

УДК 543.9

ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫЙ СЕНСОР НА ХЛОРАМФЕНИКОЛ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОСИНТЕЗИРОВАННОЙ ПОЛИАНИЛИНОВОЙ ПЛАТФОРМЫ

Карасева Н.А.

ФГБОУ ВПО «Липецкий государственный технический университет», Липецк, Россия (398600, г. Липецк, ул. Московская, 30), e-mail: karaseva_nadia@mail.ru

Разработан пьезокварцевый иммуносенсор для высокочувствительного определения хлорамфеникола (ХАФ) в конкурентном формате анализа. Формирование рецепторного слоя сенсора проводили в три этапа: получение полимерной подложки, активация поверхности глутаровым альдегидом и ковалентное закрепление конъюгата хлорамфеникола с белковой молекулой. Электрогенерирование подложки на основе полианилина осуществлялось в потенциодинамическом режиме с линейной и циклической разверткой потенциала в диапазоне $-0,2 \div +1,4$ В со скоростью 10 мВ/с. Методом Скетчарда установлены константы скорости образования и разрушения иммунокомплекса, константа аффинности антител. Показано, что рецепторное покрытие сенсора характеризуется высокой аффинностью и устойчивостью при длительной эксплуатации в жидкости, минимальной массой. Разработанный сенсор апробирован при определении хлорамфеникола в мясе, молоке, яйцах и меде.

Ключевые слова: пьезокварцевый иммуносенсор, хлорамфеникол, полианилиновое покрытие.

THE PIEZOELECTRIC SENSOR FOR THE CHLORAMPHENICOL DETECTION ON THE BASE OF ELECTROGENERATED POLYANILINE PLATFORM

Karaseva N.A.

Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russia (398600, Lipetsk, street Moskovskaya, 30), e-mail: karaseva_nadia@mail.ru

The piezoelectric sensor for highly sensitive detection of chloramphenicol in competitive format of analysis was developed. The processes of the preparation of immunoaffinity coating included three stages: formation of polymeric film, activation by glutaraldehyde and covalent binding of hapten-protein conjugate. The electro-synthesis of the polyaniline applied as a substrate is carried out in the potentiodynamic mode with linear and cyclic potential sweep in the range between -0.2 and $+1.4$ V at the scan rate of 10 mV/sec. The constants of the destruction rate and of the immunocomplex formation rate and the affinity constant were calculated by the Scatchard method. It was shown that receptor coating is characterized highly affinity, stability during long exploitation in liquid media and minimum mass. The sensor was tested in analyzing samples of meat, milk, eggs and honey.

Keywords: piezoelectric sensor, chloramphenicol, polyaniline coating.

Введение

Применение антибиотиков в ветеринарии требует систематического контроля за содержанием в продуктах животного происхождения. Хлорамфеникол (ХАФ) широко применяется при лечении инфекционных заболеваний крупного рогатого скота и домашней птицы, эффективен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Остаточные количества антибиотика аккумулируются в мясной и молочной продукции, яйцах, что приводит к аллергическим реакциям, нарушению обмена веществ, дисбактериозу, возникновению резистентности у человека. Предельно допустимая концентрация ХАФ в пищевой продукции составляет 0,01 мг/кг [2].

Для определения ХАФ рекомендуются микробиологические и хроматографические методы [3], характеризующиеся продолжительностью, трудоемкостью и многостадийностью.

В качестве скрининговых в настоящее время развиваются иммунохимические тест-методы, методы иммуноферментного анализа [10], основанные на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами. Детектирование антибиотика осуществляется после введения ферментной метки.

Положительно зарекомендовали себя при определении ряда биологически активных соединений пьезокварцевые сенсоры [4; 9]. Высокая чувствительность и воспроизводимость анализа обеспечивается качеством рецепторного слоя на поверхности электрода сенсора. Формирование подложки обычно осуществляется методом самоорганизованных монослоев тиолов или силанов. Растворы реагентов наносят на электрод в виде капли с последующим испарением растворителя. На воспроизводимость свойств покрытий влияет точность дозирования объема, условия высушивания, качества применяемых реагентов. При этом невозможно поэтапно контролировать ход формирования рецепторного покрытия и влиять на его характеристики непосредственно на стадии получения.

