



Возможности поляризационного флуоресцентного иммуноанализа и амперометрических тирозиназных иммуносенсоров в определении хлорамфеникола

Бейлинсон Р.М.¹, Явишева А.А.¹, Цуй Ичень¹, Ян Цыбо¹, Куксенюк А.А.¹, Медянцева Э. П.¹, Заиров Р.Р.², Еремин С. А.³

¹Казанский (Приволжский)Федеральный Университет, Казань, Россия

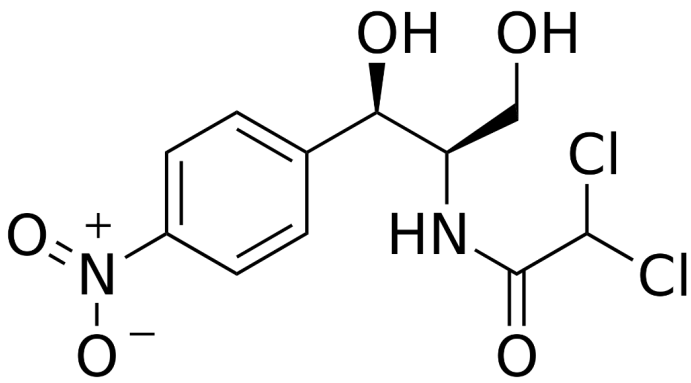
²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия

³Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

rvarlamo@mail.ru

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Разработка варианта поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) и амперометрического иммуносенсора с тирозиназой в качестве метки для чувствительного и селективного определения антибиотика хлорамфеникола в пищевых (молочных) продуктах.

Объект анализа:



Хлорамфеникол — антибиотик, антибактериальное средство широкого спектра действия, бесцветные кристаллы чрезвычайно горького вкуса.

Схема функционирования амперометрического иммуоферментного сенсора

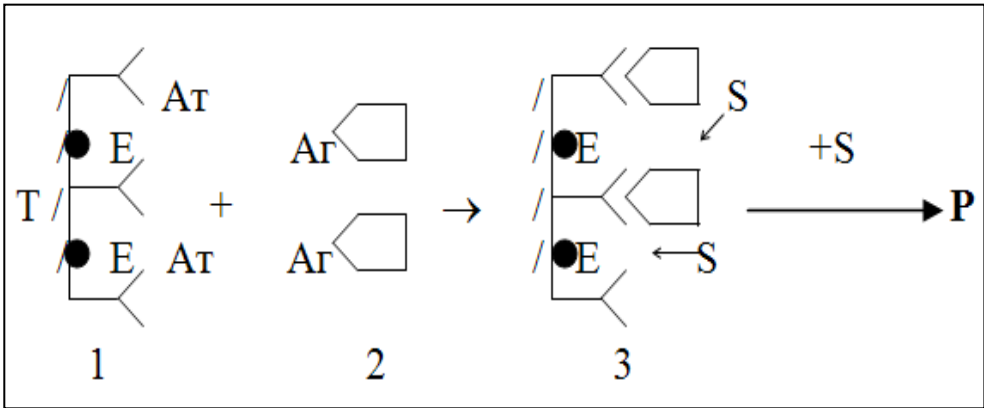
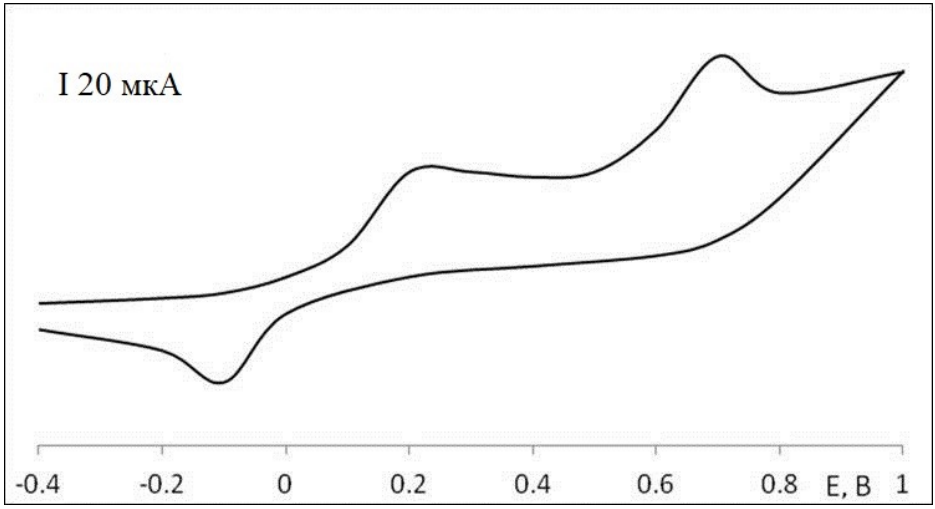
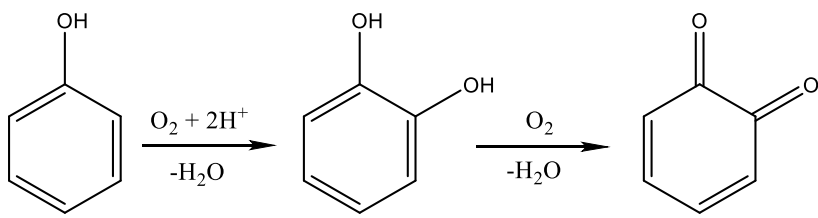


