

На правах рукописи



Мелихова Елена Владимировна

**ПРИМЕНЕНИЕ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ
ДЛЯ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – аналитическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Воронеж – 2006

Работа выполнена в Липецком государственном техническом университете

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ермолаева Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Шеховцова Татьяна Николаевна

доктор химических наук, доцент
Рудаков Олег Борисович

Ведущая организация: Воронежская государственная технологическая академия,
г.Воронеж.

Защита состоится « 16 » января 2006 г. в 15 ч. 00 мин. в аудитории 290 на заседании диссертационного совета Д 212.038.19 по химическим наукам при Воронежском государственном университете по адресу:

394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, химический факультет, (ауд. 290)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета

Автореферат разослан 2 декабря 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Крысин М. Ю.

2006-4
28045

2253538

3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Последнее десятилетие характеризуется интенсивным развитием сенсорных технологий, ориентированных на создание аналитических устройств, позволяющих получать информацию о свойствах и составе различных сред в форме электрического сигнала. Пьезокварцевые химические сенсоры, широко применяющиеся для диагностики газовых (реже жидких) сред, характеризуются невысокой селективностью, поскольку аналитический сигнал формируется за счет приращения массы покрытия, нанесенного на электродах, вследствие сорбции определяемого компонента.

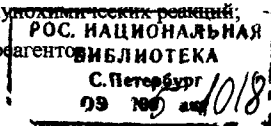
Применение в качестве рецепторных покрытий высокоспецифичных иммунореагентов позволяет проводить прямое, без введения дополнительных меток (ферментативные, флуоресцентные, радиоактивные), определение высоко- и низкомолекулярных соединений в жидких средах. Пьезокварцевые иммуносенсоры положительно зарекомендовали себя при селективном определении следовых концентраций биологически активных соединений в водных растворах, пищевых продуктах и биологических средах, и поэтому исследованию таких сенсоров в настоящее время уделяется повышенное внимание.

Широкое использование противомикробных препаратов (сульфаниламиды, салицилаты) для лечения и профилактики заболеваний людей и животных стимулирует разработку новых экспрессных, чувствительных методик их определения в различных объектах в присутствии большого количества сопутствующих соединений. Поэтому весьма перспективным является исследование возможностей иммуносенсоров, сочетающих принципы иммуноанализа с пьезокварцевым методом преобразования аналитического сигнала, как детекторов в проточно-инжекционном анализе жидких сред при определении сульфаниламидов и салицилатов.

Цель работы. Разработка высокочувствительных и селективных пьезокварцевых иммуносенсоров для проточно-инжекционного определения следовых концентраций ряда биологически активных соединений в жидких средах.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

- исследование закономерностей иммунохимической реакции антиген-антитело, протекающей на поверхности сенсоров, предназначенных для определения сульфопрепаратов и салицилатов в жидких средах;
- исследование способов иммобилизации галтен - белковых конъюгатов;
- кинетическое исследование гетерогенных иммунохимических реакций;
- оценка специфичности применяемых иммунореагентов



- изучение влияния режима проточно-инжекционного анализа на величину аналитического сигнала сенсора;
- разработка комплекса способов проточно-инжекционного определения сульфопрепаратов и салицилатов с применением пьезокварцевых иммуносенсоров.

Научная новизна. Показана возможность конкурентного определения сульфопрепаратов и салицилатов в жидких средах с применением пьезокварцевых иммуносенсоров с биорецепторными покрытиями на основе гаптен-белковых конъюгатов. Впервые методом пьезокварцевого микровзвешивания изучены закономерности гетерогенной иммунохимической реакции между сульфаметоксазол (4-аминосалициловая кислота)-белковым конъюгатом и специфичными антителами. Выявлены условия, способствующие наиболее полному протеканию реакции как в прямом, так и в обратном направлениях. Рассчитаны константы образования ($K_{св}$) гетерогенных иммунокомплексов, полученных при взаимодействии 4-аминосалициловой кислоты и сульфаметоксазола, конъюгированных с белковыми молекулами, с соответствующими поликлональными антителами. Показана взаимосвязь величины $K_{св}$ с пределом обнаружения сульфаметоксазола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора. Обоснованы требования к биорецепторным покрытиям (масса, толщина слоя, прочность закрепления иммунореагентов на металлической поверхности электродов), обеспечивающим многократное применение иммуносенсоров для определения сульфаметоксазола и салициловой кислоты в широком диапазоне концентраций. Оценена специфичность поликлональных антител по отношению к сульфопрепаратами и салицилатами, рассчитаны коэффициенты перекрестного взаимодействия. Изучено влияние режима проточно-инжекционного анализа на величину аналитического сигнала сенсора и определены оптимальные параметры (скорость потока, природа и pH раствора носителя, природа и концентрация регенерирующего раствора), обеспечивающие высокую чувствительность определения биологически активных веществ.

Практическая значимость. Предложены новые эффективные биорецепторные покрытия пьезокварцевых иммуносенсоров для определения микроколичеств сульфопрепаратов и салицилатов в жидких средах. Предложен алгоритм выполнения проточно-инжекционного анализа жидких сред, включающий регистрацию аналитического сигнала сенсора и регенерацию его биорецепторного покрытия.