Таких недостатков лишен метод электрогенерирования полимерной подложки непосредственно на поверхности золотого электрода сенсора, позволяющий не только наблюдать за ходом процесса в режиме реального времени, но и управлять им путем изменения потенциала и скорости развертки [1; 7; 8]. Таким образом, появляется возможность останавливать процесс синтеза при образовании пленки оптимальной массы и толщины.

Наиболее изучены процессы электрополимеризации анилина, пиррола и тиофена, широко применяющиеся при создании электрохимических сенсоров [2]. Однако требования, предъявляемые к подложкам в электрохимических и пьезокварцевых сенсорах, различны. Так, в пьезокварцевых сенсорах главным условием является постоянство массы полимерной пленки в одном цикле измерений, высокая адгезия к металлической поверхности электрода, однородность слоя и равномерность распределения поверхностных функциональных групп для последующего закрепления биомолекул.

Целью настоящей работы является разработка пьезокварцевого сенсора для определения хлорамфеникола с биорецепторным покрытием на основе электрогенерированного полианилина.

Эксперимент

В работе использовались следующие реактивы: анилин («Вектон», Россия), соляная кислота, серная кислота, азотная кислота, хлорная кислота (ч.д.а., Россия), этиловый спирт (ч.д.а., Россия), ацетон (х.ч., Россия), γ -аминопропилтриэтоксисилан – APTS (Reanal, Венгрия), глутаровый альдегид – GA (Reanal, Венгрия) и иммунореагенты: моноклональные антитела к хлорамфениколу MoAb/CAP, хлорамфеникол-белковый конъюгат (CAP-STI)

(предоставлены Институтом биохимии им. А.Н. Баха).

Электрохимический синтез полианилина проводили на установке, состоящей из потенциостата ПИ-50 1.1, программатора ПР-8 и трехэлектродной ячейки. Рабочим электродом служил золотой пьезокварцевый резонатор АТ-среза с собственной частотой колебаний $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$ с золотыми электродами, полученными магнетронным напылением (ЗАО «ЭТНА», Россия), электродом сравнения – хлоридсеребряный электрод ЭВЛ-1М3.1, в качестве вспомогательного электрода использовали стальную нержавеющую пластину.

Рабочую поверхность пьезокварцевого резонатора предварительно очищали концентрированной азотной и соляной кислотами, промывали дистиллированной водой и обезжиривали ацетоном. В качестве рабочих растворов для получения полианилинового покрытия применяли растворы кислот H_2SO_4 , HCl , HClO_4 с концентрацией 0,1 М; 0,3 М; 0,5 М.

Электрохимическую полимеризацию анилина осуществляли в потенциодинамическом режиме с линейной и циклической разверткой потенциала со скоростью 10 мВ/с в диапазоне $-0,2 \div +1,4 \text{ В}$.

Для получения иммуноаффинного покрытия полианилиновый слой активировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида в бидистиллированной воде с последующим закреплением хлорамфеникол-белкового конъюгата CAP-STI. Приготовление растворов и проточно инъекционный анализ осуществляли в фосфатном буферном растворе (рН 7,2) состава: 8,0145 г NaCl , 0,2012 г KCl , 2,864 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,204 г KH_2PO_4 .

Изменения морфологии и структуры поверхности рецепторного слоя контролировали методом атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (ЗАО «Нанотехнология-МДТ», Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кантилеверов NSGO 1/20 из кремния с номинальной жесткостью 5 Н/м, резонансной частотой сканирования в диапазоне 120–180 кГц и радиусом закругления 10 нм по двум статистическим параметрам:

R_a – средняя арифметическая шероховатость, нм;

R_tP – размах высот, нм.

