

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](mailto: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 ( $\Delta f$ ) иммуносенсора с помощью наночастиц золота различного диаметра. Показано, что использование частиц, диаметром 5 нм, приводит к увеличению  $\Delta f$  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 ( $\Delta f$ ) 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:  $\gamma$ -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  $\text{HAuCl}_4$ :

**Способ 1.** К 1 мл 0,003%-ной  $\text{HAuCl}_4$  добавляли 10 мл 8% раствор цитрата натрия и нагревали до изменения окраски.

**Способ 2.** К 1 мл 0,003%-ной  $\text{HAuCl}_4$  добавляли 10 мл 0,01% раствор солянокислого гидросиламина и нагревали до изменения окраски.

**Способ 3.** К 1 мл 0,003%-ной  $\text{HAuCl}_4$  добавляли 2 мл 10 % раствор аскорбиновой кислоты и нагревали до изменения окраски.

**Способ 4.** К 1 мл 0,003%-ной  $\text{HAuCl}_4$  добавляли 10 мл 10% раствор гидразина и нагревали до изменения окраски.

**Способ 5.** К 1 мл 0,003%-ной  $\text{HAuCl}_4$  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  $\text{HAuCl}_4$  добавляли 2 мл 1 % раствор хлорида олова и нагревали до изменения окраски.

**Способ 7.** К 1 мл 0,01%-ной  $\text{HAuCl}_4$  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  $\text{HAuCl}_4$ , 100 мкл раствора хлорида олова (II) и нагревали 30 мин при температуре 60°C при постоянном помешивании.

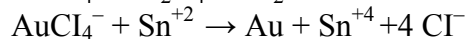
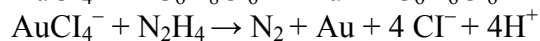
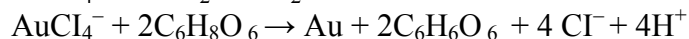
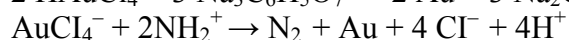
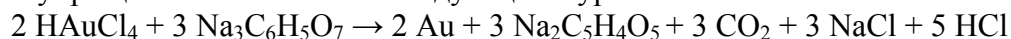
**Способ 9.** К 1 мл цитратного буфера (рН 4,24) добавляли 1 мл 0,01 % раствора  $\text{HAuCl}_4$ , 100 мкл раствора хлорида олова (II) и нагревали 30 мин при температуре 60°C при постоянном помешивании.

**Способ 10.** К 1 мл цитратного буфера (рН 4,24) добавляли 100 мкл раствора хлорида олова (II), 1 мл 0,01 % раствора  $\text{HAuCl}_4$ , 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 ( $\text{CHAuCl}_4$ ), последовательности внесения реагентов, рН среды, температуры ( $t, ^\circ\text{C}$ ) и длительности нагревания ( $\tau_n$ ), 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  $\text{AuNP}$  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 ( $\lambda_{\max}$ - длина волны соответствующая максимуму светопоглощения).

Способ синтеза	$\lambda_{\max}$ , нм	t, °C	$\tau_{\text{н}}$ , мин	pH	СНАuCl <sub>4</sub> , ·10 <sup>6</sup> моль/л	С <sub>восст.</sub> , ·10 <sup>3</sup> моль/л	d <sub>ср.</sub> , 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<sub>4</sub> влияет на скорость и полноту протекания процессов нуклеации и роста частиц. В случае последовательного добавления HAuCl<sub>4</sub> 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  $\gamma$ -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 ( $\Delta m$ ,  $\Delta h$ ) и шероховатость сформированных слоев ( $R_a$ ) соответственно.

Применение модификатора на основе  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана способствует выравниванию поверхности и прочному равномерному закреплению последующих молекулярных слоев, что подтверждается значениями  $\Delta m$  и  $\Delta h$ , 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.

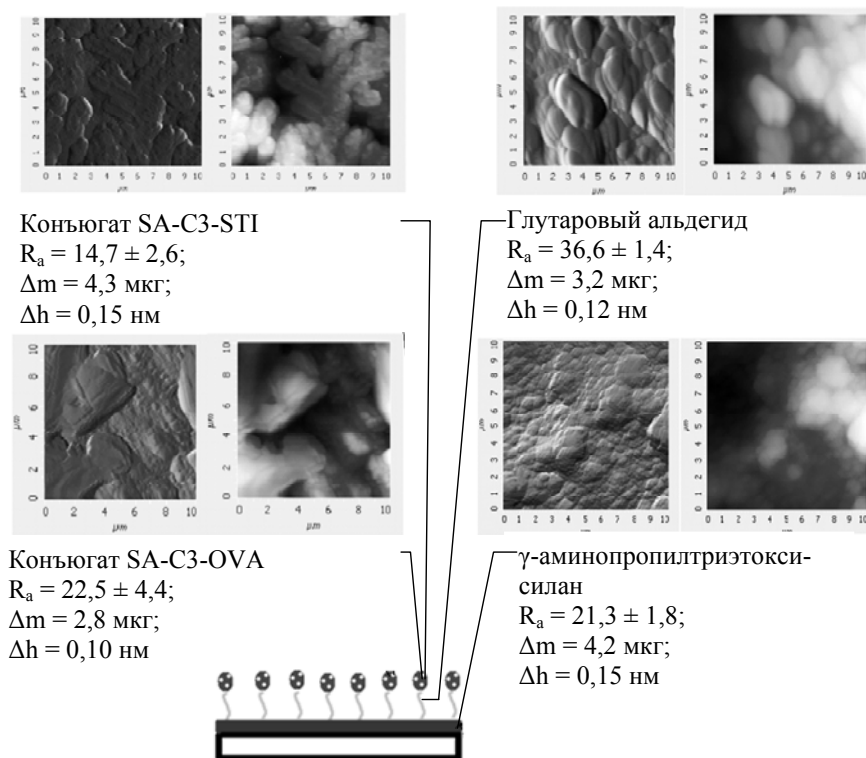


Рис. 1. Послойная характеристика поверхности покрытия пьезокварцевого сенсора для определения сульфаметазина, полученная методом АСМ

**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 –  $13 \pm 2$ .

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-найденно. 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](mailto: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.