Разработаны высокочувствительные и селективные методики проточно-инжекционного определения остаточных количеств сульфаметоксазола, сульфаметазина, сульфаметазина гемисульфата, белого стрептоцида и салициловой кислоты в водных рас-

творах; сульфаметоксазола в объектах окружающей среды (почва, природные воды), пищевых продуктах (мясо, яйца, молоко), фармацевтических препаратах.

Методика определения сульфаметоксазола внедрена в лабораторный практикум спецкурса «Химические и биосенсоры». По материалам разработок подана заявка (№ 2004122302/28(023824)) на предполагаемое изобретение и получено положительное решение на выдачу патента.

На защиту выносятся:

- результаты сравнительного изучения способов иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов на поверхности металлических электродов пьезокварцевых резонаторов с учетом оптимального сочетания массы и толщины покрытия, стабильности сигнала, чувствительности определения биологически активных соединений;
- результаты изучения закономерностей иммунохимических реакций сульфопрепаратов или салицилатов со специфичными антителами;
- константы скорости образования и разрушения иммунокомплексов, величины констант связывания иммунореагентов;
- коэффициенты перекрестного взаимодействия антител к сульфаметоксазолу и 4-аминосалициловой кислоте с собственными иммуногенами и их структурными аналогами;
- оптимальные значения скорости потока, pH и природы раствора носителя, концентрации и природы регенерирующего раствора, обеспечивающие максимальную величину аналитического сигнала иммуносенсора;
- алгоритм выполнения проточно-инжекционного определения сульфопрепаратов (сульфаметоксазол, сульфаметазин, сульфаметазин гемисукцинат, белый стрептоцид) и салициловой кислоты в жидких средах с применением пьезокварцевых иммуносенсоров;
- методики проточно-инжекционного определения следовых концентраций сульфаметоксазола, сульфаметазина, сульфаметазина гемисукцината, белого стрептоцида и салициловой кислоты в водных растворах; сульфаметоксазола в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и фармацевтических препаратах.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Актуальные проблемы современного естествознания» (Иваново, 2003); XII научно – практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Наша общая окружающая среда» (Липецк, 2003); XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003); V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием «Экоаналитика – 2003»

(Санкт – Петербург, 2003); I Региональной научной конференции «Химико–экологические проблемы Центрального региона России» (Орел, 2003); Всероссийской конференции по аналитической химии «Аналитика России» (Москва, 2004), XIV Областной научно-технической конференции (Липецк, 2005), II Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2005), III Международной конференции «Экстракция органических соединений» (Воронеж, 2005).

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 3 статьях, 10 тезисах докладов.

Структура работы. Диссертационная работа изложена 125 страницах машинописного текста, включает 21 рисунок и 15 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 256 ссылок на отечественные и зарубежные работы.

Работа выполнялась при финансовой поддержке программ Минобрнауки РФ: «Развитие научного потенциала высшей школы» (*тема № 01970006723 «Пьезокварцевые проточные иммуносенсоры: новые возможности для определения физиологически активных веществ»*), темплана (тема «Физико-химические основы формирования и функционирования биосенсорных систем для определения физиологически активных веществ») и гранта для поддержки научно – исследовательской работы аспирантов вузов (*тема А04-2.11-935 «Исследование условий формирования аналитического сигнала проточного пьезокварцевого иммуносенсора при определении сульфопрепаратов в жидких средах»*).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Систематизированы литературные данные об особенностях применения пьезокварцевых иммуносенсоров для определения следовых концентраций биологически активных соединений в жидких средах методом проточно-инжекционного анализа. Проведен сравнительный анализ детекторов, применяемых в проточно-инжекционном анализе. Показана перспективность применения пьезокварцевых иммуносенсоров в качестве детекторов.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИММУНОРЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА. Объекты исследования – салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота (“х.ч.”, Россия), 4-аминосалициловая кислота, сульфаметоксазол, сульфаметазин, сульфаметазин гемисукцинат, белый стрептоцид (“Sigma”, USA).

Иммунореагенты: гаптен-белковые конъюгаты – 4-аминосалициловая кислота, конъюгированная с белковыми молекулами (бычий (КІ), яичный (КІІ) альбумины и соевый

трипсиновый ингибитор (KIII); сульфаметоксазол, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином через диазокислоту (KIV), глутаровый альдегид (KV) и гемисукцинат (KVI); поликлональные антитела к 4-аминосалициловой кислоте (R1) и к сульфаметоксазолу (R2, R3, R4). Иммунореагенты были предоставлены д.х.н. С.А. Ереминым (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) и проф. Ф. Ровелом (F. Rowell) (Школа медицины и фармации университета г. Сандерленд, Великобритания).

Для иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов использовали γ -аминопропилтриэтоксисилан ("Reanal", Hungary), тетраэтоксисилан («х.ч.», Россия), конконавалин А и тиоктовую кислоту ("Sigma", USA). В качестве бифункциональных реагентов применяли глутаровый альдегид ("Reanal", Hungary), 1 – этил – 3 – (3 – диметиламинопропил)карбодиимид, N,N' – дициклогексилкарбодиимид, N – гидроксисукцинимид ("Sigma", USA).

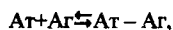
Буферные растворы – носители (pH 6,0 – 8,5): NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 ; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ – Na_2HPO_4 ; NaOH – KH_2PO_4 .

