

*На правах рукописи*



**БАСОВА ЕВГЕНИЯ ЮРЬЕВНА**

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТ-МЕТОДЫ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИКАНТОВ  
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ  
И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

02.00.02. – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Саратов – 2010

Работа выполнена на кафедре общей и неорганической химии  
Института химии Саратовского государственного университета  
им. Н.Г. Чернышевского

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент  
Горячева Ирина Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Кулапина Елена Григорьевна  
Саратовский государственный  
университет им. Н.Г. Чернышевского

кандидат химических наук,  
Веселова Ирина Анатольевна  
Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Липецкий государственный технический  
университет, г. Липецк

Защита состоится 11 ноября 2010 года в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 по химическим наукам при Саратовском государственном университете имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, Саратов, СГУ, Институт химии, I корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке СГУ имени Н.Г. Чернышевского

Автореферат разослан 4 октября 2010 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор химических наук

Т.Ю. Русанова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Увеличение количества нормируемых контаминантов пищевых продуктов и ужесточение требований по их максимально допустимому содержанию приводят к необходимости разработки высокочувствительных методик определения. Наряду с широким использованием хроматографии, актуальной является разработка недорогих и простых тест-устройств для экспрессного определения токсичных соединений в пищевых продуктах и природных объектах. Широкое распространение получили тест-методы, основанные на принципах биологического узнавания. Использование специфических взаимодействий антиген-антитело позволяет проводить идентификацию и количественное определение большого круга целевых аналитов. Данные тесты не требуют сложной процедуры пробоподготовки, быстры в получении аналитической информации, а также доступны для использования вне лаборатории, что делает разработку иммунохимических тест-методов одним из наиболее перспективных направлений современной аналитической химии. В настоящее время проводятся исследования преимущественно в области иммунохроматографических и иммунофильтрационных мембранных тест-средств.

К моменту начала исследований, представленных в данной работе, были описаны лишь единичные примеры иммунохимических колоночных тестов. В данной работе основное внимание было уделено: повышению чувствительности; одновременному определению нескольких аналитов; устранению матричного эффекта образца; упрощению интерпретации результатов; развитию подходов к полуколичественному определению. Отличительной особенностью разрабатываемых систем является совмещение функций очистки, концентрирования и определения в едином устройстве.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящего исследования является разработка неинструментальных иммунохимических тест-методов и их применение для анализа продуктов питания и объектов окружающей среды. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- разработать иммуноферментные тест-методы для определения микотоксинов, бензо(а)пирена и 2,4,6-тринитротолуола в продуктах питания и объектах окружающей среды; осуществить выбор оптимальных параметров аналитических систем для определения как индивидуальных, так и нескольких соединений с помощью тест-методов и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА); провести сравнительную оценку чувствительности определения;
- осуществить синтез иммунохимических реагентов - конъюгатов аналитов с ферментом;

- получить поликлональные антитела к 2,4,6-тринитротолуолу и охарактеризовать их специфичность; изучить характеристики методик при использовании реагентов различной природы;
- разработать новый подход к измерению цветометрических характеристик и численной оценке интенсивности окраски иммунослоев, помещенных в прозрачное тест-устройство цилиндрической формы;
- получить новый иммуносорбент на основе наночастиц силикагеля, модифицированных антителами; изучить оптимальные условия связывания наночастиц с иммуноглобулинами; разработать и испытать иммуноферментный тест-метод для обнаружения бензо(а)пирена в воде. Разработать иммунохроматографический тест-метод на основе модифицированных наночастиц оксида железа (III), покрытых наночастицами золота и применить его для определения афлатоксина В2 в образцах красного перца.

**Методы и объекты.** Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс иммунохимических методов анализа и физико-химических методов исследования. Объектами определения явились микотоксины: охратоксин А, зеараленон, Т-2 токсин, афлатоксин В2, цитринин и микофеноловая кислота; а также 2,4,6-тринитротолуол и бензо(а)пирен. В работе применяли такие носители для иммунореагентов, как сефароза 4В и наночастицы силикагеля.

**Научная новизна** состоит в следующем:

Разработаны и оптимизированы тест-методы для определения индивидуальных соединений, таких как охратоксин А, бензо(а)пирен, 2,4,6-тринитротолуол и афлатоксин В2, а также групп соединений (одновременное детектирование зеараленона и Т-2 токсина в кормах; цитринина, охратоксина А и микофеноловой кислоты в сыре).

Проведена сравнительная оценка эффективности одновременного детектирования трех микотоксинов с помощью тест-метода и прямого конкурентного ИФА; определены аналитические характеристики разработанных методик.

Выделены, очищены и протестированы антитела к 2,4,6-тринитротолуолу; изучены характеристики методик его определения при использовании иммунореагентов различной природы.

Разработан новый подход к измерению цветометрических характеристик и численной оценке интенсивности окраски иммунослоев, помещенных в тест-устройство цилиндрической формы.

Получен новый иммуносорбент на основе наночастиц силикагеля, разработан и оптимизирован тест-метод определения бензо(а)пирена.

**Практическая значимость работы.**

В результате проведенных исследований получены иммунореагенты, поликлональные антитела к 2,4,6-тринитротолуолу, и разработаны тест-

методы для индивидуального и одновременного определения нескольких микотоксинов, 2,4,6-тринитротолуола и бензо(а)пирена в реальных объектах. Разработаны подходы к созданию тест-средств для определения нескольких аналитов в сложных матрицах. Показано, что данные тест-методы могут быть использованы для качественного и полуколичественного определения данных соединений в пиве, воде, кормах, сыре и других продуктах питания.

**На защиту автор выносит:**

- Новые подходы к сочетанию шагов очистка-концентрирование-определение для развития внелабораторных качественных тест-методов.
- Принципы оптимизации иммунохимических тест-методов для одновременного определения следовых количеств токсикантов в различных матрицах.
- Новый подход к измерению цветометрических характеристик и численной оценке интенсивности окраски иммунослоев помещенных в тест-устройство цилиндрической формы.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: International Mendeleev Congress (Moscow, Russia, 2007); International Society for Mycotoxicology «ISM Conference 2009» (Tulln, Austria, 2009); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов 2007-2010" (Москва, Россия 2007-2010); VI Всероссийская «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, Россия 2007, 2010); Всероссийская конференция «Химический анализ» (Москва, Россия 2008); III Всероссийская конференция «Аналитика России» (Туапсе, Россия, 2009); Всероссийская молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций (Саратов, Россия, 2009); IV Всероссийская научно-исследовательская конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, Россия, 2009).

**Публикации.** По теме данного исследования опубликована 21 публикация, в том числе 5 статей в международных журналах из списка ВАК, 5 в сборниках статей, 1 патент РФ, 10 тезисов докладов международных и всероссийских конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения (5 глав), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 216 ссылок. Работа изложена на 167 страницах, содержит 48 рисунка и 17 таблиц. (7 глав., включая введение)

Финансовая поддержка работы осуществлялась проектами: гранты РФФИ (10-03-91168-ГФЕН и 05-03-34828-МФ), грант НАТО-Россия (СВР.NR.CLG.982651), гранты ДААД (А0872873, 2008; А0972750, 2009).

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Глава 1. Литературный обзор

В данной главе представлен обзор литературы, касающийся основных характеристик токсичных веществ (микотоксинов, бензо(а)пирена, 2,4,6-тринитротолуола), методики определения которых разрабатывались в данной работе. Рассмотрены факторы, способствующие их появлению, и влияние на организм человека и животных. Описаны иммунохимические методы определения этих токсикантов, включающие твердофазный ИФА и неинструментальные тест-методы. Проанализированы принципы реализации каждого метода, приведены примеры их использования для определения токсикантов различных групп в продуктах питания, кормах для животных и объектах окружающей среды.

## Глава 2. Экспериментальная часть

В работе в качестве определяемых веществ выбраны: Т-2 токсин, зеараленон, охратоксин А, цитринин, микофеноловая кислота, афлатоксин В<sub>2</sub>, 2,4,6-тринитротолуол, бензо(а)пирен (рис. 1).