Массу покрытия сенсора рассчитывали по уравнению Зауэрбрея

$$\Delta F = -2.3 \cdot 10^6 \cdot F_0^2 \cdot \Delta m / s,$$

где ΔF – изменение резонансной частоты колебаний пьезокварцевого сенсора после нанесения пленки, Гц; F_0 – базисная частота колебаний пьезокварцевого сенсора, МГц; Δm – масса нанесенного покрытия, г; s – площадь электрода пьезокварцевого сенсора, см^2 .

Обсуждение результатов

При электрогенерировании полианилинового покрытия на поверхности золотого электрода пьезокварцевого резонатора в режиме с линейной разверткой потенциала в интервале $-0,2 \text{ В} \div +1,4 \text{ В}$ в среде $0,5 \text{ М HClO}_4 + 0,2 \text{ М C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ формируется клочковатая структура, препятствующая последующему закреплению на ней достаточного количества биомолекул. Напротив, синтез полимерной пленки в циклическом режиме приводит к последовательному формированию многослойного полианилинового покрытия, полностью и равномерно покрывающего поверхность электрода. На вольтамперограмме, полученной при прямой развертке потенциала, отмечено возрастание и появление площадки тока, что соответствует преобразованию непроводящей формы лейкоэмеральдина в проводящую форму соли эмеральдина с дальнейшим переходом в пернигранилин. При обратной развертке потенциала зарегистрированы два пика, соответствующие переходу от пернигранилина к эмеральдину [6]. Таким образом, осуществляется поэтапное формирование тонкого слоя полианилина в форме эмеральдина. С увеличением количества циклов масса покрытия, толщина и занимаемая им площадь возрастает.

Однородное, равномерное покрытие с хорошей адгезией к металлической поверхности электрода и полностью закрывающее его образуется при проведении трех циклов поляризации (N). Увеличение количества циклов свыше пяти приводит к возрастанию массы и толщины пленки, что негативно влияет на результаты измерения с помощью пьезокварцевого иммуносенсора.

Свойства полученного полианилинового покрытия зависят от природы и концентрации фонового электролита (табл. 1). При использовании $0,1 \text{ М}$ и $0,3 \text{ М}$ растворов кислот приращение массы составляет $10\text{-}30 \text{ мкг}$. При применении серной кислоты получаются рыхлые покрытия с невысокой адгезией к поверхности золотого электрода сенсора, часть верхнего слоя легко удаляется дистиллированной водой, что может привести к потере массы при гравиметрических измерениях. Пленки, полученные в $0,5 \text{ М}$ растворах хлорной и соляной кислот, имеют выровненную поверхность, обладают хорошей адгезией к поверхности электрода и полностью ее покрывают, однако масса полученных покрытий превышает 210 мкг , что сужает диапазон определяемых содержаний и может привести к срыву частотных колебаний резонатора [5].

Таблица 1 – Зависимость массы полимерного покрытия от концентрации кислоты в присутствии $0,2 \text{ М C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$, $N=5$

Фоновый электролит	Масса покрытия, мкг
$0,1 \text{ М H}_2\text{SO}_4$	11 ± 1
$0,3 \text{ М H}_2\text{SO}_4$	$22,8 \pm 2,4$

0,5 M H ₂ SO ₄	-
0,1 M HCl	15,2±2,1
0,3 M HCl	31,7±3,1
0,5 M HCl	-
0,1 M HClO ₄	19,7±2,1
0,3 M HClO ₄	24,5±3,2
0,5 M HClO ₄	146±12

Влияние природы кислородсодержащей кислоты, используемой в качестве фонового электролита, на характеристики получаемых покрытий может быть объяснено с позиции эффекта экранирования [2]. В серной кислоте наблюдается максимальное переокисление полианилина, изменяющее структуру пленки и даже приводящее к ее деградации. В результате частичной делокализации заряда в цепи полимера образуется катион-радикал (полярон), который при увеличении окисленности полимера переходит в биполярон. Перхлорат-ионы экранируют биполяроны от нуклеофильного воздействия O⁻ – ионов лучше, чем сульфат-ионы (рис. 1). Поэтому электросинтез полианилина в растворе 0,3 M хлорной кислоты приводит к формированию покрытия с оптимальной массой и структурой, в отличие от пленки, полученной в H₂SO₄.