Регенерирующие растворы: $(4 \cdot 10^{-4} - 3)$ М растворы тиоционата калия, 8 М раствор тиомочевины; 0,1 М раствор и концентрированная соляная кислота ($\rho = 1,198 \text{ г/см}^3$).

В качестве физических преобразователей применялись серийно выпускаемые пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с золотыми или серебряными электродами (диаметр 8 мм), собственной частотой колебаний $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$ (ОАО "Квант", ЗАО "ЭТНА", Россия).

Исследования проводили на оригинальной установке для проточно-инжекционного анализа, включающей дозатор для ввода пробы, проточную ячейку детектирования (объем 15-20 мкл), в которой пьезокварцевый иммуносенсор контактировал только одной стороной с раствором, перистальтический насос, схему возбуждения пьезокварцевого сенсора, частотомер и персональный компьютер.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ. Работа пьезокварцевого иммуносенсора базируется на обратимой иммунохимической реакции между антителами, находящимися в растворе, и конъюгированными с белковыми молекулами низкомолекулярными соединениями, иммобилизованными на поверхности электродов:



где At – антитело; Ag – антиген (гаптен-белковый конъюгат); Ag – At – иммунокомплекс.

Аналитический сигнал сенсора (Δf) регистрируется при протекании прямой реакции гаптен-белковых конъюгатов с поликлональными антителами. После регистрации Δf осуществляется разрушение поверхностного иммунокомплекса, что позволяет многократно использовать иммуносенсор в проточно-инжекционном анализе. Поэтому при изучении зако-

номерностей гетерогенных иммунохимических реакций были выявлены условия, способствующие наиболее полному протеканию как прямой, так и обратной реакций, а также установлены параметры, позволяющие проводить проточно-инжекционное определение биологически активных соединений с высокой чувствительностью и селективностью. Так как анализ проводился в потоке, то для обеспечения хорошей воспроизводимости результатов важным являлся выбор способа иммобилизации белковых молекул на поверхности электрода физического преобразователя.

Влияние способа иммобилизации на качество биорецепторного покрытия и оперативные характеристики иммуносенсора. К способам иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов предъявлялись следующие требования: удобство включения в состав биосенсора, стабилизация трехмерной структуры и активности, вариация специфичности связывания лигандов, многократное использование иммунореагентов.

Изучены следующие способы иммобилизации (табл. 1):

- непосредственное закрепление гаптен-белковых конъюгатов на металлической поверхности электрода пьезокварцевого иммуносенсора (1);
- сорбция биомолекул на подложке из конконавалина А (2), а также кросс-пришивка к ней с помощью 1 – этил – 3 – (3 – диметиламинопропил)карбодиимида (3), глутарового альдегида (4), N,N' – дициклогексилкарбодиимида (5);
- ковалентная иммобилизация с помощью глутарового альдегида на подложках, сформированных методом самособирающихся монослоев на основе тетраэтоксисилана (6); γ -аминопропилтриэтоксисилана (7); а также с помощью 1 – этил – 3 – (3 – диметиламинопропил)карбодиимида (8) и N - гидроксисукцинимид (9) на монослоях тиоковой кислоты.

Качество полученного биорецепторного слоя оценивали по следующим параметрам (табл. 1): массе биорецепторного покрытия ($\Delta m_{пл}$, мкг), толщине покрытия (Δh , нм), прочности связывания биомолекул с подложкой или металлической поверхностью электродов сенсора (Δm^*); концентрационной чувствительности (A , Гц·мл·мкг⁻¹) определения антител к сульфаметоксазолу R3 ($c_{At} = 0,4$ мкг/мл); удельной чувствительности (S , Гц·мл·мкг⁻²), равной $A/\Delta m_{пл}$; пределу обнаружения (PrO) и стабильности покрытия (число циклов измерений (N) на данном биослое).

Наиболее перспективны методы иммобилизации, связанные с получением самособирающихся монослоев с регулируемой микроархитектурой поверхности (7, 8). Последовательное нанесение слоев на носитель способствует регулярному послойному заполнению поверхности за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Достоинством таких наноструктурированных покрытий является снижение уровня неспецифической сорбции, по-

вышение чувствительности определения различных аналитов, а также гидролитической устойчивости, что позволяет осуществлять свыше 20 (Ag – электрод) или 35 (Au – электрод) определений на одной пленке как сульфопрепаратов, так и салицилатов.

Таблица 1. Характеристики покрытий пьезокварцевых иммуносенсоров ($n = 3$; $P=0,95$)

Номер способа	Электрод	$\Delta m_{\text{пл}}, \text{мкг}$	$\Delta n_{\text{пл}}, \text{нм}$	$\Delta m^*, \text{мкг}$	$\Delta f, \text{Гц}$	$A, \text{ГЦ} \cdot \text{мл} \cdot \text{мкг}^{-1}$	$S, \text{ГЦ} \cdot \text{мл} \cdot \text{мкг}^{-2}$	N
1	Au	11,4	0,40	0,5	9 ± 3	22,5	1,98	3
2	Au	11,8	0,41	5,9	6 ± 1	15,0	1,27	5
3	Au	3,4	0,12	2,5	10 ± 2	25,0	7,44	3
4	Au	8,6	0,30	4,0	13 ± 1	31,0	3,65	6
5	Ag	22,7	0,79	6,9	44 ± 15	110	4,85	10
	Au	12,4	0,43	3,5	36 ± 13	90,0	7,25	16
6	Ag	30,4	1,06	10,3	62 ± 5	160	5,09	12
7	Ag	20,2	0,71	10,5	87 ± 4	220	10,77	21
		11,9	0,42	6,0	65 ± 3	160	13,62	18
	Au	6,5	0,23	0,5	110 ± 5	275	42,24	36
8	Ag	31,9	1,12	19,9	110 ± 13	280	8,62	12
	Au	4,7	0,17	3,9	19 ± 4	48,0	10,06	9
9	Ag	15,9	0,56	12,2	12 ± 2	30,0	1,88	3
	Au	7,5	0,26	4,3	-	-	-	-