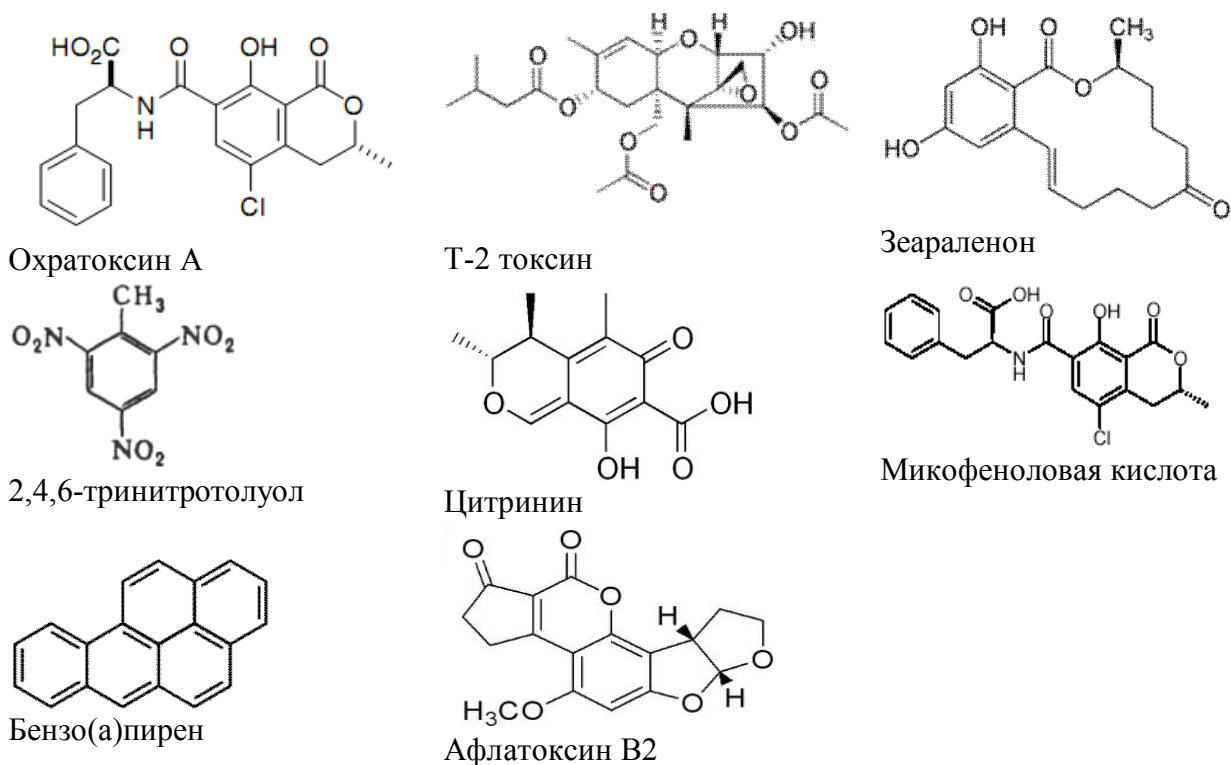


Рис. 1. Химические структуры анализируемых соединений.

Конструкция тестов состояла из прозрачного картриджа, в который помещали детектирующий иммунослой, представляющий собой смесь геля на основе сефарозы 4В с привитыми антителами и геля с заблокированными активными группами. Полученный гель помещали между пористыми

фильтрами (фритами). Варианты тестов, используемых в работе, приведены на рис. 2.

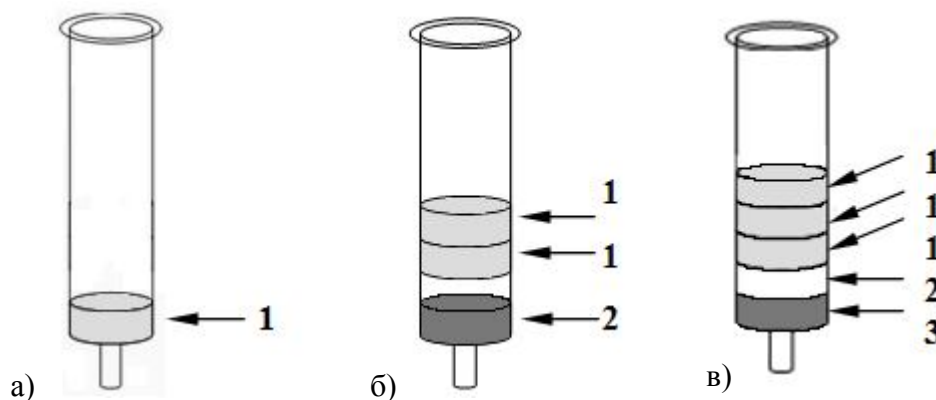


Рис. 2. Схема тест-колоннок для определения: а) индивидуального аналита; б) двух аналитов с контролем ложноположительных результатов (контрольный отрицательный слой); в) трех аналитов с контролем ложноположительных результатов (контрольный отрицательный слой) и ложноотрицательных результатов (контрольный положительный слой). 1 – детектирующий слой; 2 – контрольный отрицательный слой; 3 – контрольный положительный слой.

В работе синтезированы конъюгаты: 2,4,6-тринитробензолсульфоной кислоты (ТНБС)<sup>1</sup> с пероксидазой хрена (ПХ) (ТНБ-ПХ), микофеноловой кислоты с ПХ (МФК-ПХ) и 1-бензо(а)пиренбутановой кислоты с ПХ (БАП-БК-ПХ). В качестве носителя для антител (геля) использовалась сефароза 4В с цианогруппами, а так же наночастицы силикагеля (НС). Связывание антител осуществляли ковалентно, в ряде случаев посредством использования вторичных антител.

Для полуколичественной оценки результатов проводили сканирование детектирующих и контрольных слоев с использованием сканера и последующим определением значения параметров различных цветовых моделей в графическом редакторе Adobe Photoshop CS3. Было показано, что параметр насыщенности цвета  $S$  (цветовая модель HSB) является наиболее чувствительным для разрабатываемых систем с ферментативным окрашиванием (при использовании ПХ и субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина). Значения  $S < 8$  соответствуют белому цвету,  $S \geq 8$  голубому.

<sup>1</sup> АфВ2 - афлатоксин В2; 4-АДНТ-ГА - 4-амино-2,6-динитротолуол-глутаровый альдегид; 4-АДНТ-ГА-СТИ – конъюгат 4-амино-2,6-динитротолуол-глутаровый альдегид с соевым трипсиновым ингибитором; 4-АДНТ-ГА-ПХ – конъюгат 4-амино-2,6-динитротолуол-глутаровый альдегида с пероксидазой хрена; Ант - антрацен, БСА – бычий сывороточный альбумин; БАП – бензо(а)пирен; БАА - бенз(а)антрацен; ВЭЖХ-Фл - высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием; ЗЕА – зеараленон; ЗЕА-ПХ – конъюгат зеараленона с пероксидазой хрена; МФК – микофеноловая кислота; МФК-ПХ – конъюгат микофеноловой кислоты с пероксидазой хрена; НС – наночастицы силикагеля; НС-IgG – наночастицы силикагеля ковалентно связанные с иммуноглобулинами IgG; ОВА – овальбумин; ОТА – охратоксин А; ОТА-ПХ – конъюгат охратоксина А с пероксидазой хрена; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ПХ – пероксидаза хрена; Пир – пирен; СТИ - соевый трипсиновый ингибитор; Т2 - Т-2 токсин; Т2-ПХ – конъюгат Т-2 токсина с пероксидазой хрена; ТНТ - 2,4,6-тринитротолуол; ТНБС – 2,4,6-тринитробензолсульфоная кислота; ТНБ-ПХ – конъюгат 2,4,6-тринитробензолсульфоной кислоты с пероксидазой хрена; ЦИТ – цитринин; ЦИТ-ПХ – конъюгат цитринина с пероксидазой хрена.

