

тел. (495) 939 40

Струсовская Надежда Львовна - к.х.н., ст. научн. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии, Москва

Каверина Софья Сергеевна - мл. научн. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии, Москва

Кавалерская Наталья Евгеньевна - аспирант, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии, Москва

119991, Moscow, e-mail:
n.ferapontov@phys.chem.msu.ru

Strusovskaya Nadezhda L. - PHD, Senior Researcher, Moscow M.V. Lomonosov State University, Chemistry Department, Division of Physical Chemistry. Postal address: Chemistry Department, Moscow State University, Moscow

Kaverina Sofia S. - junior researcher, Moscow M.V. Lomonosov State University, Chemistry Department, [Division of Physical Chemistry](#). Postal address: Chemistry Department, Moscow State University, Moscow

Kavalerskaya Natalia E. - post-graduate student, Moscow M.V. Lomonosov State University, Chemistry Department, [Division of Physical Chemistry](#). Postal address: Chemistry Department, Moscow State University, Moscow

УДК 543.38: 543.9

Определение сульфаметазина с помощью пьезокварцевого иммуноаффинного сенсора, усиленного наночастицами золота

Мелихова Е.В., Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 8.06.2010

Аннотация

Изучена гетерогенная иммунохимическая реакция сульфаметазин - антитело, протекающая на поверхности электрода пьезокварцевого иммуносенсора для проточно-инжекционного определения сульфаметазина. Рассмотрена возможность усиления аналитического сигнала (Δf) иммуносенсора с помощью наночастиц золота различного диаметра. Показано, что использование частиц, диаметром 5 нм, приводит к увеличению Δf более чем в 4 раза, снижению предела обнаружения сульфаметазина с 1,9 до 0,6 мкг/мл. Иммуноаффинный сенсор апробирован при определении сульфаметазина в пищевых продуктах.

Ключевые слова: иммуносенсор, сульфаметазин

Heterogenetic reaction of Sulfamethazine – antibody, proceeding on an electrode surface of quartz crystal piezosensor for flow injection definition of Sulfamethazine is studied. Possibility of strengthening of an analytical immunosensor signal (Δf) with the help gold nanoparticle of various diameter is considered. Shown, that use of particles, diameter 5 nanometers, leads to increase in an analytical signal more than in 4 times, to decrease in a limit of detection of Sulfamethazine with 1,9 to 0,6 mkg/ml. The immunosensor is approved at definition of Sulfamethazine in foods.

Keywords: immunosensor, Sulfamethazine

Введение

Пьезокварцевые гравиметрические иммуносенсоры (ПКИ) находят применение для определения физиологически активных веществ в объектах

окружающей среды и биологических жидкостях на уровне мкг/мл и даже нг/мл. Чувствительность детектирования и предел обнаружения аналитов могут быть улучшены за счет использования наночастиц различной природы (латексы, серебряные и золотые наночастицы), образующих достаточно прочные связи с белковыми молекулами [1 - 3].

В литературе имеются сведения о применении наночастиц золота (AuNP) для усиления сигнала пьезокварцевого сенсора, предназначенного для определения высокомолекулярных соединений в прямом формате иммуноанализа [4, 5]. Однако, практически не изучено использование наночастиц в конкурентном формате для определения низкомолекулярных соединений. Основной проблемой для развития и расширения возможностей пьезокварцевых иммуносенсоров, усиленных наночастицами золота, является отсутствие унифицированных, хорошо воспроизводимых и простых методик получения и стабилизации коллоидных частиц фиксированного размера.

Особенности применения пьезокварцевого иммуносенсора с усилением сигнала для определения низкомолекулярных соединений рассмотрены на примере детектирования сульфаметазина, остаточные количества которого могут присутствовать в животноводческой продукции, вследствие использования его в ветеринарной практике. Поэтому актуальной является проблема определения следовых концентраций фармацевтического препарата в пищевых продуктах.

Эксперимент

В работе использовались следующие химические реагенты: γ -аминопропилтриэтоксисилан (APTS), глутаровый альдегид (GA) ("Reanal", Hungary), сульфаметазин ("Sigma", USA), хлорид, гидрофосфат и азид натрия; хлорид и дигидрофосфат калия; соляная кислота ("Реахим", "Лабтех", Россия).