На покрытиях, полученных на основе γ -аминопропилтриэтоксисилана (7) и тиоктовой кислоты (8) с последующее закрепление сульфаметоксазол(4-аминосалициловая кислота)-белковых конъюгатов с помощью глутарового альдегида или 1'-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида, наблюдается оптимальное сочетание чувствительности, стабильности, воспроизводимости сигнала сенсора (рис. 1).

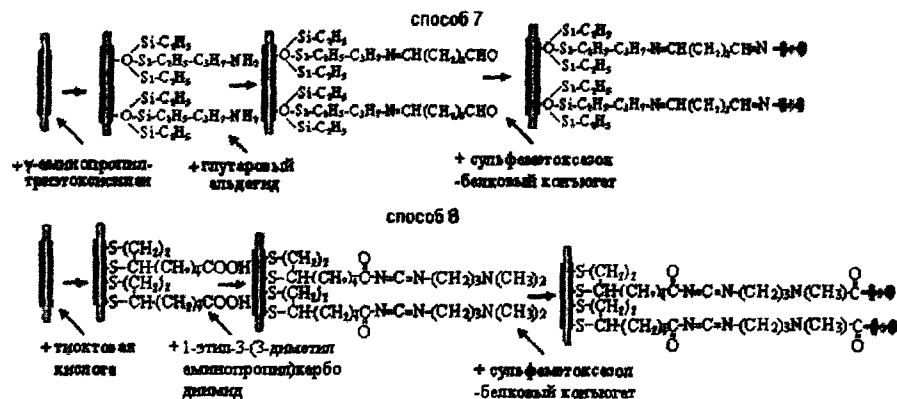


Рис. 1. Схемы иммобилизации гаптен-белкового конъюгата на поверхности металлических электродов сенсоров.

Такой механизм иммобилизации позволяет сформировать на поверхности электрода биосенсора пространственно доступные активные центры, обеспечивающие высокую прочность связывания определяемого соединения с антителами без срывов частоты колебаний пьезокварцевого иммуносенсора. Качество биорецепторного покрытия также зависит от концентрации иммобилизуемого конъюгата. Наибольший аналитический сигнал сенсора отмечается при применении конъюгатов с концентрацией 0,5 мкг/мл, обеспечивающей высокую концентрацию стерически доступных активных центров на поверхности биослоя.

В последующих исследованиях применяли иммуносенсоры с биорецепторными покрытиями, полученными по методике (7) массой не более 20 – 25 мкг: увеличение массы слоя свыше 35 – 45 мкг приводит к срыву частоты колебаний сенсора, а уменьшение до 10 – 15 мкг существенно сужает диапазон определяемых концентраций и сокращает число возможных циклов измерений. Иммуносенсоры могут сохраняться во влажной камере при + 4°С без снижения чувствительности свыше 3 месяцев.

Кинетические исследования. Величина аналитического сигнала сенсора во многом определяется степенью связывания антител с определяемым соединением. Аффинность взаимодействия иммунореагентов оценена по величинам констант связывания ($K_{св}$), установленных на основе кинетических измерений.

Уравнение скорости обратимой иммунохимической реакции, выраженное через частотные характеристики с учетом уравнения Зауэрбрея ($\Delta f = k \cdot \Delta m$, где k – коэффициент пропорциональности), имеет следующий вид: $-\frac{df}{dt} = (k_0c + k_p)f - k_0cf_m$, где c – концентрация антител в анализируемом растворе, а f_m и f – частоты колебаний сенсора до начала измерений и при образовании поверхностного иммунокомплекса соответственно.

Скорость взаимодействия иммобилизованных гаптен-белковых конъюгатов со специфичными антителами устанавливали методом начальных скоростей по тангенсу угла наклона на прямолинейном участке кинетической кривой (рис. 2а).

Графически, с учетом линейного характера зависимости скорости иммунохимической реакции ($-\frac{df}{dt}$) от частоты колебаний сенсора f , по отрезку, отсекаемому на оси ординат, и значению углового коэффициента (рис. 2б) рассчитывали константы скорости образования (k_0), разрушения (k_p) иммунокомплекса и константу связывания $K_{св}$ как отношение k_0 и k_p (табл. 2).

При разработке пьезокварцевых иммуносенсоров применяли комплементарные пары с наибольшими значениями констант связывания: для определения сульфопрепаратов – KIV и R3 ($K_{св} = 148 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$); для определения салицилатов – KII и R1 ($K_{св} = 501 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Установлена взаимосвязь между пределом обнаружения сульфопрепаратов и величиной $K_{св}$, на-

пример, для определения 0,2 нг/мл сульфопрепаратов должны применяться комплементарные пары с $K_{св}$ $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ и выше.