### Глава 3. Определение охратоксина А в образцах пива<sup>2</sup>

В данной главе описана разработка тест-метода для внелабораторного скрининга охратоксина А (ОТА) в образцах пива на основе визуального детектирования. Метод объединил в себе концентрирование определяемого вещества и его определение. Поскольку аналитическим сигналом для определения ОТА в пробе служило изменение окраски детектирующего слоя, которую фиксировали визуально, то задачей оптимизации условий явилось получение четкой разницы в окраске между положительным (отсутствие окраски) и отрицательным (развитие окраски за время детектирования) результатами при необходимом значении предела обнаружения (PrO). На значение PrO влияет, прежде всего, концентрация специфических антител, при увеличении которой PrO увеличивается, а при снижении, наоборот, уменьшается. На интенсивность окраски и время ее развития влияет в значительной степени концентрация конъюгата гаптена с ферментом, в качестве которого использовали ПХ. Увеличение концентрации конъюгата приводит к возрастанию интенсивности окраски и сокращению времени ее развития. При фиксированной концентрации антител и конъюгата интенсивность окраски находится в обратной зависимости от содержания определяемого вещества, так как молекулы конъюгата связываются с оставшимися свободными антителами.

Также варьируемыми параметрами являлись объем пробы, ее разбавление и способ очистки. Выбраны оптимальные условия определения ОТА в пиве: концентрация специфических антител - 1,6 мкг/мл; конъюгата ОТА-ПХ - 5 мкг/мл; объем пропускаемой пробы 12 мл и разбавление 1:1 (об.) фосфатно-солевым буферным раствором (0,05 М) в присутствии 1% полиэтиленгликоля. Для анализа использована последовательность действий, приведенная в табл. 1.

Таблица 1

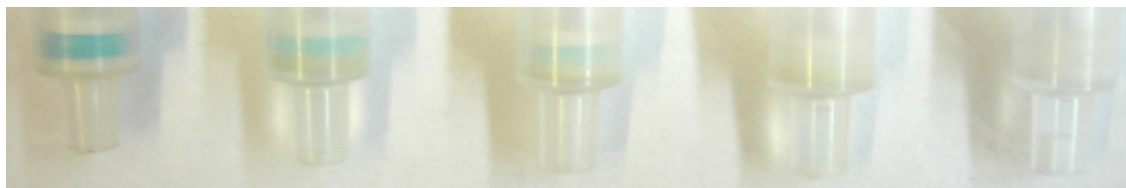
Последовательность проведения анализа при использовании тест-колонки с одним детектирующим слоем

№		V, мл	Направление движения по колонке	Примечание
1	Внесение образца в колонку	24	Сверху вниз	12мл аликвоты + 12мл ФСБ + 1% ПЭГ
2	Промывка	3	Снизу вниз	ФСБ + 0,05 % Твин-20
3	Внесение конъюгата	0,05	Снизу вверх и задержать в объеме	Раствор конъюгата
4	Промывка	18	Сверху вниз	ФСБ + 0,05 % Твин-20
5	Внесение субстрата	0,1	Сверху вниз задержать в объеме на 30 сек.	Субстрат

<sup>2</sup> Автор выражает благодарность Prof. Sarah De Saeger (университет г. Гент, Бельгия) за предоставленные реагенты.



С целью определения предела обнаружения разрабатываемого тест-метода было изучено развитие окраски для серии образцов пива, содержащего различный уровень ОТА, результаты представлены на рис. 3.



С (ОТА): 0                                    0,05                                    0,1                                    0,15                                    0,2 мкг/л

Рис. 3. Детектирующий иммунослой тест-колонки после проведения анализа серии образцов пива, искусственно загрязненных ОТА.

В оптимизированных условиях ПрО тест-метода составил 0,2 мкг/л в соответствии с максимально допустимым уровнем ОТА в пиве, рекомендованным ЕС. Был проведен анализ 33 сортов пива отечественных и зарубежных производителей. Анализ каждого образца проводили трем независимым тестам. Для контроля возможного матричного эффекта и ложноотрицательных результатов в порцию образца вводили добавку ОТА на уровне 0,2 мкг/л. Показано полное отсутствие ложноотрицательных результатов. Для подтверждения полученных результатов часть образцов проанализированы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-Фл) с предварительным концентрированием с помощью иммуноаффинной колонки. Полученные результаты представлены в табл. 2. Из приведенных данных видно, что результаты определения ОТА в образцах пива, полученные с помощью тест-метода, хорошо коррелируют с данными ВЭЖХ-Фл.

Таблица 2

Содержание охратоксина А в образцах пива

Пиво	Иммунохимический тест-метод		ВЭЖХ-Фл мкг/л
	ОТА 0 мкг/мл	ОТА 0,2 мкг/мл	
Delhaize	- -±	+++	0,01
Corona	- - -	+++	0
Sara	- - -	+++	0,12
Saxo	+++	+++	0,49

(-) – отрицательный результат – развитие синей окраски детектирующего иммунослоя, концентрация ОТА < 0,2 мкг/л;

(±) - отрицательный результат – развитие малоинтенсивной синей окраски детектирующего иммунослоя, концентрация ОТА < 0,2 мкг/л;

(+) – положительный результат – отсутствие окраски детектирующего иммунослоя, концентрация ОТА > 0, 2 мкг/л.

Расчитанные в соответствии с рекомендациями ЕС аналитические характеристики качественного тест-метода приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Количество полученных положительных и отрицательных результатов определения ОТА в образцах пива с помощью колонки

	ОТА < 0,2 мкг/л	ОТА ≥ 0,2 мкг/л	Всего
Положительный результат	1 (N <sub>ложноположит</sub> )	15 (N <sub>положит</sub> )	16
Отрицательный результат	8 (N <sub>отриц</sub> )	0 (N <sub>ложноотриц</sub> )	8
Всего	9 (N <sub>-</sub> )	15 (N <sub>+</sub> )	24 (N)

Таблица 4

Рассчитанные аналитические характеристики качественного тест-метода определения ОТА в образцах пива (контрольный уровень ОТА 0,2 мкг/л)

Характеристика	Формула для расчета	Значение %
Процент ложноположит. результатов	$(N_{\text{ложноположит}} / N_{-}) \cdot 100 \%$	0
Процент ложноотриц. результатов	$(N_{\text{ложноотриц}} / N_{+}) \cdot 100 \%$	6,3
Правильность	$[(N_{\text{положит}} + N_{\text{отриц}}) / N] \cdot 100 \%$	95,8
Специфичность	$(N_{\text{отриц}} / N_{-}) \cdot 100 \%$	100
Чувствительность	$(N_{\text{положит}} / N_{+}) \cdot 100 \%$	94,0

Данные табл. 4 показывают, что полученные аналитические характеристики удовлетворяют требованиям, которые предъявляются к качественному тест-методу. Рассчитанные значения правильности составляют 95,8 %, чувствительность 94 % и процент ложноотрицательных результатов < 5 %, что дает возможность сделать вывод о применимости данного метода.

#### Глава 4. Получение иммунореагентов и оптимизация тест-метода определения 2,4,6-тринитротолуола <sup>3</sup>

Антитела являются одними из ключевых реагентов для разработки любого иммуноанализа. В рамках настоящей работы получены иммунореагенты для определения 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ). Для получения поликлональных куриных антител, специфичных к ТНТ, использовали иммуногены разной структуры: 4-амино-2,6-динитротолуол-глутаровый альдегид с белком (4-АДНТ-ГА-белок), 2,4,6-тринитробензол с белком (ТНБ-белок). В качестве белка-носителя использовали соевый трипсиновый ингибитор (СТИ), бычий сывороточный альбумин (БСА) и овальбумин (ОВА). Первичную иммунизацию кур проводили с помощью полного адъюванта Фрейнда, повторную реализовывали через 40 дней неполным адъювантом Фрейнда. Три курицы иммунизировали каждым конъюгатом и три использовали для контроля. Сбор яиц, выделение и очистку

<sup>3</sup> Автор выражает благодарность Prof. Bruno De Meulenaer (университет г. Гент, Бельгия) за возможность проведения работы и предоставленные реагенты.