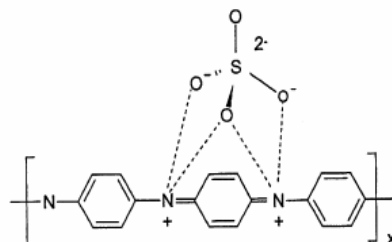


Рис. 1. Схематическое представление эффекта экранирования сульфата от нуклеофильной атаки биполярона участков полианилина.

Исследования возможности применения одного и того же резонатора после удаления рецепторного слоя показали, что при электрогенерировании покрытия на поверхность «нового» и уже использовавшегося ранее сенсора отличаются. Зависимость массы полианилинового слоя от значения токов и потенциалов в первом цикле электрополимеризации (рис. 2) показала, что для получения покрытия на поверхности впервые достаточно проведения трех циклов поляризации (значения тока максимальны). При повторном применении сенсора для получения оптимального по своим характеристикам слоя полианилина необходимо проводить развертку потенциала свыше трех раз в зависимости от кратности возобновления поверхности. Это может быть объяснено растворением и частичным удалением золота с поверхности резонатора, за счет чего происходит уменьшение

толщины электрода с изменением величины шероховатости.

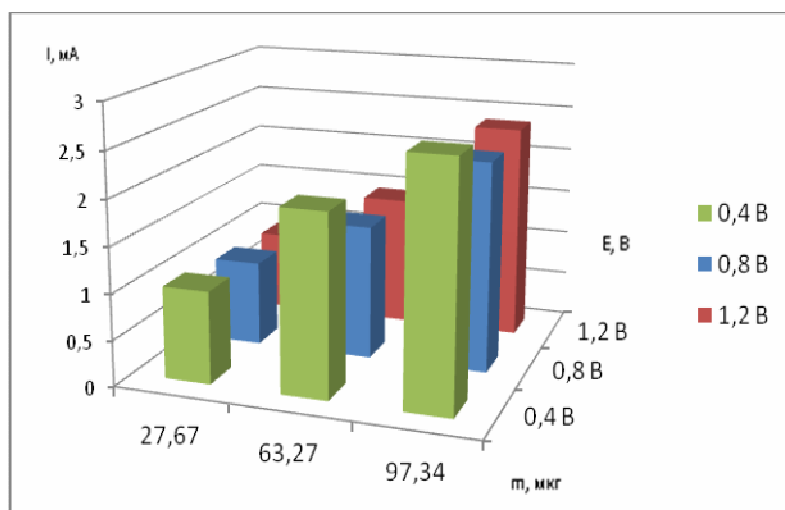


Рис. 2. Зависимость массы полимера от силы тока и потенциала при электрополимеризации.

На электрогенерированную подложку на основе полианилина были иммобилизованы гаптен-белковые конъюгаты путем физической адсорбции и ковалентной пришивки через бифункциональный кросс-реагент. Наиболее устойчивое покрытие образуется при закреплении хлорамфеникол-белкового конъюгата с помощью глутарового альдегида. При этом свежеприготовленный полимер, высушенный в течение 30 мин, помещали на сутки в камеру с парами глутарового альдегида, затем наносили 10 мкл конъюгата CAP-STI и помещали во влажную камеру на 24 час. Перед измерением сенсор промывали буферным раствором для удаления несвязавшихся реагентов. Ковалентная пришивка способствует точной локализации биомолекул и формированию линкерного мостика оптимальной длины, что обеспечивает пространственную доступность активных центров распознавания.

Применение методов атомно-силовой микроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания показало, что при нанесении электросинтезированной полимерной подложки и последующего закрепления конъюгата через кросс-реагент происходит увеличение активной площади поверхности электрода сенсора, о чем свидетельствует возрастание величин средней шероховатости и размаха высот. В результате повышается конформационная подвижность хлорамфеникол-белкового конъюгата (табл. 2).