Биореагенты: сульфаниламид (SA), конъюгированный с белковыми молекулами – SA-C3-OVA, SA-C3-STI (яичный альбумин - OVA и соевый трипсиновый ингибитор - STI); кроличьи антисыворотки, содержащие поликлональные антитела к сульфаниламиду – Anti-Sulfonamide Lot 4/4 (для STI) и Anti-Sulfonamide Lot 2/3 (для OVA) с концентрацией 1 мг/мл. Растворы химических реагентов [6] готовили на основе бидистиллированной воды, а 0,1 % растворы конъюгатов – на основе фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7,2) с добавлением азида натрия.

В качестве физического преобразователя использовали пьезокварцевые резонаторы АТ-среза (10 МГц \pm 1 Гц) с золотыми электродами (ЗАО «ЭТНА», Россия). Биорецепторное покрытие получали методом молекулярного наслаивания по описанной ранее схеме [7].

Исследования выполнялись на установке для проточно-инжекционного анализа [7]: сенсор контактировал только одной стороной с жидкостью. Для построения градуировочного графика применялись растворы, полученные разбавлением фосфатным буферным раствором раствора сульфаметазина с концентрацией 1 мг/мл.

Золотые наночастицы получали восстановлением HAuCl_4 :

Способ 1. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 10 мл 8% раствор цитрата натрия и нагревали до изменения окраски.

Способ 2. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 10 мл 0,01% раствор солянокислого гидросиламина и нагревали до изменения окраски.

Способ 3. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 2 мл 10 % раствор аскорбиновой кислоты и нагревали до изменения окраски.

Способ 4. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 10 мл 10% раствор гидразина и нагревали до изменения окраски.

Способ 5. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 20 мл 10 % раствор гидразина, затем прибавляли додецилсульфат натрия (10 мг/мл) и нагревали до изменения окраски.

Способ 6. К 1 мл 0,003%-ной HAuCl_4 добавляли 2 мл 1 % раствор хлорида олова и нагревали до изменения окраски.

Способ 7. К 1 мл 0,01%-ной HAuCl_4 добавляли 2 мл 1 % раствор хлорида олова и нагревали до изменения окраски.

Способ 8. К 1 мл цитратного буфера (рН 6,18) добавляли 1 мл 0,01 % раствора HAuCl_4 , 100 мкл раствора хлорида олова (II) и нагревали 30 мин при температуре 60°C при постоянном помешивании.

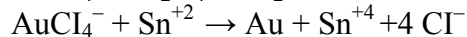
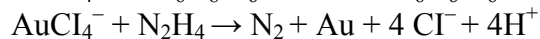
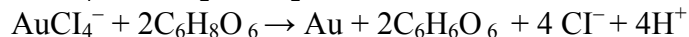
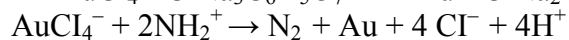
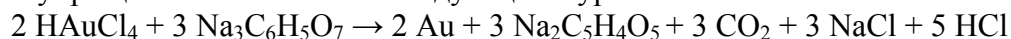
Способ 9. К 1 мл цитратного буфера (рН 4,24) добавляли 1 мл 0,01 % раствора HAuCl_4 , 100 мкл раствора хлорида олова (II) и нагревали 30 мин при температуре 60°C при постоянном помешивании.

Способ 10. К 1 мл цитратного буфера (рН 4,24) добавляли 100 мкл раствора хлорида олова (II), 1 мл 0,01 % раствора HAuCl_4 , перемешивали в течение 30 мин при температуре 60°C.

В качестве стабилизаторов частиц коллоидного золота применяли додецилсульфат натрия и полиэтиленгликоль-3000 (ПЭГ-3000).

