

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 54.066; 577.18; 543.94

ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПЕЧАТНЫХ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА И СИНТЕТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНОПОДОБНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРАМФЕНИКОЛА**Галина Васильевна Преснова¹, Татьяна Владимировна Булко², Виктория Васильевна Шумянцева², Майя Юрьевна Рубцова¹**¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ)**Автор, ответственный за переписку:** Майя Юрьевна Рубцова, mrubtsova@gmail.com

Аннотация. Разработан электрохимический иммуносенсор на основе печатных графитовых электродов для определения антибиотика хлорамфеникола в воде и образцах молока. Показано, что иммобилизация специфичных к хлорамфениколу антител в жидкокристаллическом слое мембраноподобного дидодецилдиметиламмоний бромида позволяет сохранить подвижность и доступность активных центров антител, добавление наночастиц золота улучшает перенос электронов с поверхности электрода на окислительно-восстановительные центры пероксидазы хрена, используемой в качестве метки. Предел обнаружения хлорамфеникола в воде составил 0,02 мкг/л, в молоке – 0,04 мкг/л. Метод может быть использован для определения остаточного количества хлорамфеникола в продуктах животного происхождения.

Ключевые слова: иммуносенсоры, печатные графитовые электроды, хлорамфеникол, наночастицы золота, пероксидаза хрена, молоко

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-468-477

Список сокращений: ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид, ИФА – иммуноферментный анализ, НЧЗ – наночастицы золота, ПГЭ – печатный графитовый электрод, ПХ – пероксидаза хрена, ХАФ – хлорамфеникол, ЦВА – цикловольтамперограмма.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121041500039-8 «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» и в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100168-2).

Для цитирования: Преснова Г.В., Булко Т.В., Шумянцева В.В., Рубцова М.Ю. Иммуносенсор на основе печатных графитовых электродов, модифицированных наночастицами золота и синтетическими мембраноподобными веществами, для определения хлорамфеникола // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. 2023. Химия. Т. 64. № 5. С. 468–477.

ORIGINAL ARTICLE

IMMUNOSENSOR BASED ON SCREEN-PRINTED GRAPHITE ELECTRODES MODIFIED WITH GOLD NANOPARTICLES AND SYNTHETIC MEMBRANE-LIKE SUBSTANCE FOR THE DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL

Galina V. Presnova¹, Tatiana V. Bulko², Victoria V. Shumyantseva², Maya Yu. Rubtsova¹

¹ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Maya Yu. Rubtsova, mrubtsova@gmail.com

Abstract. An electrochemical immunosensor based on screen-printed graphite electrodes has been developed for the determination of the antibiotic chloramphenicol in water and milk samples. It has been shown that the immobilization of chloramphenicol-specific antibodies in a liquid crystal layer of a membrane-like didodecyldimethylammonium bromide preserves the mobility and accessibility of active centers of antibodies, and the addition of gold nanoparticles improves electron transfer from the electrode surface to the redox centers of horseradish peroxidase used as a label. The limit of detection of chloramphenicol in water was 0.02 µg/L, in milk – 0.04 µg/L. The method can be used to determine residual amounts of chloramphenicol in animal products.

Keywords: immunosensors, screen-printed graphite electrodes, chloramphenicol, gold nanoparticles, horseradish peroxidase, milk

Abbreviations: AuNP – gold nanoparticle, CAP – chloramphenicol, CV – cyclic voltammogram, DDAB – didodecyldimethylammonium bromide, ELISA – enzyme immunoassay, HRP – horseradish peroxidase, SPE – screen-printed graphite electrode.

Financial Support. The work was carried out within the framework of the state task of Lomonosov Moscow State University № 121041500039-8 “Molecular design, structural and functional analysis and regulation of enzyme systems, cellular structures, bi-nanomaterials: fundamentals and applications in technology, medicine, environmental protection” and the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021–2030 (№ 122030100168-2).

For citation: Presnova G. V., Bulko T. V., Shumyantseva V. V., Rubtsova M. Yu. Immunosensor Based on Screen-Printed Graphite Electrodes Modified with Gold Nanoparticles and Synthetic Membrane-Like Substance for the Determination of Chloramphenicol // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. N 5. S. 468–477.