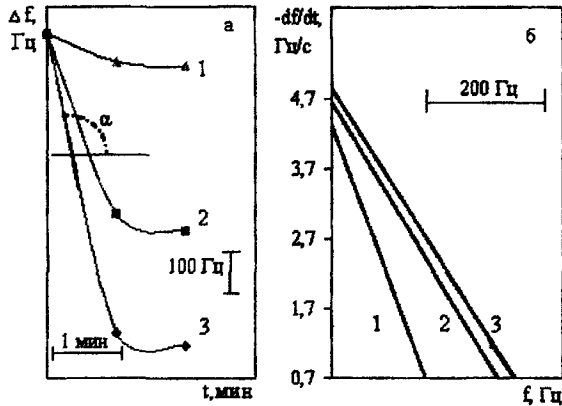


Рис. 2. Определение констант связывания конъюгатов 4-аминосалициловой кислоты (КИ) с антителами R1, концентрацией, нг/мл: 20 (1), 50 (2), 100 (3).

Таблица 2. Константы связывания ($K_{св}$) $\times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$

Антитела	Конъюгат	$K_{св}$	Антитела	Конъюгат	$K_{св}$
R1	4-Аминосалициловая кислота		R3	Сульфаметоксазол	
	КИ	14,7		KIV	148,0
	КП	24,8		KV	0,9
	КПН	501,0		KVI	0,6
R2	Сульфаметоксазол		R4	Сульфаметоксазол	
	KIV	3,9		KIV	3,7
	KV	0,4		KV	0,1
	KVI	0,1		KVI	0,5

Исследование специфичности иммунореагентов. Поскольку поликлональные антитела обладают сродством не только к детерминантам собственного иммуногена, но и к детерминантам его структурных аналогов, проведены перекрестные иммунохимические реакции антител к сульфаметоксазолу (R2, R3, R4) с родственными соединениями: сульфаметазинном, сульфаметазинном гемисукцинатом, стрептоцидом; антител к 4-аминосалициловой кислоте (R1) с салициловой и ацетилсалициловой кислотами. Рассчитаны коэффициенты перекрестного взаимодействия сульфопрепаратов и салицилатов $CR, \%$ [$CR, \% = IC_{50}(B) \cdot 100 / IC_{50}(A)$, где IC_{50} – концентрация, соответствующая 50 % – ому ингибированию связывания сульфаметоксазола или 4-аминосалициловой кислоты (A) и его аналога (B)].

Антитела к сульфаметоксазолу (рис. 3, а) проявляют максимальное сродство к собственному иммуногену ($CR, \% = 100\%$), следовательно, сульфаметоксазол можно определять в присутствии структурных аналогов с применением всех антител, кроме антител R4, прояв-

ляющих высокое сродство к сульфаметазину гемисукцинату ($CR = 91\%$). Это объясняется использованием гемисукцината в качестве трейсера для получения гаптен-белкового конъюгата, на которые затем вырабатывались антитела R4. В тоже время, все исследованные антитела могут применяться для определения сульфаметазина гемисукцината, сульфаметазина и белого стрептоцида в отсутствии сульфаметоксазола.

Антитела к 4 - аминосалициловой кислоте (рис. 3, в) проявляют наибольшую активность не к собственному иммуногену – 4-аминосалициловой кислоте, а с салициловой кислоте ($CR = 170\%$), что, вероятно, связано с большей доступностью активных центров у незамещенной салициловой кислоты.

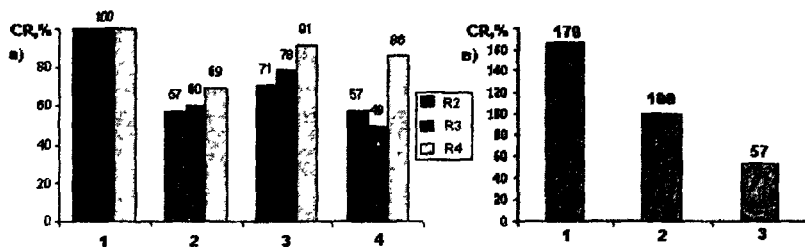


Рис. 3. Коэффициенты перекрестных взаимодействий а): антител R2, R3, R4 с сульфаметоксазолом (1), сульфаметазин (2), сульфаметазин гемисукцинатом (3), стрептоцидом (4); в): антител R1 с салициловой кислотой (1), 4-аминосалициловой кислотой (2), ацетилсалициловой кислотой (3).

Изучение влияния условий проточно-инжекционного анализа на величину аналитического сигнала сенсора. Поскольку лимитирующей стадией гетерогенной иммунохимической реакции является массоперенос реагирующих веществ в реакционную зону, изучено влияние скорости потока, природы и pH раствора носителя на величину аналитического сигнала, а также оптимизирован режим регенерации, позволяющий проводить многократные измерения на одном биорецепторном слое.

Максимальное и стабильное значение аналитического сигнала иммуносенсора наблюдалось при пропускании через ячейку детектирования со скоростью 60 мкл/мин (рис. 4) буферного раствора на основе $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,1). Увеличение или снижение скорости потока раствора носителя сопровождалось сужением диапазона определяемых концентраций или удлинением времени анализа.

При использовании других изученных буферных систем [$\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{NaOH} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ с pH 6,0 – 8,5] наблюдается или меньшее значение Δf , или непостоянное значение базового сигнала, что снижает воспроизводимость результатов определения и точность измерения аналитического сигнала.