антител из желтков проводили каждую неделю. Для контроля связывания антител с антигенами использовали непрямой твердофазный ИФА.

Для исследования влияния структуры иммунореагентов на характеристики анализа изучены различные комбинации гетерологичных пар (анти-ТНБ-БСА антитела и 4-АДНТ-ГА-ПХ; анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела и ТНБ-ПХ) и гомологичных пар (анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела и 4-АДНТ-ГА-ПХ; анти-ТНБ-БСА антитела и ТНБ-ПХ) и найдены оптимальные концентрации иммунореагентов.

Для объективной оценки получаемого аналитического сигнала было необходимо развить подход к количественной интерпретации результатов. В связи с этим разработана новая методика полуколичественного определения аналитов, основанная на использовании планшетного сканера для считывания интенсивности окраски иммунослоя, находящегося внутри картриджа, с последующим применением программного обеспечения. Использование такого представления результатов позволяет сравнивать селективность и чувствительность определений.

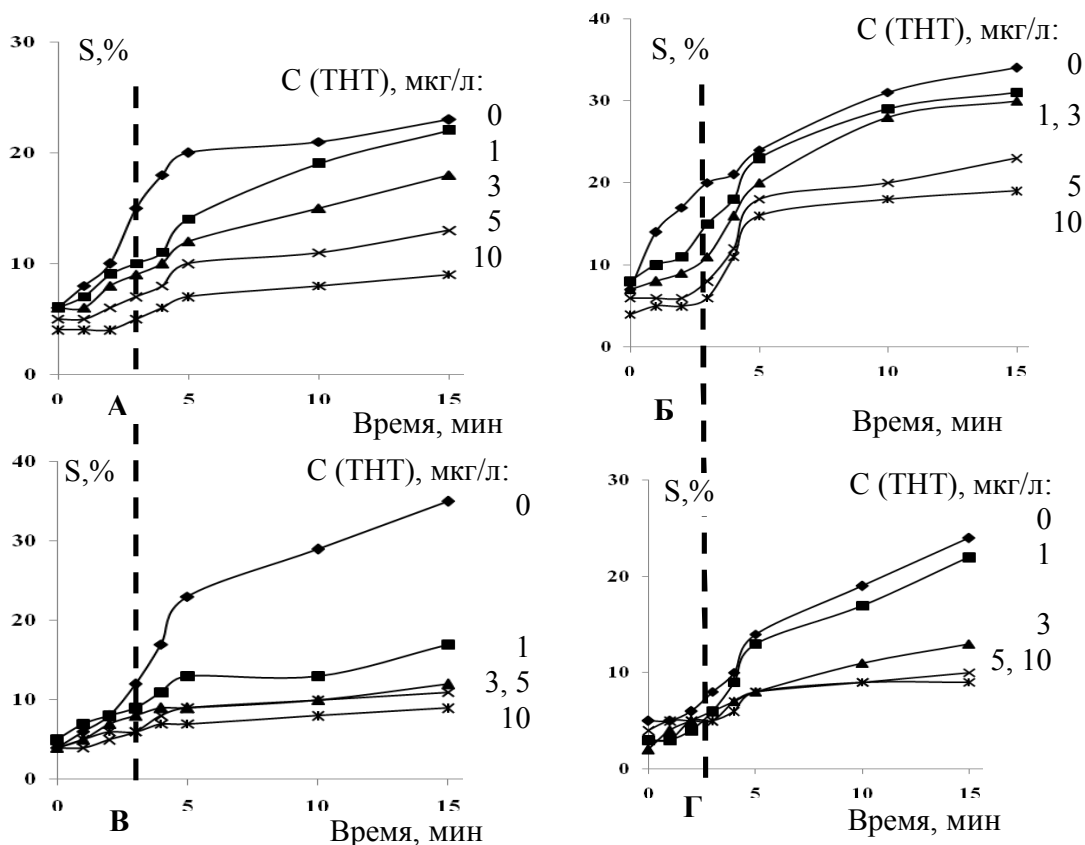


Рис. 4. Зависимость параметра насыщенности цвета (S) от времени развития окраски для серии различных концентраций ТНТ со следующими парами иммунореагентов:

- А – анти-ТНБ-БСА антитела и 4-АДНТ-ГА-ПХ;
- Б – анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела и 4-АДНТ-ГА-ПХ;
- В – анти-ТНБ-БСА антитела и ТНБ-ПХ;
- Г – анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела и ТНБ-ПХ.

Из данных рис. 4 видно, что оптимальной является гомологичная пара анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела и конъюгат 4-АДНТ-ГА-ПХ; гетерологичной - анти-ТНБ-БСА антитела и конъюгат 4-АДНТ-ГА-ПХ. В оптимизированных условиях для обеих выбранных пар иммунореагентов предел обнаружения составляет 5 мкг/л, время детектирования - три минуты (рис. 4).

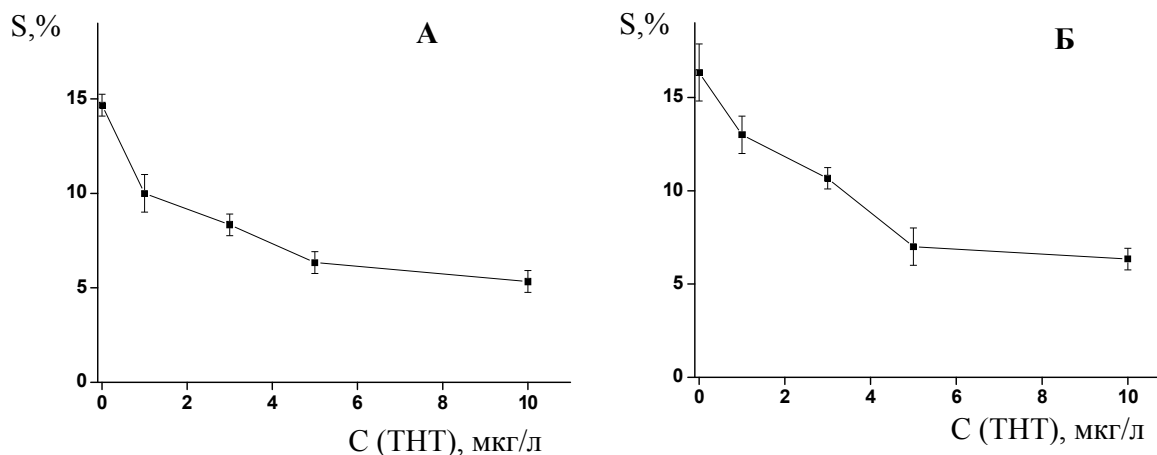


Рис. 5. Значения параметра насыщенности цвета (S) при определении ТНТ с помощью 4-АДНТ-ГА-ПХ. Время детектирования - 3 минуты.

А - анти-ТНБ-БСА антитела,  $n=3$ ;

Б - анти-4-АДНТ-ГА-СТИ антитела,  $n=3$ .

Для оценки специфичности теста изучена зависимость кинетики развития окраски от концентрации структурно близких веществ (ТНТ, толуол, а также для гаптенных, использованных при синтезе конъюгатов, 4-АДНТ, 2-АДНТ, ТНБС) (рис. 6). Как видно из рис. 5, в течение времени детектирования (3 мин) развитие окраски в случае ТНТ не наблюдается (кривая 6). Толуол мешающего влияния не оказывает. Следует упомянуть, что 2-АДНТ и 4-АДНТ также являются метаболитами ТНТ и могут присутствовать в природных объектах. Таким образом, тест позволяет оценивать только суммарное содержание ТНТ и этих соединений.