Хлорамфеникол (ХАФ, ([R–(R*, R*)]-2,2-ди-хлор-N-[2-гидрокси-1-(гидрокси-метил)-2-(4-нитрофенил)этил] ацетамид, левомецетин, хлоромецетин, синтомицин) относится к классу ароматических соединений амфениколов (рис. 1) и представляет собой антибиотик широкого спектра действия. Бактериостатическая активность ХАФ проявляется в связывании антибиотика с 23S рРНК субъединицей бактериальной рибосомы 50S, что приводит к ингибированию пептидилтрансферазы и нарушению процессов трансляции РНК. ХАФ широко используется для лечения инфекций, вызванных патогенными грам-

положительными и грамотрицательными бактериями, для подавления риккетсий, спирохет и

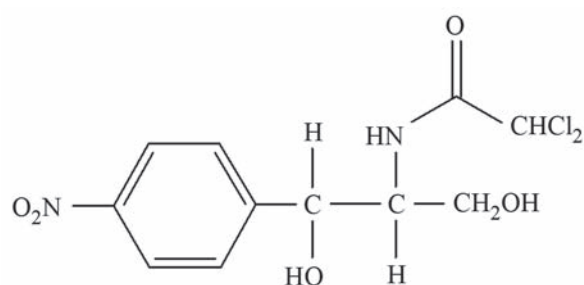


Рис. 1. Химическая структура хлорамфеникола

хламидий. Устойчивость микроорганизмов к этому антибиотику развивается относительно медленно. Однако применение ХАФ при лечении инфекционных заболеваний человека с использованием перорального или внутривенного введения сопровождается проявлением токсичности, которое может приводить к развитию апластической анемии, необратимого подавления кроветворяющей функции спинного мозга, лейкопения и др. [1–3]. В связи с этим ХАФ следует отнести к классу антибиотиков, потенциально опасных для здоровья человека, поэтому в последние десятилетия его применение в клинической медицине ограничивается использованием в офтальмологии и лечением поверхностных воспалений кожи. Благодаря своей эффективности и относительно небольшой стоимости ХАФ продолжает активно применяться в ветеринарии, животноводстве и птицеводстве, в том числе для профилактики инфекционных заболеваний. Поэтому сохраняется высокая вероятность попадания самого антибиотика и его метаболитов в продукты животного происхождения. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Европейского союза, США, Китая и Республики Беларусь установило минимальный требуемый предел обнаружения ХАФ или его метаболитов в пищевых продуктах в количестве 0,3 мкг/кг. На территории Таможенного союза остаточное содержание ХАФ в пищевых продуктах животного происхождения (молоке, мясе и в продуктах на их основе) не должно превышать 10 мкг/кг, а в продуктах, предназначенных для детского питания, этот показатель не должен превышать 0,3 мкг/кг [4, 5]. Из вышесказанного следует, что разработка методов высокочувствительного и селективного определения следового количества ХАФ в пищевых продуктах является актуальной задачей.

В настоящее время в целях сертификации и санитарно-гигиенического контроля сельскохозяйственных продуктов используются различные методы определения ХАФ: высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ (ИФА), тонкослойная хроматография и микробиологические методы. Наиболее высокая чувствительность характерна для метода ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией (предел обнаружения ХАФ составляет 0,2 мкг/кг), но при этом наблюдается высокое относительное стандартное отклонение определяемых значений концентрации в диапазоне от 0,2 до 1,0 мкг/кг [4]. Ограничением в использовании этого метода является высокая

стоимость оборудования. Микробиологические методы, напротив, достаточно дешевы и просты в исполнении, однако для них характерна низкая чувствительность и специфичность, а их пределы обнаружения ХАФ выше установленных нормативов. Для скрининга образцов продовольственного сырья на наличие остаточного количества ХАФ широко используют методы ИФА, для которых характерны высокие специфичность и точность определения, они позволяют за короткий срок проанализировать большое число образцов. Предел определения ХАФ этими методами составляет 0,3–0,7 мкг/кг в зависимости от типа продукта (яйца, молоко, мясо) [6]. Однако существует потребность в создании портативных аналитических устройств для экспресс-контроля содержания ХАФ в условиях небольших лабораторий.

Цель настоящей работы – разработка иммуносенсора с электрохимической детекцией для определения ХАФ в водных растворах и молоке. Для создания иммуносенсоров применяли печатные графитовые электроды, полученные методом трафаретной печати (ПГЭ), обладающие высокой степенью стандартизации, возможностью химической модификации рабочей поверхности, широким диапазоном используемых потенциалов, низким фоновым током и невысокой стоимостью [7]. В работе были поставлены следующие задачи: выбор принципа определения ХАФ, оптимизация иммобилизации антител на поверхности ПГЭ и условий определения ХАФ, использование разработанного иммуносенсора для определения ХАФ в воде и образцах молока.