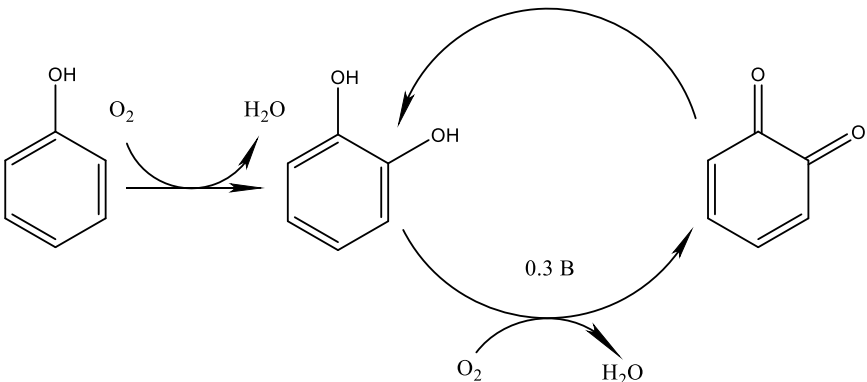
Схема действия ИФС на основе иммобилизованных Ат против хлорамфеникола и тирозиназы: совместно иммобилизованные фермент (тирозидаза) и Ат (1), Ат в растворе – хлорамфеникол (2), образующийся иммунный комплекс и возможный подход субстрата к поверхности фермента (3).

Ферментативная реакция:



Циклическая вольтамперограмма продуктов реакции ферментативного превращения фенола в присутствии амперометрического ИФС. Концентрация фенола 1×10^{-3} моль/л, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с pH 7.0.

Электрохимические реакции:



Аналитические возможности амперометрического ИФС и ПФИА для определения хлорамфеникола (n=3, R=0.95)

Метод анализа	Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			C _n , моль/л
		mP = (A ± δ) × (-lgC) + (B ± δ)	(A ± δ)	(B ± δ)	
ПФИА	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-11}$	20.2 ± 0.7	-121 ± 5	0.9867	5×10^{-12}
Амперометрический ИФС	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$	16.0 ± 0.4	-12.1 ± 0.3	0.9855	8×10^{-10}

Константы связывания Ат к хлорамфениколу (ИФС)

$K_{a1} = (5.3 \pm 0.2) \times 10^9$ моль⁻¹,
 $K_{a2} = (3.7 \pm 0.2) \times 10^8$ моль⁻¹

Оценка селективности иммунологических взаимодействий (ИФС)

Мешающий антиген	% перекрестного взаимодействия
Тетрациклин	8%
Амоксицилин	5%

Результаты определения хлорамфеникола в образце (n=5, R=0.95), ПДК(хлорамфеникола) = 0.0003 мг/кг (9×10^{-7} М)

Метод	Образец	Содержание хлорамфеникол, моль/л
ПФИА	Молоко “Каждый день” 1.5% (ОАО	Не обнаружено
Тирозиназный ИФС	“МК Сарапул – молоко”, РФ, г. Сарапул)	

Выводы

- 1. Впервые показана возможность использования фермента тирозиназы в качестве метки при разработке амперометрического ИФС для определения хлорамфеникола.
- 2. Предложены новые амперометрические ИФС для определения хлорамфеникола на основе печатных графитовых электродов и иммобилизованного фермента тирозиназы, позволяющие определять хлорамфеникол в концентрационном интервале – от 1×10^{-9} М до 1×10^{-6} М с C_n 5×10^{-10} М
- 3. Разработан вариант поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения хлорамфеникола, который позволил определять хлорамфеникол в области концентраций – от 1×10^{-6} до 1×10^{-11} М с C_n 9×10^{-12} М.
- 4. Оценены константы селективности иммунрлогических взаимодействий для амперометрического иммуоферментного сенсора и процент перекрестных взаимодействий Ат к тетрациклину и амоксицилину.
- 5. Разработаны методики определения хлорамфеникола с помощью предлагаемых ИФС в молоке.