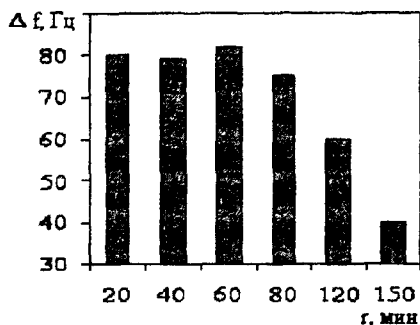


Рис. 4. Зависимость аналитического сигнала сенсора от скорости потока раствора-носителя (t) при взаимодействии сульфаметоксазол-белкового конъюгата со специфичными антителами ($c = 40$ нг/мл).

Для возобновления числа активных центров покрытия после регистрации аналитического сигнала осуществляли разрушение поверхностного иммунокомплекса с помощью регенерирующего раствора. Экспериментально установлено, что применение в качестве регенерирующего $0,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора KSCN обеспечивает достаточно быстрое разрушение иммунокомплекса и восстановление исходной частоты сенсора, не вызывая дополнительной деструкции подложки, что позволяет использовать одно и то же покрытие свыше 30 раз.

Проведенные исследования позволили разработать алгоритм выполнения проточного инъекционного анализа:

- пропускание через ячейку детектирования буферного раствора носителя для стабилизации частоты колебания сенсора (f_m);
- ввод анализируемой пробы в поток буферного раствора-носителя, сопровождающийся резким снижением частоты колебаний сенсора вследствие образования гетерогенного иммунокомплекса антиген-антитело;
- пропускание буферного раствора для стабилизации сигнала сенсора и регистрирование f ;
- пропускание регенерирующего раствора для разрушения гетерогенного иммунокомплекса и восстановления первоначальной активности биорецепторного слоя;
- пропускание через ячейку детектирования буферного раствора до возвращения частоты колебаний сенсора к исходному значению.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.

Для определения сульфопрепаратов и салицилатов в жидких средах с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров применяли конкурентный вид анализа. Фиксированную концентрацию специфичных антител вводили в пробу, которую затем пропускали через проточную ячейку детектирования, включающую пьезокварцевый иммуносенсор. Предварительно установленная концентрация специфичных антител к салициловой кислоте или к сульфаметоксазолу, необходимая для их 50%-ного связывания иммобилизованным аналитом (50 мкг/мл и 20 нг/мл соответст-

венно), обеспечивала стехиометрическое соотношение между числом поверхностных активных центров биослоя и количеством несвязавшихся в гомогенный иммунокомплекс антител. В момент образования гетерогенного иммунокомплекса регистрировали аналитический сигнал, обратно пропорциональный концентрации определяемого компонента в пробе.

Пьезокварцевые иммуносенсоры апробированы при анализе модельных растворов, содержащих сульфаметоксазол, стрептоцид, сульфаметазин, сульфаметазин гемисукцинат и салициловую кислоту (табл.3).

Таблица 3. Метрологические характеристики способов определения сульфопрепаратов и салициловой кислоты

Аналит	Гаптен-белковый конъюгат	Диапазон определяемых содержаний	ПрО	Параметры уравнения градуировочной функции
SA	К III	5,0 – 25,0 мкг/мл	0,4 мкг/мл	$y = -0,8x + 49,3$ $R^2 = 0,98$
SMX	К IV	1,0 – 220,0 нг/мл	0,2 нг/мл	$y = -1,7x + 504$ $R^2 = 0,99$
SMZ		5,0 – 100,0 нг/мл	1,4 нг/мл	$y = -1,4x + 180$ $R^2 = 0,99$
SMZ-HS		20,0 – 200,0 нг/мл	3,2 нг/мл	$y = -0,7x + 186$ $R^2 = 0,97$
SA*		5,0 – 130,0 нг/мл	3,0 нг/мл	$y = -0,6x + 210$ $R^2 = 0,97$

Правильность способов определения салициловой кислоты и сульфаметоксазола оценивали сопоставлением результатов, полученных разработанными способами, с содержанием салициловой кислоты в фармацевтическом препарате «Салициловый спирт» или с данными определения сульфаметоксазола методом высокoeffективной жидкостной хроматографии (табл. 4). Проверка результатов по критерию Стьюдента показала отсутствие систематической погрешности. Преимуществом предлагаемого способа анализа является возможность определения более низких (в 200 раз меньше по сравнению с методом ВЭЖХ) концентраций сульфопрепарата.

Разработаны методики проточно-инжекционного определения с помощью пьезокварцевого иммуносенсора остаточных концентраций сульфаметоксазола в объектах окружающей среды (табл. 5), пищевых продуктах (табл. 6), лекарственных формах (Бисептол, Ко-тримоксазол ICN). Концентрацию сульфаметоксазола в образцах определяли методами градуировочного графика или стандартных добавок. Установленное в лекарственных формах содержание сульфаметоксазола в пересчете на одну таблетку («Бисептол» – 378 ± 1 мг и «Ко-тримоксазол ICN» – 374 ± 2 мг) соответствовало паспортным данным.