Для оценки влияния матрицы образца осуществляли сравнение градуировочных кривых определения ТНТ, полученных для модельных растворов, с кривыми испытуемых образцов воды. Полученные данные представлены на рис. 7. Из рисунка видно, что при загрязнении образцов воды на уровне 5 мкг/л окраска не развивалась, что свидетельствует о незначительном матричном эффекте образца.

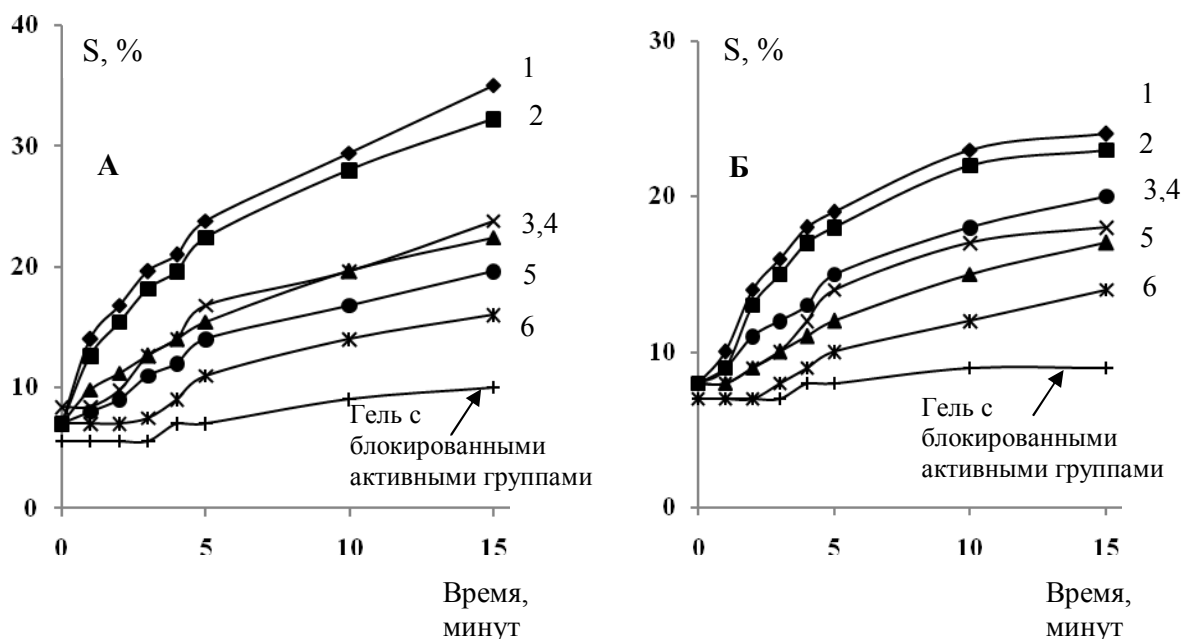


Рис. 6. Зависимость параметра насыщенности цвета (S) от времени развития окраски детектирующего иммунослоя при определении различных структурно – родственных ТНТ соединений ( $C = 5$  мкг/л): 1- холостой раствор; 2 – толуол; 3 – 4-АДНТ; 4 – 2-АДНТ; 5 – ТНБС; 6 – ТНТ.

А – гель, связанный с анти – ТНБ-БСА антителами;

Б – гель, связанный с анти – 4-АДНТ-ГА-СТИ антителами.

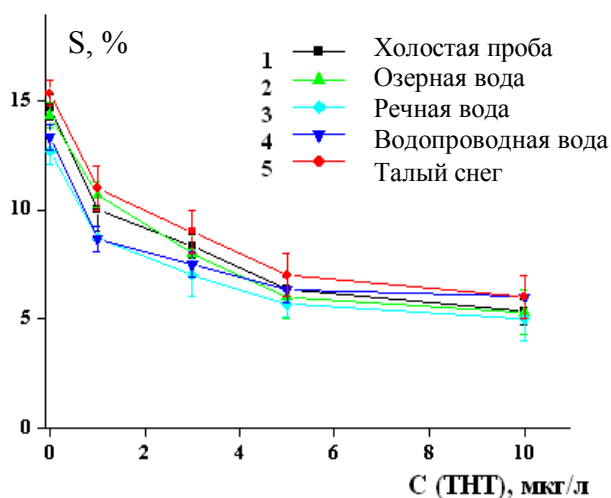


Рис. 7. Результат определения ТНТ в различных образцах воды с использованием анти-ТНБ-БСА антител и 4-АДНТ-ГА-ПХ,  $n = 3$ .

## Глава 5. Иммунохимический тест для одновременного определения зеараленона и Т-2 токсина<sup>4</sup>

Микотоксины продуцируются многими видами микроскопических грибов, одними из которых являются грибки рода *Fusarium*, способные продуцировать группу микотоксинов в продуктах растительного происхождения. В связи с этим особый интерес представляет разработка

<sup>4</sup> Автор выражает благодарность Prof. Erwin Märtilbauer (университет Людвиг-Максимилиана г. Мюнхен, Германия) за предоставленные реагенты.

методик одновременного детектирования Т-2 токсина (Т2) и зеараленона (ЗЕА).

Важным шагом разработки одновременного детектирования микотоксинов являлась оптимизация условий определения индивидуальных аналитов. Для достижения этой цели определение оптимальных концентраций иммунореагентов проводили аналогично «шахматному титрованию». Для контроля чувствительности детектирующего слоя использование две одинаковые тест-колоноки. Через колонки пропускали модельный раствор в отсутствие и присутствии ЗЕА и Т2 на уровне 10 мкг/л. Затем детектирующие слои группировали в одну тест-колоноку и проводили дополнительный тест на совместное определение.

Для установления предела обнаружения разрабатываемого тест-метода было изучено развитие окраски для серии образцов пшеницы, содержащей разные уровни ЗЕА и Т2, результаты представлены на рис. 8. Из рисунка видно, что для данной системы достигнут контрольный уровень 75 мкг/кг ( $S < 8$ ), что соответствует максимально допустимому уровню, рекомендуемому ЕС (100 мкг/кг) и отечественному законодательству (максимально допустимое содержание 1 и 0,1 мг/кг для ЗЕА и Т2, соответственно).

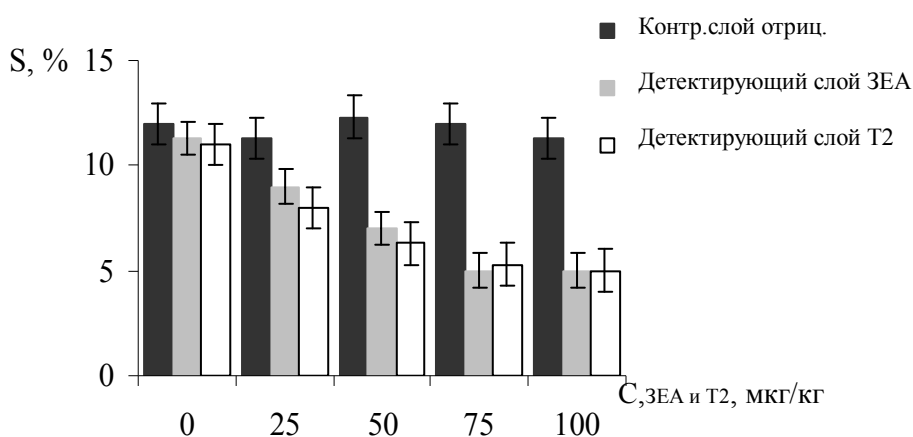


Рис. 8. Значения параметра насыщенности цвета (S) контрольного слоя, ЗЕА и Т2 детектирующих слоев для загрязненных образцов пшеницы. Время детектирования – 4 минуты.