Результаты и обсуждение

Исследование закономерностей синтеза золотых наночастиц. Размер (d_{cp}) и агрегативная устойчивость наночастиц золота в значительной степени зависят от природы и концентрации восстановителя ($C_{восст}$), золотохлороводородной кислоты (CHAuCl_4), последовательности внесения реагентов, рН среды, температуры ($t, ^\circ\text{C}$) и длительности нагревания (τ_n), присутствия в системе стабилизаторов. Максимальное влияние оказывают природа и концентрация восстановителя. Согласно литературным данным [4], процессы восстановления золотохлороводородной кислоты упрощенно описываются следующими уравнениями:



Для оценки размера и агрегативной устойчивости ($\tau_{уст}$) золотых наночастиц использовали методы абсорбционной спектрофотометрии в видимой области спектра и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [8].

Восстановление золотохлороводородной кислоты протекает через ряд стадий: получение высокопересыщенного раствора золота, нуклеации и формирования двойного электрического слоя на поверхности мицеллы. Природа восстановителя в значительной степени определяет скорости образования и роста наночастиц золота, а также влияет на формирование двойного электрического слоя, определяющего устойчивость коллоидных систем. Применение на стадии синтеза AuNP поверхностно-активных веществ обеспечивает существенное повышение

стабильности наночастиц золота, особенно в случае использования раствора ПЭГ-3000 (табл. 1).

Таблица 1. Влияние pH раствора, порядка внесения реагентов, температуры на стабилизацию AuNP (λ_{\max} - длина волны соответствующая максимуму светопоглощения).

Способ синтеза	λ_{\max} , нм	t, °C	$\tau_{\text{н}}$, мин	pH	$\text{C}_{\text{HAuCl}_4} \cdot 10^6$, моль/л	$\text{C}_{\text{восст.}} \cdot 10^3$, моль/л	$d_{\text{ср}}$, нм	$\tau_{\text{уст.}}$, ч.
Способ 5	580	40	5	3,3	7,7	30	70-80	72
Способ 8	540	60	30	6,1	1,8	1,2	50	360
Способ 9	530	60	30	4,2	1,8	1,2	30	480
Способ 10	505	60	30	4,2	1,8	1,2	5	456

При применении гидразина (способ 5) скорость роста AuNP превышает скорость образования зародышей и, как следствие, происходит образование крупных частиц диаметром 70 – 80 нм. Применение на стадии синтеза додецилсульфата натрия (10 мг/мл) не предотвращает коагуляции наночастиц золота, при этом агрегативная устойчивость системы не превышает 3-х суток.

Последовательность введения в систему восстановителя и HAuCl_4 влияет на скорость и полноту протекания процессов нуклеации и роста частиц. В случае последовательного добавления HAuCl_4 к восстановителю скорость образования зародышей превалирует над скоростью их роста, что способствует формированию частиц диаметром 5 нм. При изменении последовательности введения реагентов наблюдается укрупнение частиц до 30 нм, что может быть объяснено возникновением небольшого числа зародышей и более продолжительной стадией роста частиц. На соотношение скоростей также влияет pH среды. Снижение устойчивости коллоидной системы и получение более крупных частиц золота отмечается при pH 6,1. Вероятность образования частиц относительно малого размера увеличивается при уменьшении pH до 4,2.

Для усиления аналитического сигнала ПКИ при проточно-инжекционном определении сульфаметазина в жидких средах применены наиболее стабильные AuNP со средним диаметром 5 нм.

Исследование условий иммобилизации. Для определения сульфаметазина в жидких средах на поверхности электрода пьезокварцевого иммуносенсора формировали подложку на основе γ -аминопропилтриэтоксисилана, на которой ковалентно с помощью глутарового альдегида закрепляли сульфаниламид-белковый конъюгат [6]. Качество полученного покрытия оценивали методами пьезокварцевого микровзвешивания и атомной силовой микроскопии (рис. 1), регистрируя массу, толщину (Δm , Δh) и шероховатость сформированных слоев (R_a) соответственно.