Материалы и методы

Материалы

Для проведения исследования использовали дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия, катехол, пероксидазу хрена («Sigma-Aldrich», США), пероксид водорода, ферроцианид, казеин, кислоты, щелочи и неорганические соли – компоненты буферных систем марки «ос.ч.» («Химмед», Россия). Для приготовления буферных растворов применяли деионизованную воду («Milli-Q System», «Millipore», Великобритания). Поликлональные антитела к ХАФ предоставлены ЗАО «НВО Иммунотех» (Россия), конъюгат ХАФ с пероксидазой хрена (ПХ) получали по методике [8]. Образцы молока с жирностью 3,2% приобретены в торговой сети Москвы. В работе использовали

трехконтактные электроды с графитовыми рабочим (диаметр 2 мм) и вспомогательным электродами, а также с хлоридсеребряным электродом сравнения (ПГЭ – печатный графитовый электрод), полученные методом трафаретной печати «ColorElectronics», (Россия, <http://www.colorel.ru>). Спектральные исследования проводили на спектрофотометре «UV 1602» («Shimadzu», Япония), электрохимические измерения – на потенциостате AUTOLAB 12 («Metrohm Autolab», Нидерланды) с программным обеспечением GPES (версия 4.9.7). Электрохимические исследования проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4 (КФБ), при комнатной температуре. Цикловольтамперограммы (ЦВА) регистрировали при скорости сканирования от 10 до 100 мВ/с. Все электрохимические потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного (Ag/AgCl) электрода сравнения.

Синтез коллоидного раствора наночастиц золота, стабилизированного ДДАБ

К 1 мл 0,1 М ДДАБ в хлороформе прибавляли при перемешивании 0,5 мл 10 мМ водного раствора $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Далее при интенсивном перемешивании медленно прибавляли 0,2 мл свежеприготовленного водного раствора 0,4 М NaBH_4 . Через 2 ч окрашенный органический слой отделяли и промывали равным объемом воды. Коллоидный раствор наночастиц золота (НЧЗ), стабилизированный ДДАБ в хлороформе, был охарактеризован с помощью абсорбционной спектроскопии. Концентрацию наночастиц золота в 0,1 М ДДАБ в хлороформе рассчитывали в соответствии со стехиометрией реакции.

Приготовление иммуносенсоров и проведение анализа хлорамфеникола

На рабочую поверхность ПГЭ наносили 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М ДДАБ в хлороформе. После испарения хлороформа (в течение 10 мин) наносили 2 мкл раствора иммуноглобулиновой фракции антител в концентрации 5 мкг/мл, которую получали из антисыворотки двухкратным переосаждением сульфатом аммония с последующим диализом против КФБ. Электроды оставляли на 12 ч при +4 °С во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов. Затем полученный электрод отмывали в проточной системе в течение 5 мин в растворе КФБ, содержащем 0,5% раствора Твин-20 (КФБТ), а затем в рас-

творе КФБ (скорость потока 1 мл/мин). После этого пропускали в течение 20 мин раствор, состоящий из смеси стандартных растворов ХАФ и конъюгата ХАФ-ПХ в буфере, содержащем 0,5%-й раствор казеина. Стандартные растворы ХАФ с концентрацией 0 мкг/л; 0,05; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 и 10,0 мкг/л готовили в буферном растворе из исходного раствора антибиотика в метаноле (1 мг/мл). После отмывки электрода в растворах КФБТ и КФБ в проточной системе в течение 5 мин (скорость потока 1 мл/мин) определяли электрохимическую активность ПХ, пропуская субстрат пероксида водорода и медиатора катехола. Строили градуировочные кривые зависимости регистрируемого тока от концентрации ХАФ. Предел обнаружения ХАФ определяли как среднее значение максимального тока раствора, не содержащего ХАФ, минус три значения стандартного отклонения.

Результаты и их обсуждение

Принцип определения хлорамфеникола на электрохимических биосенсорах

В последние годы все большее внимание уделяется разработке портативных аналитических устройств на основе электрохимических методов анализа, обладающих высокой селективностью, чувствительностью, совместимостью с программируемыми компактными регистрирующими устройствами и возможностью интегрирования их с мобильными устройствами и смартфонами [9, 10]. Бесспорным преимуществом электрохимических биосенсоров является низкая зависимость от влияния окружающей среды. Сочетание специфичности и чувствительности ИФА с уменьшением времени анализа и количества используемых реагентов, характерных для электрохимических методов детекции, открывает широкие перспективы для разработки иммуносенсоров для определения различных биологически активных соединений. Применение электродов, производимых методом трафаретной печати с рабочим графитовым электродом, приводит к увеличению воспроизводимости системы, удешевлению и упрощению анализа. Кроме того, такие электроды имеют низкий фоновый ток и широкий диапазон используемых потенциалов [7, 11–12].

Для определения хлорамфеникола предложено разработать иммуносенсор и использовать прямую схему конкурентного иммуноферментного анализа, которая характеризуется наибольшей экспрессностью (определение проводится

в одну стадию) и высокой чувствительностью определения гаптенного небольшого размера. Этот формат анализа основан на конкуренции нативного ХАФ и конъюгата ХАФ с ПХ за ограниченное число активных центров антител, иммобилизованных на рабочей поверхности ПГЭ. Схематические изображения ПГЭ, модификации его поверхности и проведения анализа на электроде представлены на рис. 2.

