – D.Sc (Chemistry), Professor Department of Chemical Enzymology, Moscow State University,