Применение модификатора на основе γ -аминопропилтриэтоксисилана способствует выравниванию поверхности и прочному равномерному закреплению последующих молекулярных слоев, что подтверждается значениями Δm и Δh , а также снижением величины шероховатости до $R_a=21,3$ нм по сравнению с чистой поверхностью золотого электрода сенсора ($R_a=56,0$ нм). При активации глутаровым альдегидом, наблюдалось возрастание шероховатости ($R=36,6$ нм) и появление выпуклых структурных образований, способствующих увеличению общей площади поверхности и повышению числа доступных активных центров. Последующее закрепление конъюгатов на выступающих структурах приводит к сглаживанию и уменьшению шероховатости поверхности сенсора. Сопоставление полученных

данных с величинами аналитических сигналов при определении антител к сульфаметазину, свидетельствует о формировании плотного покрытия с высокой упорядоченностью и конформационной доступностью функциональных групп.

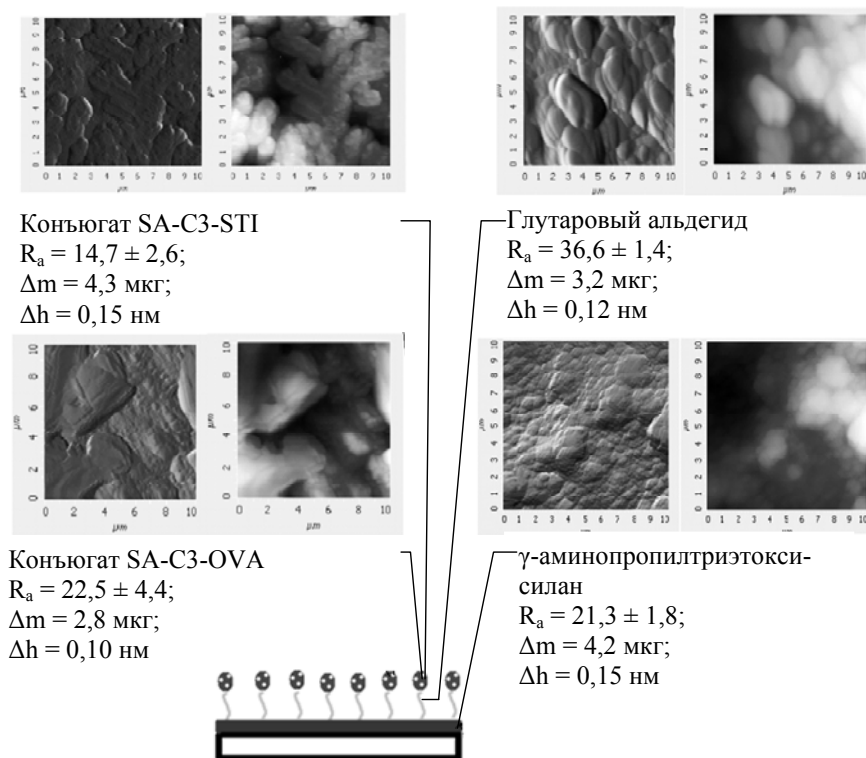


Рис. 1. Послойная характеристика поверхности покрытия пьезокварцевого сенсора для определения сульфаметазина, полученная методом АСМ

Разработка методики проточно-инжекционного определения сульфаметазина с помощью пьезокварцевого иммуносенсора. Сопоставлены результаты определения сульфаметазина с применением пьезокварцевых иммуносенсоров в конкурентном формате анализа (способ 1) и конкурентном формате с применением наночастиц золота, диаметром 5 - 80 нм (способ 2). При проведении анализа способом 1 к пробе, содержащей сульфаметазин добавляли раствор антител, которые взаимодействовали с сульфосоединением в растворе и сульфаметазин-белковым конъюгатом на поверхности электрода сенсора. Рабочая концентрация антител – 100 мкг/мл была экспериментально [7] ранее установлена.

При проведении анализа способом 2 в пробу одновременно с раствором антител вводили раствор коллоидного золота, при этом на поверхности сенсора формировался тройной комплекс сульфаметазин-антитело-AuNP с более высокой массой, что вызывало увеличение аналитического сигнала сенсора. Метрологические характеристики методики определения сульфаметазина с помощью пьезокварцевого иммуносенсора способом 1 и 2 представлены в табл. 2.