Таблица 2 – Характеристика рецепторного покрытия пьезокварцевого сенсора для определения хлорамфеникола

Иммуноаффинный слой	Δm , мкг	R_a , нм	R_{tp} , нм
---------------------	------------------	------------	---------------

PANI	31,2	53,7±9,6	564±32
PANI+GA	18,0	69,3±19,0	631±67
PANI+GA+CAP-STI	5,7	84,7±8,8	760±11

Методом Скетчарда рассчитаны константа аффинности антител и константы скорости образования и разрушения иммунокомплекса при введении раствора роданида калия. Значение константы аффинности, равное $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, указывает на высокое сродство и специфичность антител и возможность применения иммунореагентов для высокочувствительного определения хлорамфеникола на уровне 0,2 нг/мл.

Разработанный сенсор был апробирован при определении хлорамфеникола в молоке, мясе, меде и яйцах.

Заключение

Разработан пьезокварцевый иммуносенсор для определения хлорамфеникола в пищевой продукции. Исследованы условия формирования биорецепторного слоя на основе полимерного покрытия полианилина в потенциодинамическом режиме с линейной и циклической разверткой потенциала. Показано, что наиболее устойчивый биорецепторный слой сенсора образуется при ковалентной сшивке через бифункциональный кросс-реагент. Полученные иммуноаффинные покрытия изучены методами атомно-силовой микроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания.

Автор выражает благодарность проф., д.х.н. Ермолаевой Т.Н. за научное руководство при выполнении исследования и обсуждении полученных результатов, проф., д.х.н. Дзантиеву Б.Б. (Институт биохимии им. А.Н. Баха) за предоставленные иммунореагенты.

Работа выполнена при финансовой поддержке тематического плана Министерства Образования и науки №3.2727.2011.

Список литературы

1. Андреев В.Н. Электрохимический синтез и свойства пленок полианилина, сформированных на различных подложках // Электрохимия. – 1999. – Т. 35. – № 7. – С. 824-829.
2. Перечень веществ, продуктов, производственных процессов, бытовых и природных факторов, канцерогенных для человека : Гигиенические нормативы ГН 1.1.725-98 (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 23 декабря 1998 г. № 32).

3. Еремин С.А. Определение хлорамфеникола в молоке методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / С.А. Еремин, Н.В. Гасилова // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т. 65. – № 3. – С. 261-265.
4. Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевые сенсоры: аналитические возможности и перспективы: монография / Т.Н. Ермолаева, Е.Н. Калмыкова. – Липецк : ЛГТУ, 2007. – 190 с.
5. Карасева Н.А. Изучение условий получения иммуноаффинных покрытий пьезокварцевых сенсоров для определения хлорамфеникола / Н.А. Карасева, Т.Н. Ермолаева // Аналитическая химия – новые методы и возможности : тезисы докл. съезда аналитиков России (Москва, 26-30 апреля 2010 г.). – Москва, 2010. – С. 141.
6. Овсянникова Е.В. Автокаталитический характер анодной полимеризации анилина в водно-органических кислых растворах / Е.В. Овсянникова, М.Ю. Трошева, Н.М. Алпатова // Электрохимия. – 2004. – Т. 40. – № 10. – С. 1265-1268.
7. Тимонов А.М. Электронная проводимость полимерных соединений / А.М. Тимонов, С.В. Васильева // Соросовский образовательный журнал (Химия). – 2000. – Т. 6. – № 3. – С. 33-39.
8. Briseno A.L. Electrochemical polymerization of aniline monomers infiltrated into well-ordered truncated eggshell structures of polyelectrolyte multilayers // Langmuir. – 2004. – Vol. 20, Issue 1. – P. 219-226.
9. Cosnier S. Affinity biosensors based on electropolymerized films // Electroanalysis. – 2005. – Vol. 17, Issue 19. – P. 1701–1712.
10. Fujita K. Determination of chloramphenicol residues in bee pollen by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // Journal of AOAC INTERNATIONAL. – 2010. – V. 91, Issue 5. – P. 1103-1109.

Рецензенты

Селеменев Владимир Федорович, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж.

Рудаков Олег Борисович, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физики и химии ФГБОУ ВПО «Воронежский ГАСУ», г. Воронеж.