Применение тест-методов связано с возможным появлением ложноположительных результатов и неверной интерпретацией результатов наблюдателями. Для устранения этих недостатков нами предложено использование контрольного отрицательного слоя, который также показывает работоспособность теста и представляет собой гель с привитыми антителами специфическими к ферменту ПХ. В связи с этим определена оптимальная техническая конструкция тест-устройства, которая позволяет осуществлять детектирование аналитов и включала контрольный слой (рис. 2б).

Проанализировано семь образцов комбикормов и один образец пшеницы, которые содержали ЗЕА и Т2 с концентрацией ниже 75 мкг/кг (по результатам жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектором (ЖХ-МС/МС)). Для предотвращения ложноотрицательных результатов, связанных с матрицей образца, каждый образец анализировали также с введенными добавками ЗЕА и Т2 на уровне 100 мкг/кг. Результаты исследований представлены на рис. 10. Из рисунка

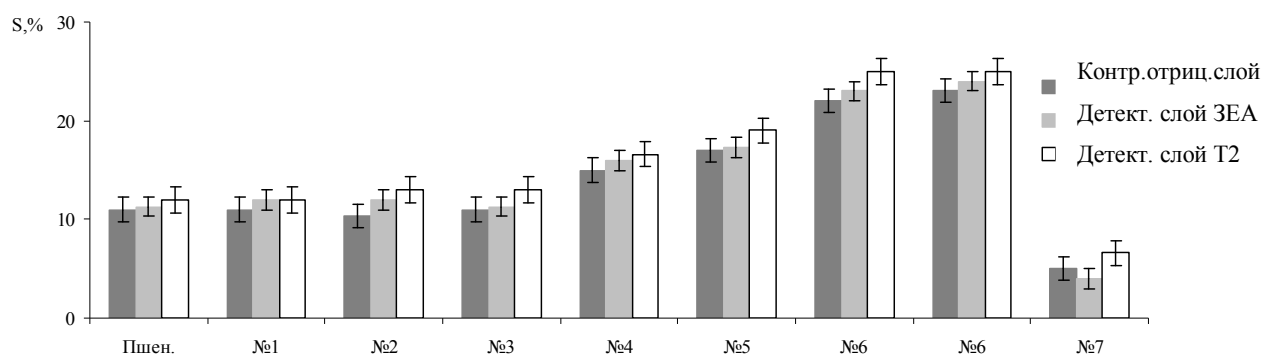
видно, что в пределах времени детектирования голубая окраска развивалась для контрольного отрицательного слоя и не развивалась для детектирующих слоев (рис. 10 б) Однако для образца № 7 результаты загрязненной пробы были такими же, как и незагрязненной, а именно развитие окраски не наблюдалось. Отсутствие окраски для контрольного слоя позволяет сделать вывод о наличии матричного эффекта и неприменимости теста для анализа данного образца. Таким образом, окраска контрольного отрицательного слоя не зависит от присутствия / отсутствия аналита, позволяет облегчить интерпретацию результатов и судить о влиянии матрицы образца или о не рабочем состоянии теста. Результаты исследований пшеницы и кормов представлены на рис. 9.



Рис. 9. Результаты анализа образца пшеницы. Время детектирования - 4 минуты.

**а** – незагрязненный образец,

**б** – загрязненный образец (100 мкг/кг Т2 и 100 мкг/кг ЗЕА).



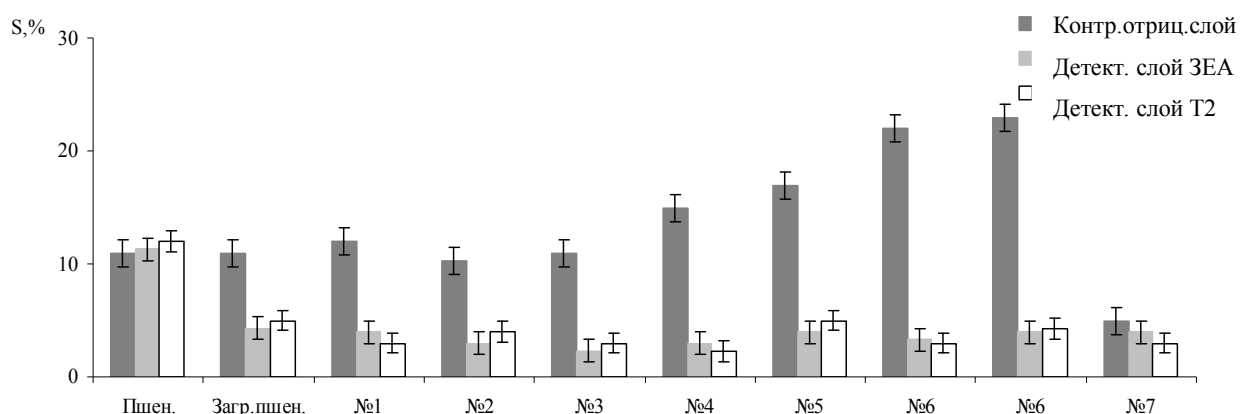


Рис. 10. Зависимость параметра насыщенности цвета (S) контрольного отрицательного слоя, детектирующего слоя ЗЕА и детектирующего слоя T2 для незагрязненных образцов пшеницы и кормов (а) и для образцов содержащих ЗЕА и T2 на уровне 100 мкг/кг (б). Время детектирования - 4 минуты,  $n=3$ .

## Глава 6. Сравнительная характеристика иммунохимических методик определения цитринина, охратоксина А и микофеноловой кислоты в сыре<sup>5</sup>

Представляло интерес сопоставить чувствительность разрабатываемого тест-метода и традиционного конкурентного ИФА. Это сделано на примере определения цитринина (ЦИТ), ОТА и микофеноловой кислоты (МФК) в образцах сыра.

Разработка методики иммунохимического определения ЦИТ, ОТА и МФК включала в себя несколько этапов: получение конъюгатов аналит-фермент, оптимизацию условий проведения определения методом твердофазного ИФА и неинструментальным тест-методом, приготовление тест-устройства.

В связи с тем, что сыр представляет собой многокомпонентный образец, насыщенный белками, жирами и т.д., для определения микотоксинов в нем предварительно оптимизирован способ их извлечения. В качестве оптимального выбран метод, который заключался в экстракции аналитов смесью метанол/вода 70:30 (об. %) в соотношении образец/экстрагент (1:5). Образцы сыра экстрагировали, центрифугировали (10 мин., 10000 об/мин), экстракт шестикратно разбавляли. Чтобы оценить возможность применения данной методики для контроля микотоксинов в реальных образцах сыра был проведен тест на открытие ЦИТ, ОТА и МФК в пробах. Для этого использовали образцы сыра, для которых достоверно известно, что не содержат искомым соединений. Процент открытия исследуемых соединений в сыре достаточно высок и составляет 85, 97 и 92 (%) для ЦИТ, ОТА и МФК, соответственно.

<sup>5</sup> Автор выражает благодарность Prof. Erwin Märklbauer (университет Людвиг-Максимилиана г. Мюнхен, Германия) за возможность проведения работы и предоставленные реагенты.



Для контроля влияния матрицы пробы проводили анализ серии образцов сыра, искусственно загрязненных различной концентрацией ЦИТ, ОТА и МФК. С целью предотвращения ложноотрицательных результатов в тест-устройство введен слой блокированного геля без антител – положительный контрольный слой, а для предотвращения ложноположительных результатов – отрицательный контрольный слой (гель с ковалентно-связанными антителами, специфичными к ПХ). Результаты тест-метода представлены на рис. 11. Полученные характеристики разработанных методик сопоставлены в табл.5.