Установлено трехкратное снижение предела обнаружения сульфаметазина при применении пьезокварцевого иммуносенсора на основе конъюгата SA-C3-OVA, усиленного наночастицами золота ($d = 5$ нм), аналитический сигнал при этом возрастает более чем в 4 раза. Число циклов измерений на одном биопокрытии – 13 ± 2 .

Таблица 2. Метрологические характеристики методик определения сульфаметазина (n = 3; P=0,95)

Иммунореагенты Метрологические характеристики	Конъюгат SA-C3-OVA и антитела For 3-OVA Lot 2/3		Конъюгат SA-C3-STI и антитела Anti-Sulfonamide Lot 4/4 (For 3-STI)	
	Способ 1	Способ 2 AuNP 5 нм	Способ 1	Способ 2 AuNP 5 нм
Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	10-100	5-120	10-100	5-120
Уравнение градуировочного графика	$y=-0,7x+73$	$y=-2,43x+295$	$y=-0,4x+46$	$y=-1,58x+192$
r	0,997	0,998	0,999	0,995
Предел обнаружения, мкг/ мл	2,2	0,6	2,6	0,9
s, Гц·мл/мкг	0,6	2,4	0,4	1,6

Правильность разработанных способов проточно-инжекционного определения сульфаметазина с применением пьезокварцевого иммуносенсора, усиленного наночастицами золота, оценивали методом введено-найдено. Обработка полученных результатов с использованием теста Стьюдента не выявила систематической погрешности. Разработанный способ проточно-инжекционного анализа апробирован при определении сульфаметазина в молоке «Краснинское» и куриных яйцах «Липецкптица». Присутствие сульфаметазина в образце молока «Краснинское» не выявлено. Концентрация сульфаметазина в яйце «Липецкптица», установленная методом добавок, в 6 раз превышает показатели, введенные для стран Европейского союза (0,1 мкг/мл).

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

Список литературы

1. Chu X. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex [Text] / X. Chu Sensors and Actuators -2006.- V. 114 P.696–704.
2. Kim N. Highly Sensitive Biomolecule Detection on a Quartz Crystal Microbalance Using Gold Nanoparticles as Signal Amplification Probes [Текст]/ N. Kim//Analytical sciences -2007.-V.23.
3. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С. Ю. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение [Text]/ Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С. Ю Щеголев – М.: Наука, 2008. – 319 с.
4. Шашканова О.Ю. Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора. 1. Изучение условий синтеза золотых наночастиц различного размера в присутствии

поверхностно-активных веществ / О.Ю. Шашканова, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 5. – С. 677 – 684.

5. Шашканова О.Ю. Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора. 2. Исследование сорбции тиосоединений на золотых наночастицах и образования конъюгатов с анти-ДНК / О.Ю. Шашканова, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 5 – С.685 – 693.

6. Мелихова Е.В. Оценка методов иммобилизации иммунореагентов на поверхности пьезокварцевых сенсоров для определения сульфопрепаратов в жидких средах [Текст] / Е.В. Мелихова, Е.Н. Калмыкова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – № 1. – С. 351 – 364.

7. Мелихова Е.В. Применение проточного пьезокварцевого иммуносенсора для определения сульфаметоксазола в объектах окружающей среды / Е.В. Мелихова, Е.Н. Калмыкова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева [Текст] // Журнал аналитической химии. 2006. – Т.6. №.5. – С.737 – 741.

8. Shipway A. N. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications [Text] / A. N. Shipway, E. Katz, and I. Willner *Chemphyschem* – 2000. – V. 1. P. 18-52.

Мелихова Елена Владимировна - к.х.н., доц. кафедры химии, Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк

Шашканова Ольга Юрьевна – аспирант кафедры химии Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна – д.х.н., профессор Липецкого государственного технического университета, Липецк, тел. 8(0742)328155

Melihova Elena V. - PhD, Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Shashkanova Olga Yu. – Post-graduate Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – doctor of science, professor of chemistry, Lipetsk State Technical University, Lipetsk, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

УДК 541

Влияние рН на извлечение фенола в проточном растворе глауконитом ГБРТО и его фракциями

Вигдорович В.И.

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов

Цыганкова Л.Е., Акулов А.И.

Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов

Поступила в редакцию 19.10.2010 г.