Иммобилизация антител на рабочей поверхности иммуносенсоров

Основным биораспознающим элементом иммуносенсоров служат антитела, иммобилизованные на поверхности электрода. Иммобилизация белков на различных поверхностях может сопровождаться частичной денатурацией или недоступностью для взаимодействия с лигандами [13], поэтому сохранение активности и конформации их активных центров, а также их ориентация относительно поверхности электрода являются ключевыми факторами, влияющими на чувствительность иммуносенсоров. Для улучшения стабильности и сохранения свойств иммобилизованных белков предложено модифицировать электроды мембраноподобными синтетическими ПАВ, например дидодецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ), дигексадецилфосфатом (ДГФ), лецитином и димиристоилфосфатидилхолином, которые образуют на поверхности электрода устойчивые лиотропные жидкокристаллические пленки [14–17]. В настоящей работе использовали ДДАБ – амфифильное поверхностно-активное соединение, которое образует на поверхности графита моделиру-

ющую биологические мембраны многослойную проницаемую пленку [18]. Таким образом антитела помещаются в слой, образованный гидрофобными «хвостами» синтетического ПАВ, что может способствовать сохранению их биологической активности. В качестве дополнительного трансдьюсера электрического сигнала в пленку ДДАБ вводили НЧЗ, поскольку ранее было показано, что введенные в мембраноподобные ПАВ наночастицы металлов могут выступать в роли медиаторов электронного транспорта и способствовать эффективному переносу электронов между редокс-центром белков и поверхностью электрода [19, 20]. Для исследования сохранения распознающей активности активных центров антител на ПГЭ в отношении ХАФ использованы три типа электродов:

- 1) немодифицированные графитовые электроды (ПГЭ);
- 2) электроды, модифицированные синтетическим мембраноподобным ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ);
- 3) электроды, модифицированные ДДАБ с наночастицами золота (ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ).

Эффективность иммобилизации антител определяли как величину электрохимического сигнала после образования комплекса иммобилизованных антител с конъюгатом ХАФ-ПХ в фиксированной концентрации. Число комплексов, образованных на поверхности электродов, было пропорционально электрохимической активности фермента-метки (ПХ) в реакции электровосстановления пероксида водорода. В качестве медиатора использовали катехол, окисления которого пероксидом водорода в отсутствие пероксидазы не наблюдали. На рис. 3

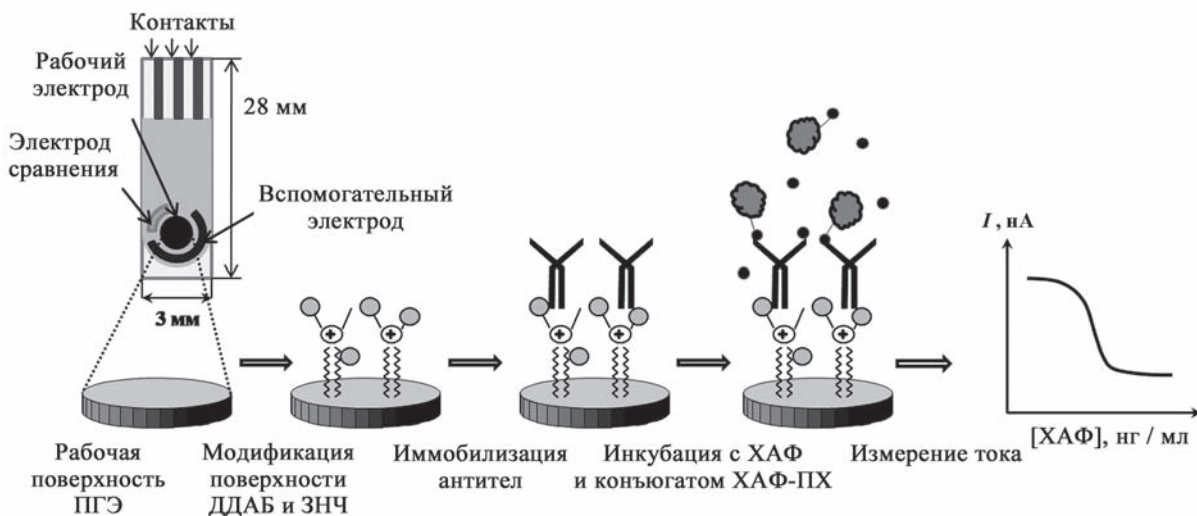


Рис. 2. Схематическое изображение печатного графитового электрода, модификации его рабочей поверхности и проведения конкурентного иммуноферментного анализа хлорамфеникола с электрохимической детекцией