Устройство амперометрического иммуоферментного сенсора

Биочувствительная часть: иммобилизованные фермент (тирозидаза), Ат против хлорамфеникола

Преобразователь сигнала: планарные графитовые электроды

Обработка информации: многоцелевой электрохимический детектор «МЕВ»

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ

Реагенты

- Специфические моноклональные антитела к хлорамфениколу
 - Трейсер – хлорамфеникол, меченный зеленым флуоресцентным комплексом тербия (III)
- Хроматографически чистый препарат: хлорамфеникол

Условия функционирования иммуносенсоров:

Концентрация субстрата 1×10^{-3} мг/мл;

Разведение Ат 1:200,

Потенциал регистрации аналитического сигнала – 0.7 В.

Фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с pH 7.05 ± 0.05 .

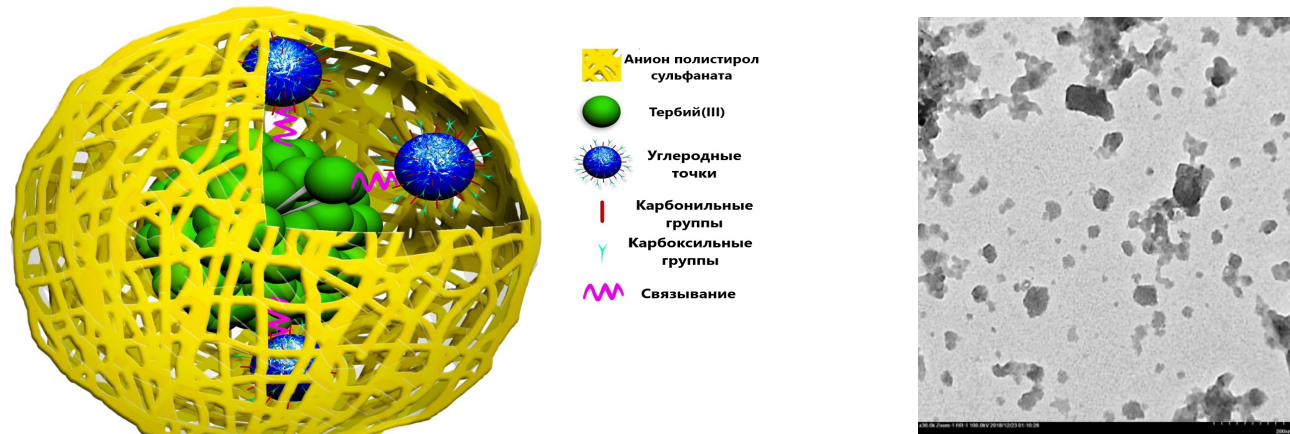
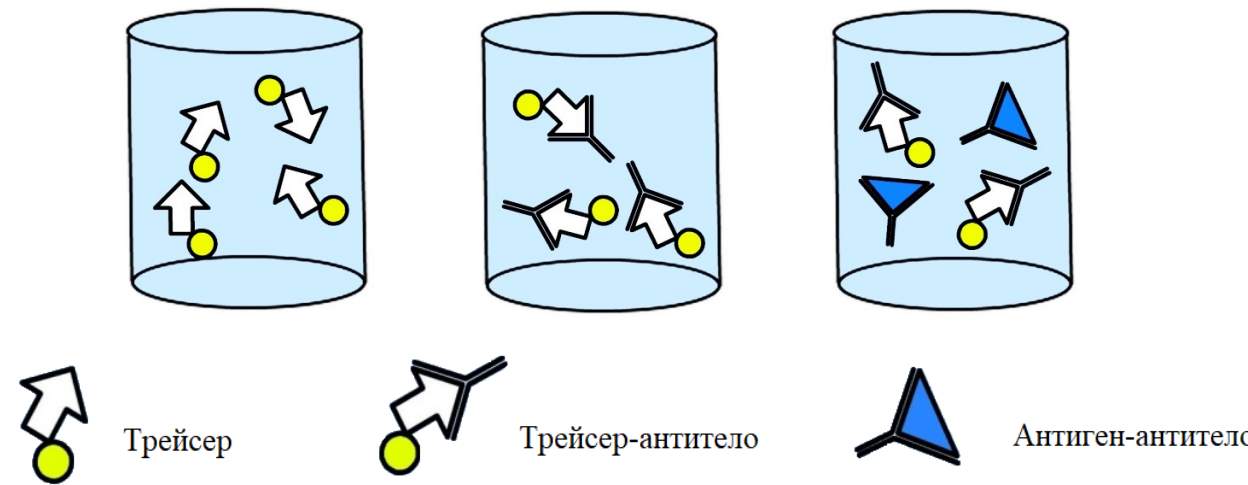
Условия проведения ПФИА:

Разведения трейсера - 1:10

Разведение Ат – 4×10^{-2} мг/мл

Время инкубации иммунного комплекса: трейсер – Ат - 5 мин.