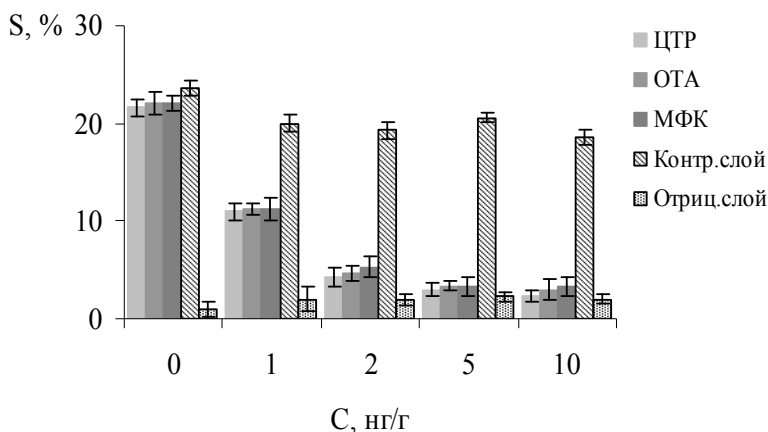


Рис. 11. Определение ЦИР, ОТА и МФК, выполненное с помощью неинструментального тест-метода. Время детектирования - 7 минут,  $n=3$ .

Таблица 5

Пределы обнаружения ИФА и неинструментального тест-метода при проведении анализа сыров\*

Микотоксин	ИФА, нг/г	Неинструментальный тест, нг/г
Цитринин	50	2
Охратоксин А	15	2
Микофеноловая кислота	50	2

\*  $P = 0,95$ ;  $n = 3$

При сравнении аналитических характеристик неинструментального тест-метода и ИФА (табл. 5) следует, что более чувствительным является неинструментальный тест-метод.

## Глава 7. Новые носители для ковалентного связывания с биомолекулами<sup>6</sup>

Наряду с использованием известных традиционных иммуносорбентов существует необходимость поиска новых альтернативных носителей для ковалентной пришивки антител. В последние годы широкое применение находят наночастицы различной структуры и состава. Особый интерес представляют наночастицы силикагеля  $\text{SiO}_2$  (НС), которые успешно

<sup>4</sup> Автор выражает благодарность Prof. Dietmar Knorr (Технический университет Мюнхена, г. Мюнхен) Германия, за возможность проведения работы и предоставленные реагенты.

применяют в классических вариантах иммуноанализа, однако не было описано их применение в тест-методах. НС синтезированы по описанной в литературе методике. Активацию и связывание НС с биомолекулами, а именно с иммуноглобулинами IgG (НС-IgG) осуществляли посредством  $\gamma$ -глицидоксипропилтриметоксисилана. В качестве модельного анализата использовали бензо(а)пирен (БАП). Показано, что оптимальное связывание с НС наблюдается при концентрации IgG 40 мкг/мл в течение 12 ч при 4 °С. Для разработки нового тест-метода необходимо подобрать подложку для наночастиц. После сравнения четырех видов подложек (полиэтиленовый фрит, фильтровальная бумага, полиэтиленовая мембрана, нейлоновая мембрана) в качестве оптимальной выбраны полиэтиленовый фриты, обладающие низким уровнем неспецифического связывания, воспроизводимыми свойствами и позволяющие получить четко локализованное окрашенное пятно. Полиэтиленовый фрит с диаметром пор 0,2 мкм предварительно блокировали раствором БСА (3 %), затем сорбировали НС с ковалентно связанными IgG. Далее добавляли раствор специфических антител и высушивали при 37 °С. Полученный фрит с нанесенными иммунореагентами вносили в пластиковую колонку. Для установления предела обнаружения изучено развитие окраски пятна на фрите для серии модельных растворов, результаты представлены на рис. 12.

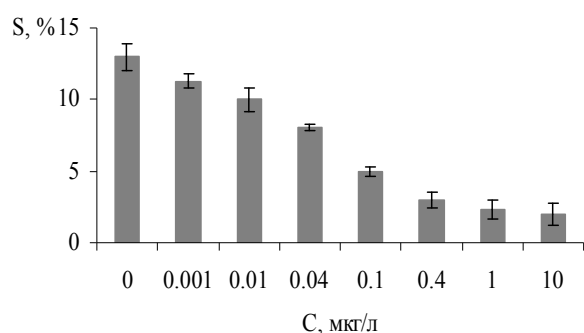


Рис. 12. Зависимость параметра насыщенности цвета (S) от концентрации БАП в модельном растворе,  $n=3$ .

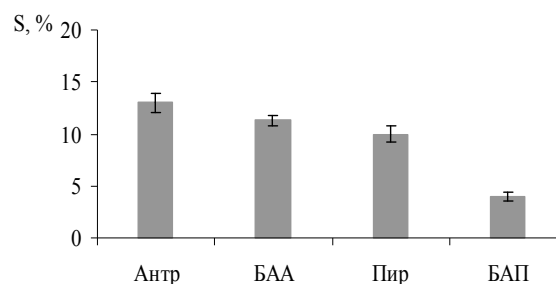


Рис. 13. Зависимость параметра насыщенности цвета (S) от типа определяемого ПАУ анализируемых в модельных растворах, С (ПАУ) = 0,1 мкг/л,  $n=3$ .

Показано, что для данной системы в модельных растворах достигнут  $PrO$  0,1 мкг/л. Для оценки селективности определения БАП изучено влияние других полиароматических углеводородов (ПАУ): антрацен (Ант), бенз(а)антрацен (БАА), пирен (Пир) на развитие окраски детектирующего пятна рис. 13. Показано, что все выше перечисленные ПАУ не мешают определению БАП той же концентрации.

Одной из последних тенденций нанотехнологий является разработка наноматериалов, в частности новых нанометок для биомолекул с последующим применением в иммуноанализе. Так получены наночастицы оксида железа (III), покрытые наночастицами золота, которые использовали в качестве меток в иммунохроматографическом тесте для определения афлатоксина В2 (АфВ2) в образцах красного перца. На рис. 14 представлена

схема синтеза наночастиц и конструкция тест-устройства. Показано, что ПрО теста составляет 0,9 нг/мл, что ниже, чем для аналогичного теста при использовании традиционных золотых наночастиц (ПрО 3 нг/мл) (рис. 15).

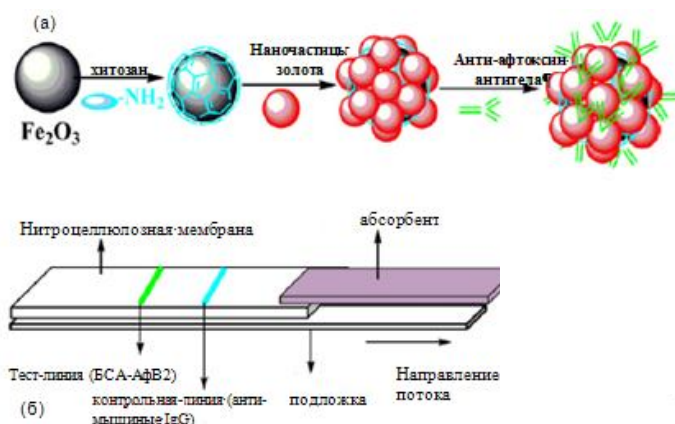


Рис. 14 Иммунохроматографический тест для определения афлатоксина В2. (а) Синтез наночастиц; (б) Устройство иммунохроматографического теста.

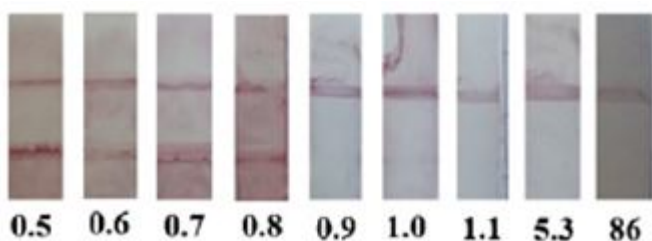


Рис. 15. Определение афлатоксина В2 серии искусственно загрязненных образцов перца с использованием иммунохроматографического теста.