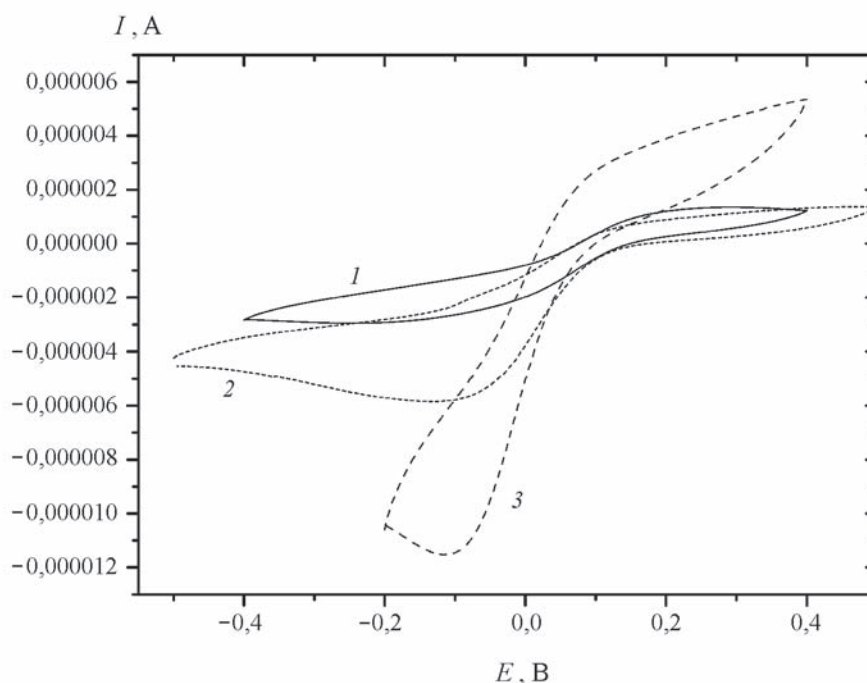


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы печатных графитовых электродов с иммобилизованными антителами после взаимодействия с конъюгатом хлорамфеникол-пероксидаза хрена. Способы иммобилизации антител: 1 – ПГЭ/Ат, 2 – ПГЭ/ДДАБ/Ат, 3 – ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ/Ат. Измерения проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 50 мМ NaCl, 0,5 мМ пероксида водорода и 0,1 мМ катехола. Диапазон потенциалов (–0,5)–(+0,5) В. Скорость сканирования 50 мВ/с

представлены ЦВА электродов с иммобилизованными поликлональными антителами к ХАФ на ПГЭ с разной модификацией рабочей поверхности, полученные после инкубации с конъюгатом ХАФ-ПХ.

Как следует из рис. 3, наиболее высокая электрохимическая активность ПХ в составе иммунных комплексов наблюдалась для электродов, модифицированных ДДАБ/НЧЗ (ЦВА 3 на рис. 3). Интенсивность максимальной амплитуды пиков электроокисления и электровосстановления катехола как медиатора была существенно выше для электродов ДДАБ/НЧЗ по сравнению с электродами, модифицированными только ДДАБ (в 2 раза для окислительного пика и в 3 раза для восстановительного пика). Таким образом, при сравнении разных методов иммобилизации показано, что применение электродов, модифицированных ДДАБ и коллоидным золотом (ДДАБ/НЧЗ), позволяет получить иммуносенсор с иммобилизованными антителами, сохраняющими доступность и активность своих антиген-связывающих центров в большей степени по сравнению с модификацией только ДДАБ и немодифицированным графитом. Можно предположить, что антитела, иммобилизованные в

жидкокристаллическом слое ДДАБ на поверхности ПГЭ, лучше сохраняют подвижность своих активных центров, что обеспечивает их доступность для связи с антигеном. Высокая проницаемость слоя ДДАБ позволяет проникать частицам электролита и медиатора из объема раствора, а наличие НЧЗ улучшает перенос электронов с поверхности электрода на окислительно-восстановительные центры фермента.

Определение ХАФ методом прямого анализа без использования меток на иммуносенсорах

Исследовали возможность прямого определения ХАФ на электродах с иммобилизованными антителами в слое ДДАБ с НЧЗ. Для этого регистрировали ЦВА электродов при пропускании растворов ХАФ в КФБ с разной концентрацией (рис. 4, а). В качестве электролита использовали 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$. Наблюдали изменения максимальной амплитуды пиков восстановления и окисления электролита в зависимости от концентрации ХАФ. Использование жидкокристаллического слоя ДДАБ с НЧЗ улучшает электрон-транспортные свойства