Таблица 4. Проверка правильности определения сульфаметоксазола в водных растворах ($n = 3$, $P = 0,95$)

метод № пробы	ВЭЖХ		S_r	Проточно-инжекционный способ		S_r
	введено, нг/мл	найдено, нг/мл		введено, нг/мл	найдено, нг/мл	
1	200	250 ± 38	0,15	200 ^а	170 ± 23	0,14
2	500	470 ± 23	0,05	500 ^б	570 ± 63	0,11
3	1000	970 ± 19	0,02	1000 ^в	980 ± 19	0,02

Примечание: для анализа с применением пьезокварцевого иммуносенсора ^а – разбавление в 10 раз, ^б – в 50 раз, ^в – в 25 раз.

Таблица 5 Определение сульфаметоксазола в образцах почв и природных водах

Номер пробы	$S_{доб}$, нг/мл	$S_{х+доб}$, нг/мл	S_x , нг/мл	S_r
Почва (птицефабрика «Липецкая»)				
1	10,0	$24,4 \pm 2,8$	$14,4 \pm 2,8$	0,18
2	10,0	$22,3 \pm 2,9$	$12,3 \pm 2,9$	0,22
3	10,0	$17,2 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,3$	0,02
4	10,0	$16,2 \pm 1,3$	$6,2 \pm 1,3$	0,15
Природная вода г. Сандерленд (Англия)				
5	5,0	$7,3 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,5$	0,20
6	250,0	$329,0 \pm 15$	$79,0 \pm 15$	0,20
7	500,0	$644,0 \pm 14$	$144,0 \pm 14$	0,10
р. Воронеж г. Липецк (Россия)				
8	10,0	$13,6 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,6$	0,20
9	25,0	$28,5 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,7$	0,20

Таблица 6. Результаты определения сульфаметоксазола в пищевых продуктах ($P=0,95$; $n=5$)

Номер пробы	Введено сульфаметоксазола, нг/мл	Найдено сульфаметоксазола, нг/мл	Рассчитано	S_r
Молоко				
1	10,0	$10,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$ нг/мл	0,02
2	10,0	$11,5 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$ нг/мл	0,04
3	10,0	$14,8 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,9$ нг/мл	0,06
Яйца				
4	10,0	$11,6 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,4$ нг/г	0,10
5	10,0	$12,3 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,5$ нг/г	0,06
Мясо птицы				
6	10,0	$13,9 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,6$ нг/г	0,13

Образцы: молоко - 1 - «Детское», 2 – коровье (некоммерческое), 3 – женское; яйца - 4 - некоммерческое, 5 - птицефабрика «Золотой петушок» (г. Липецк); мясо - 6 - птицефабрика «Золотой петушок» (г. Липецк).

Все разработанные методики проточно-инжекционного определения сульфаметоксазола характеризуются простотой выполнения, высокой чувствительностью ($PrO = 0,15$ нг/мл) и селективностью, не требуют сложного оборудования, поэтому могут быть рекомендованы для мониторинга объектов окружающей среды, контроля качества пищевых продуктов, сульфаниламидных лекарственных препаратов и выявления их фальсификаций.

Автор благодарит к. х. н., доцента Е.Н. Калмыкову за большую помощь при проведении эксперимента, к. т. н., доцента В.Ю. Ширяева и к. т. н. М.В. Милонова за техническое содействие в создании лабораторного комплекса для проточно-инжекционного анализа, д.х.н. С. А. Еремина за предоставленные иммунореагенты и обсуждение результатов, проф. Ф. Ровела за предоставленные иммунореагенты.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально изучены и теоретически обоснованы условия протекания обратимой иммунохимической реакции на поверхности электродов пьезокварцевых сенсоров на примере взаимодействия конъюгатов сульфаметоксазола и 4-аминосалициловой кислоты с соответствующими антителами. Установлены значения $K_{св}$, позволяющие количественно оценить степень связывания сульфаниламидов и салицилатов со специфичными антителами. Показано, что при применении комплементарных пар иммунореагентов с константой связывания $10^8 - 10^9$ M^{-1} и выше возможно обнаружение сульфопрепаратов на уровне 0,2 нг/мл.
2. Обоснованы способы формирования биорецепторных покрытий пьезокварцевых иммуносенсоров на основе сульфаметоксазол (4-аминосалициловая кислота)-белковых конъюгатов. Показано, что наилучшие оперативные характеристики сенсоров достигаются при иммобилизации иммунореагентов на предварительно полученной методом самособирающихся монослоев силоксановой или тиоктовой подложке с помощью глутарового альдегида или 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид. Такие покрытия позволяют регистрировать максимально возможные значения аналитического сигнала пьезокварцевого иммуносенсора и выполнять свыше 30 измерений на одном биослое.
3. Установлены коэффициенты перекрестных взаимодействий ряда поликлональных антител с определяемыми соединениями, конъюгированными с белковыми молекулами и иммобилизованными на поверхности электрода сенсора. Осуществлен выбор комплементарных пар для селективного определения биологически активных соединений в присутствии их структурных аналогов: сульфаметоксазола в присутствии сульфаметазина, суль-

фаметазина гемисукцината, белого стрептоцида; салициловой кислоты в присутствии 4-аминосалициловой кислоты, ацетилсалициловой кислоты.