Таким образом, использование наночастиц позволяет улучшить аналитические характеристики иммунохимических тест-методов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы к созданию и оптимизации иммунохимических тест-методов для одновременного определения следовых количеств токсикантов в различных матрицах. Осуществлен выбор оптимальных параметров аналитических систем для качественного определения как индивидуальных, так и нескольких соединений с помощью тест-систем и иммуноферментного анализа (ИФА).
2. Разработана тест-система для индивидуального определения микотоксинов; показана её применимость для определения охратоксина А в различных образцах пива с контрольным уровнем 0,2 мкг/л в соответствии с максимально допустимым уровнем, рекомендованным ЕС. Оптимизирована методика экстракции и пробоподготовка образца. Результаты разработанного тест-метода хорошо коррелируют с результатами, полученными методом ВЭЖХ-Фл.
3. Получены, выделены и протестированы поликлональные куриные антитела, специфичные к 2,4,6-тринитротолуолу. Установлено, что наибольшей аффинностью обладают антитела, полученные при

использовании в качестве иммуногенов конъюгатов 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты с бычьим сывороточным альбумином и 4-амино-2,6-динитротолуол-глутаровый альдегид с соевым трипсиновым ингибитором. Найдены оптимальные гомологичная и гетерологичная пары. Разработан и оптимизирован иммуноферментный колоночный тест-метод определения 2,4,6-тринитротолуола в водных объектах с пределом обнаружения 5 мкг/л.

4. Развита методика контроля ложноположительных результатов путем введения в тест-устройство дополнительного слоя (отрицательный контроль); данный подход апробирован на тест-системе для одновременного определения зеараленона и Т-2 токсина в кормах для животных с пределом обнаружения 100 мкг/кг.

5. Проведена сравнительная оценка эффективности детектирования микотоксинов с помощью тест-системы и прямого конкурентного ИФА. Показано, что неинструментальный тест-метод (ПрО 2 нг/г) является более чувствительным, чем ИФА (ПрО 15, 50 и 50 нг/г для охратоксина А, цитринина и микофеноловой кислоты, соответственно). Разработаны и оптимизированы условия одновременного тест-определения трех аналитов на примере микотоксинов цитринина, охратоксина А и микофеноловой кислоты в сырах с двумя контрольными слоями (положительный и отрицательный контроль). Оптимизирована методика экстракции сыров для одновременного определения трех микотоксинов.

6. Получен новый иммуносорбент на основе наночастиц силикагеля, изучены и установлены оптимальные условия связывания антител, разработаны и сконструированы новые тест-методы определения токсикантов (на примере бензо(а)пирена) в образцах воды (ПрО 0,1 мкг/л). Получены наночастицы оксида железа (III) покрытые золотыми наночастицами. На их основе разработан иммунохроматографический тест-метод определения афлатоксина В<sub>2</sub> в образцах красного перца с пределом обнаружения 0,9 нг/мл.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Goryacheva I.Yu., Basova E.Yu., Van Peteghem C., Eremin S.A., Pussemier L., Motte J.-C., De Saeger S. Novel gel-based rapid test for non-instrumental detection of ochratoxin A in beer // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 390. P. 723-727.
2. Burmistrova N.A., Goryacheva I.Yu., Basova E.Yu., Franki A.S., Elewaut D., Van Beneden K., Deforce D., Van Peteghem C., De Saeger S. Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. Vol. 395. P. 1301-1307.
3. Tang D, Saucedo J.C., Ott S., Basova E., Goryacheva I., Biselli S., Niessner R., Knopp D. Magnetic nanogold microspheres-based lateral flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B<sub>2</sub> in food // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Vol. 25. P. 514-518.

4. Basova E.Yu., Goryacheva I.Yu., Mikhirev D.A., Rusanova T.Yu., Burmistrova N.A., Kerkaert B., Cucu T., De Saeger S., De Meulenaer B. Rapid method for qualitative detection of 2,4, 6-trinitrotoluene in environmental water samples // *Anal. Methods*. 2009. Vol. 1. P. 170-176.
5. Basova E.Yu., Goryacheva I.Yu., Burmistrova N.A., Rusanova T.Yu., Dietrich R., Maertlbauer E., Detavernier C., Van Peteghem C., De Saeger S. An immunochemical test for rapid screening of zearalenone and T-2 toxin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 397. P. 55–62.
6. Горячева И.Ю., Белоглазова Н.В., Басова Е.Ю., Карагушева М.А., Русанова Т.Ю. Тест-система для иммуноферментного определения токсикантов. *Патент на изобретение* № 2374649. Дата приоритета 04.05.2008.
7. Басова Е.Ю., Бурмистрова Н.А., Горячева И.Ю. Разработка иммунохимического тест-метода для определения охратоксина А в пиве // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Межвуз. сборник научных трудов. Изд-во «Научная книга», Саратов, 2007. С. 170-173.*
8. Карагушева М.А., Басова Е.Ю., Горячева И.Ю. Разработка иммунохимических тест-методов для определения микотоксинов в продуктах питания // *Изв. Сар-та. Ун-та.2008. Т.8. Сер. Химия. Биология. Экология. № 1. С. 39-42.*
9. Басова Е.Ю. Разработка тест-метода для определения микотоксинов в продуктах питания // *Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme “Michail Lomonosov II” und Immanuel Kant II” 2008/2009. 15-16 April 2009. Moscow. P. 16-19.*
10. Горячева И.Ю., Русанова Т.Ю., Басова Е.Ю. Юрасов Н.А. Новые тест-системы для контроля содержания микотоксинов в продуктах растительного происхождения // *Материалы IV Всероссийской конференции “Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул, 2009. Книга 2. С. 138-139.*
11. Басова Е.Ю. Мультианализ микотоксинов в образцах сыра неинструментальным тестом // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Межвуз. сборник научных трудов. Изд-во «Научная книга», Саратов, 2010. С. 195-197.*
12. Goryacheva I.Yu., Karagusheva M.A., Basova E.Yu., De Saeger S., Lobeau M., Van Petegem C. Gel-based non-instrumental immunoassay for mycotoxin detection // *International Mendeleev Congress. 21-26 September 2007. Moscow. Book of abstract P. 23.*
13. Басова Е.Ю. Разработка неинструментального тест-метода для определения охратоксина А в образцах пива // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». 12-15 апреля. 2007. Москва. С.10.*
14. Басова Е.Ю., Бурмистрова Н.А., Горячева И.Ю. Иммунохимический метод для определения охратоксина А в продуктах питания //

- Материалы Всероссийской конференции «Химический анализ». Апрель 21-25. 2008. Москва. Россия. С. 79-80.
15. Васина Л.А., Басова Е.Ю., Горячева И.Ю. Иммунохимический тест-метод для определения Т-2 токсина в зерне // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». 8-11 апреля. 2008. Москва. С.19.
  16. Голованова Т.В., Басова Е.Ю. Иммунохимическое определение охратоксина А в кормах // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». 8-11 апреля. 2008. Москва. С. 25.
  17. Basova E. Yu., Goryacheva I. Yu., De Saeger S. Simultaneous non-instrumental detection of T-2 toxin and zearalenone using a clean-up tandem immunoassay column // International Society for Mycotoxicology «ISM Conference 2009» September 9-11, 2009. Tulln. Austria. Book of abstract P. 158.
  18. Басова Е.Ю., Горячева И.Ю.. Иммунохимический метод определения микотоксинов в кормах // III Всероссийская конференция «Аналитика России». Сентябрь 27 – 3 Октябрь. 2009. Туапсе. Россия. С. 71.
  19. Басова Е.Ю. Видяшев С.С., Потапкина Д.А., Болатова А.Г. Быстрые методы определения токсинов // Всероссийская молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций. 27-28 Октябрь. 2009. Саратов. Россия. С. 102.
  20. Басова Е.Ю. Иммунохимический тест для быстрого скрининга зearаленона и Т-2 токсина в образцах корма // XVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009». 13-18 апреля. 2010. Москва. С. 11.
  21. Басова Е.Ю. Неинструментальный колоночный тест для одновременного детектирования цитринина, охратоксина А и микофеноловой кислоты в образцах сыра // XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010». 12-16 апреля. 2010. Москва. С. 11.