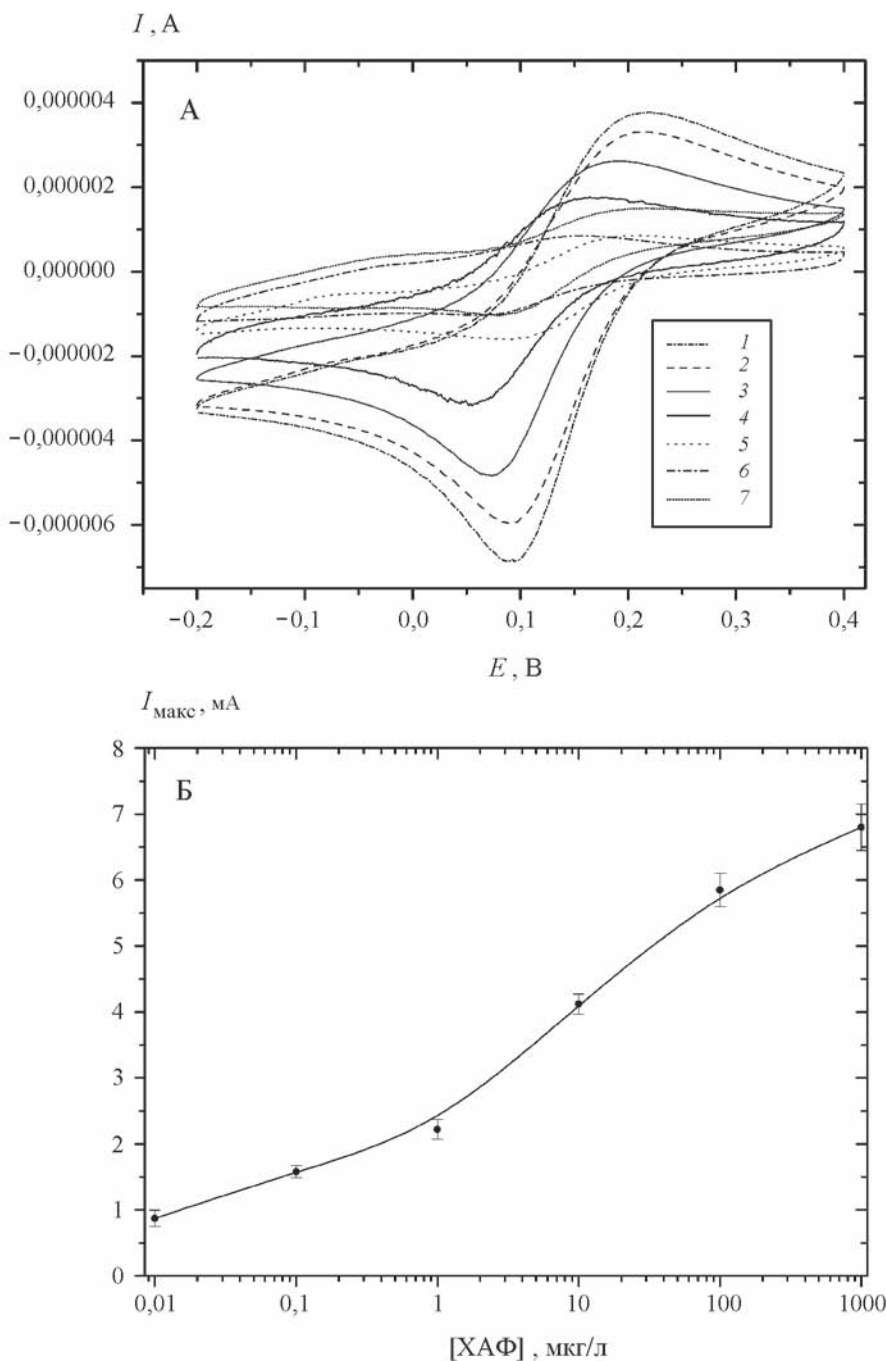


Рис. 4. А – Циклические вольтамперограммы электродов ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ/Ат, полученные при разных концентрациях хлорамфеникола, мг/л: 1 – 1, 2 – 100, 3 – 10, 4 – 1, 5 – 0,1, 6 – 0,01, 7 – 0. Измерения проводили в 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$, скорость сканирования 50 мВ/с; Б – градуировочная кривая определения хлорамфеникола в буферном растворе (0,1 М калий-фосфатный буфер, содержащий 50 мМ NaCl, pH 7,4)

электролита. Из рис. 4, а видно, что величина максимальной амплитуды восстановительного тока зависит от концентрации ХАФ и может быть использована в качестве аналитического сигнала при его определении. На рис. 4, б приведена градуировочная кривая, полученная по зависимости катодного тока при напряжении 0,1 В от концентрации ХАФ. При

увеличении концентрации ХАФ наблюдается пропорциональное увеличение амплитуды катодного тока. Предел обнаружения ХАФ определяли как среднее значение максимальной амплитуды пика электровосстановления раствора $K_3Fe(CN)_6$, не содержащего ХАФ, плюс три значения стандартного отклонения. Этот показатель составил 0,2 мг/л.

Определение ХАФ методом конкурентного анализа на иммуносенсорах

Для определения ХАФ на иммуносенсорах был разработан метод в формате конкурентного иммуноанализа: одновременное пропускание через электроды с иммобилизованными антителами смеси стандартных растворов ХАФ с конъюгатом ХАФ-ПХ в постоянной концентрации. В этом случае число иммунных комплексов, меченных ПХ, на поверхности электрода будет обратно пропорционально концентрации ХАФ. Число иммунных комплексов с ПХ определяли по электрохимической активности ферментативной реакции восстановления пероксида водорода с использованием катехола в качестве медиатора.