4. Обоснованы режимы проточно-инжекционного определения сульфопрепаратов и салицилатов в жидких средах с применением пьезокварцевых иммуносенсоров. Установлено, что проведение иммунохимических реакций сульфаметоксазол (4-аминосалициловая кислота) – антигеном в потоке (60 мкл/мин) буферного раствора носителя на основе NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 (рН 6,1) повышает чувствительность и стабильность работы сенсора, а использование в качестве регенерирующего реагента $0,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора тиоционата калия обеспечивает высокую воспроизводимость сигнала при многократном использовании пьезокварцевых иммуносенсоров.
5. Разработаны методики проточно-инжекционного определения сульфопрепаратов и салициловой кислоты в водных средах, сульфаметоксазола в образцах пищевых продуктов (мясо, яйца, молоко), объектах окружающей среды (почва, природные воды) и фармацевтических препаратах (Бисептол, Ко-тримоксазол), характеризующиеся достаточно широким диапазоном определяемых содержаний, высокой селективностью и низким пределом обнаружения.

Работы, опубликованные по теме диссертации:

1. Мелихова Е.В. Кинетическое исследование аффинного взаимодействия антиген-антитело методом пьезокварцевого микровзвешивания [Текст] / Е.В. Мелихова, М.В. Милонов // Актуальные проблемы современного естествознания: науч. конф. фестив. студентов, аспирантов и молодых ученых: тез. докл. – Иваново, 2003. – С. 35.
2. Мелихова Е.В. Оценка аффинности иммунохимического взаимодействия с помощью пьезогравиметрического иммуносенсора [Текст] / Е.В. Мелихова // Наша общая окружающая среда: науч.-практич. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов Липецкой области: тез. докл. – Липецк, 2003. – С. 67.
3. Ермолаева Т.Н. Перспективы использования пьезокварцевых сенсоров для иммунохимического анализа [Текст] / Т.Н. Ермолаева, Е.Н. Калмыкова, Е.С. Дергунова, Е.В. Мелихова, С.А. Еремин // XIV Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тез. докл. – Казань, 2003. – С. 17.
4. Калмыкова Е.Н. Определение сульфаниламидов в водных средах с применением иммуносенсоров [Текст] / Е.Н. Калмыкова, Е.В. Мелихова, Т.Н. Ермолаева // Экоаналитика-2003: V Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды: тез. докл. – СПб., 2003. – С.217.

5. Калмыкова Е.Н. Определение сульфаметоксазола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора [Текст] / Е.Н. Калмыкова, Е.В. Мелихова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. – № 1. – С. 8-13.
6. Калмыкова Е.Н. Применение пьезокварцевых иммуносенсоров для определения остаточного количества сульфаниламидов в молоке [Текст] / Е.Н. Калмыкова, Е.В. Мелихова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Химико-экологические проблемы центрального региона России: I Регион. науч. конф.: тез. докл. – Орел, 2003. – С. 81 – 84.
7. Калмыкова Е.Н. Кинетические исследования аффинного взаимодействия и их применение при разработке пьезокварцевых иммуносенсоров [Текст] / Е.Н. Калмыкова, Е.В. Мелихова, Е.С. Дергунова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – № 5. – С. 597 – 602.
8. Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевый иммуносенсор для проточного определения сульфопрепаратов в жидкостях [Текст] / Е.Н. Калмыкова, М.В. Милонов, Е.В. Мелихова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Сенсор. – 2005. – № 2. – С. 14 – 20.
9. Калмыкова Е.Н. Проточный пьезокварцевый иммуносенсор для определения фармацевтических препаратов в лекарственных формах и молоке [Текст] / Е.Н. Калмыкова, Е.В. Мелихова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Аналитика России: Всероссийская конф. по аналит. химии: тез. докл. – М., 2004. – С. 86 – 87.
10. Наквасина Е.В. Изучение условий формирования аналитического сигнала пьезокварцевого иммуносенсора при проточно-инжекционном определении сульфаметоксазола [Текст] / Е.В. Наквасина, Е.В. Мелихова // Повышение эффективности металлургического производства: XIV Областная науч.-техн. конф.: тез. докл. – Липецк, 2005. – С. 8 – 9.
11. Мелихова Е.В. Особенности формирования рецепторного покрытия пьезокварцевых иммуносенсоров для определения сульфопрепаратов [Текст] / Е.В. Мелихова, Е.Н. Калмыкова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: II Междунар. симпозиум.: тез. докл. – Краснодар, 2005. – С. 215 – 216.
12. Мелихова Е.В. Экстракционная пробоподготовка при анализе пищевых продуктов на содержание сульфопрепаратов с помощью проточного пьезокварцевого иммуносенсора [Текст] / Е.В. Мелихова, Е.Н. Калмыкова, Т.Н. Ермолаева // Экстракция органических соединений: III Междунар. конф.: тез. докл. – Воронеж, 2005. – С. 302.
13. Нартова Ю.В. Проточно-инжекционное определение сульфопрепаратов и пестицидов в органических концентратах [Текст] / Ю.В. Нартова, И.В. Неробеева, Е.В. Мелихова, Е.Н. Калмыкова, Т.Н. Ермолаева // Экстракция органических соединений: III Междунар. конф.: тез. докл. – Воронеж, 2005. – С. 308.

Подписано в печать 30. 11. 2005г. Формат 60х84 1/16. Бумага писчая.
Ризография. Печ. л. 1,0 Тираж 100 экз. Заказ № 1110
Липецкий государственный технический университет.
Типография ЛГТУ 398600 Липецк, ул. Московская, 30

№25445

РНБ Русский фонд

2006-4

28075