Принцип ПФИА



Строение тербиевых наночастиц

ПЭМ изображение тербиевых наночастиц

Диаграмма зависимости интенсивности флуоресценции от разведения трейсера

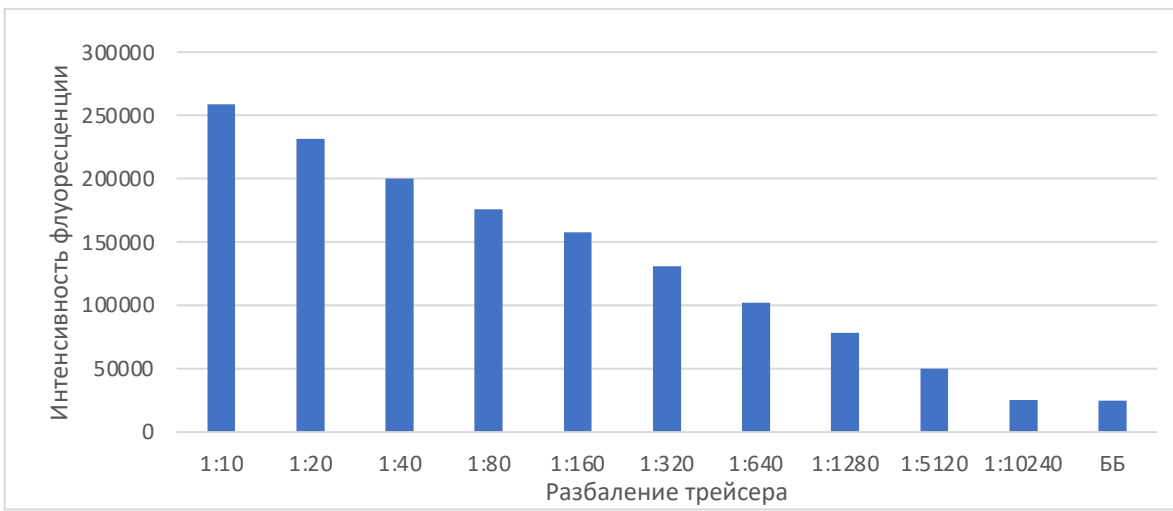
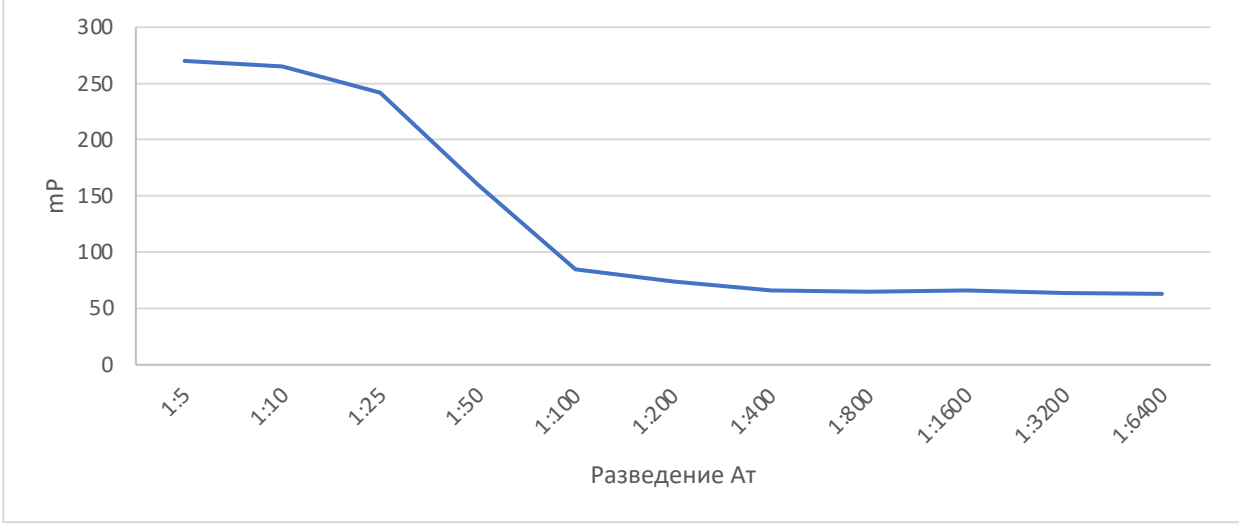


Диаграмма зависимости поляризации флуоресценции от разведения Ат



Градуировочная зависимость относительной поляризации флуоресценции от концентрации хлорамфеникола