На основании анализа кривых титрования иммобилизованных специфических антител конъюгатом хлорамфеникол – пероксидаза хрена ХАФ-ПХ на поверхности электродов, модифицированных синтетическим мембраноподобным соединением ДДАБ и наночастицами золота НЧЗ (ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ), были выбраны оптимальные концентрации иммунореагентов для проведения анализа хлорамфеникола в буфере и в молоке. Оптимизированы концентрации катехола и пероксида водорода, а также параме-

тры и условия проведения анализа, обеспечивающие его оптимальную чувствительность.

На рис. 5 представлена типичная градуировочная кривая определения хлорамфеникола в буфере с использованием 0,5 мМ пероксида водорода и 0,1 мМ катехола. Предел обнаружения ХАФ составил 0,02 мкг/л. Линейный диапазон значений концентрации ХАФ, определенный как область 20–80%-го связывания конъюгата, составил 0,02–40 мкг/л. Метод характеризуется высокой точностью и воспроизводимостью: относительные стандартные отклонения определения ХАФ в буферных растворах, содержащих 0,1; 0,5 и 3,0 мкг/л ХАФ, составили для трех разных дней ($n = 3$, $P = 0,95$) 8,9; 7,6 и 7,1 % соответственно. ПГЭ, модифицированные ДДАБ и НЧЗ, показали высокую операционную стабильность: остаточная активность электрода сохраняет 95% после трех часов непрерывной работы. Реагенты, необходимые для проведения анализа, стабильны не менее 6 месяцев, если их хранить при +4 °С. Аналитические характеристики разработанного метода превосходят по чувствительности и диапазону линейных концентраций стандартный метод ИФА на 96-луночных планшетах (табл. 1).

Так как ХАФ широко применяется в ветеринарии, животноводстве и птицеводстве, в том числе

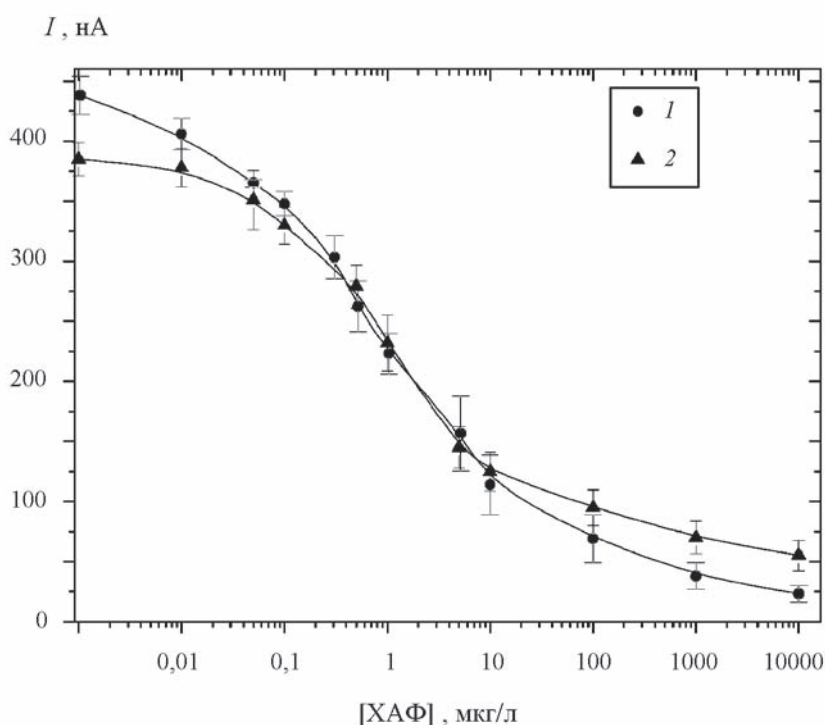


Рис. 5. Градуировочные кривые определения хлорамфеникола в буфере (1) и в молоке (2) на иммуносенсорах ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ/Ат. Измерения проводили в проточной ячейке в присутствии 0,5 мМ пероксида водорода и 0,1 мМ катехола

Т а б л и ц а 1

Сравнение аналитических параметров определения хлорамфеникола на иммуносенсорах с другими методами иммуноанализа

Метод определения	Предел обнаружения, мкг/л	Диапазон линейных концентраций, мкг/л	Ссылка
Иммуносенсоры на ПГЭ с электрохимической детекцией	0,02	0,02–40	настоящая работа
ИФА, спектрофотометрическая детекция	0,3	0,3–100	[6]

Т а б л и ц а 2

Результаты определения хлорамфеникола в образцах молока с использованием иммуносенсоров

Образец	Концентрация хлорамфеникола ($C \pm \sigma$), мкг/л		Степень извлечения, %
	введено	найдено	
1	0,50	0,47	94 ± 12
2	1,00	0,89	89 ± 8
3	5,00	5,8	116 ± 16

для профилактики инфекционных заболеваний, вероятность попадания самого антибиотика и его метаболитов в продукты животного происхождения довольно велика. Разработанный иммуносенсор (ПГЭ/ДДАБ/НЧЗ/Антитела к ХАФ) для количественного анализа антибиотика был применен для его определения в образцах молока. Для исключения влияния компонентов молока на результаты количественного определения ХАФ использовали разбавление образцов молока буфером без дополнительной подготовки проб. Было показано, что разбавление образцов молока с жирностью 3,2% в 5 раз позволяет получить результаты, близкие к полученным с использованием стандартной градуировочной кривой в буферном растворе (рис. 5). Предел обнаружения ХАФ в молоке составил 0,04 мкг/л,

линейный диапазон определяемых концентраций составил 0,04–80 мкг/л, степень извлечения ХАФ, определенная методом «введено-найдено» составила 89–116% (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенного исследования были показаны преимущества иммобилизации антител в жидкокристаллический слой ДДАБ, сформированный на поверхности графитовых электродов, и добавления в них НЧЗ для сохранения иммунологической активности антител и эффективного переноса электронов, что имеет решающее значение для аналитической чувствительности методики определения ХАФ. Разработан электрохимический иммуносенсор на основе печатных графитовых электродов, который может быть использован для определения остаточного количества ХАФ в продуктах питания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu Y., Yan K., Okoth O.K., Zhang J. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol.74. P. 1016.
- Yan C., Zhang J., Yao L., Xue F., Lu J., Li B., Chen W. // *Food Chem.* 2018. Vol. 260. P. 208.
- Nashkavayi A.B., Raof J.B., Ojani R., Asl E.H. // *Electroanalysis.* 2015. Vol. 27. N 6. P. 1449.
- Полянских Е.И., Полоневич А.Г., Бельшева Л.Л., Лещев С.М. // *Журнал аналитической химии.* 2019. Vol. 74. N 6. P. 455.
- Qin X., Wang Q., Geng L., Shu X., Wang Y. // *Talanta.* 2019. Vol. 197 P. 28.
- Федорова М.Д., Андреева И.П., Вылегжанина Е.С., Комаров А.А., Рубцова М.Ю., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. // *Биотехнология.* 2009. N 6. P. 79.
- Kulys J., D'Costa E.J. // *Biosens. Bioelectron.* 1991. Vol. 6. P. 109.
- Hermanson G.T., *Bioconjugate Techniques.* // California, 1996.

9. Seo S.E., Tabei F., Park S.J., Askarian B., Kim K.H., Moallem G., Chong J.W., Kwon O.S. // *J. Indust. Eng. Chem.* 2019. Vol. 77. P. 1.
10. Patel M., Agrawal M., Srivastava A. // *Mater. Adv.* 2022 (DOI: 10.1039/d2ma00427e).
11. Suresh R.R., Lakshmanakumar M., Arockia Jayalatha J.B.B.; Rajan K.S., Sethuraman S., Krishnan U.M., Rayappan J.B.B. // *J. Mater. Sci.* 2021. Vol. 56. N 15. P. 8951.
12. Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. Vol. 734. P. 31.
13. Gray J.J. // *Curr. Opin. Structur. Biol.* 2004. Vol. 14. N 1. P. 110.
14. Šrejber M., Navrátilová V., Paloncýová M., Bazgier V., Berka K., Anzenbacher P., Otyepka M. // *J. Biochem.* 2018. Vol. 183. P. 117.
15. Panicco P., Castrignan`o S., Sadeghi S.J., Nardo G., Di Gilardi G. // *Bioelectrochemistry* 2021. Vol. 138. P. 107729.
16. Karyakin A.A., Puganova E.A., Budashov I.A., Kurochkin I.N., Karyakina E.E., Levchenko V.A., Matveyenko V.N., Varfolomeev S.D. // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. P. 474.
17. Rusling J.F. // *Acc. Chem. Res.* 1998. Vol. 31. P. 363.
18. Zhang Z., Nassar A.-E.F., Lu Z., Schenkman J.B., Rusling J.F. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1997. Vol. 93. P. 1769.
19. Silva N.F.D., Magalhães J.M.C.S., Barroso M.F., Oliveira-Teles T., Freire C., Delerue-Matos C. // *Talanta.* 2019. Vol. 194. P. 134.
20. Liu S., Leech D., Ju H. // *Anal. Lett.* 2003. Vol. 36. P. 1.

Информация об авторах

Преснова Галина Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (gpresnova@gmail.com);

Булко Татьяна Владимировна – науч. сотр. лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ (tanyabulko@mail.ru);

Шумянцева Виктория Васильевна – зав. лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ, докт. биол. наук, профессор (viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru);

Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.01.2023;
одобрена после рецензирования 10.02.2023;
принята к публикации 15.02.2023.