

---

---

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

УДК 543.9

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОВАЛЬБУМИНА В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

© 2024 г. Е. В. Дорожко<sup>а, \*</sup>, А. Н. Соломоненко<sup>а</sup>, М. Сакиб<sup>а</sup>, В. О. Семин<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет,  
просп. Ленина, 30, Томск, 634050 Россия

<sup>б</sup>Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения РАН,  
просп. Академический, 2/4, Томск, 634055 Россия

\*E-mail: evd@tpu.ru

Поступила в редакцию 09.11.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Разработан вольтамперометрический иммуносенсор типа сэндвич на основе конъюгатов наночастиц золота (НЧ Au) и специфических иммуноглобулинов (IgG) против овалбумина (IgG@НЧAu) для определения овалбумина в некоторых иммунобиологических препаратах. Конъюгат IgG@НЧAu синтезировали методом пассивной адсорбции. В качестве субстратной электродной подложки для иммобилизации рецепторного слоя специфических иммуноглобулинов использовали углеродсодержащий планарный печатный электрод, модифицированный восстановленным лазером оксидом графена. Для усиления сигнала НЧ Au рассмотрена возможность каталитического восстановления нитрата серебра смесью восстановителей – лимонной кислоты и метола. Подобраны условия вольтамперометрической регистрации электрохимического сигнала серебра на иммуносенсоре, который успешно апробирован при определении остатков овалбумина в некоторых иммунобиологических лекарственных препаратах. В качестве метода сравнения использовали твердофазный иммуноферментный анализ.

**Ключевые слова:** наночастицы золота, конъюгаты на основе иммуноглобулинов и наночастиц золота, электрохимический иммуносенсор, овалбумин, вакцины.

DOI: 10.31857/S0044450224070032, EDN: TOMKOD

Овальбумин (ОВА) – примесь целого ряда вакцинных препаратов, полученных с использованием эмбрионов куриных яиц и предназначенных для профилактики кори, краснухи, паротита, бешенства, желтой лихорадки и клещевого энцефалита, которая наиболее часто вызывает аллергические реакции [1]. Овальбумин содержится в некоторых препаратах, которые либо включены в национальный календарь прививок (например, вакцина “Гриппол”), либо являются жизненно необходимыми и часто используемыми в клинической практике лекарственными средствами (препараты интерферона) [2]. Допустимое остаточное количество ОВА в отечественной гриппозной вакцине составляет не более

100 нг/мл, однако этого количества достаточно, чтобы вызвать реакцию гиперчувствительности у лиц с аллергией к яичному белку [3]. Использование зарубежных тест-систем контроля содержания ОВА в иммунобиологических препаратах в настоящее время не разрешено в связи с тем, что они не зарегистрированы в РФ, а также из-за их высокой стоимости и недоступности.

В настоящее время для оценки качества вакцин в лабораториях контроля качества на фармацевтических предприятиях наиболее часто применяют твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с ферментами в качестве маркеров протекания иммунной реакции. Наибольшей популярностью пользуются пероксидаза хрена

и щелочная фосфатаза. Несмотря на высокую чувствительность регистрации аналитических сигналов продуктов субстратных реакций с использованием данных ферментов, они обладают рядом недостатков: сложностью выделения и очистки фермента, лабильностью фермента в отношении ряда физико-химических и биологических факторов, значительной потерей активности фермента в процессе ковалентного связывания с иммуноглобулинами, влиянием на результаты анализа наличия в исследуемом образце ферментных ингибиторов. Эти недостатки обуславливают высокую стоимость, недостаточную стабильность иммуноферментных тест-систем для контроля качества вакцин и в основном связаны с биологическим характером маркера [4].

На сегодняшний день электрохимические иммуносенсоры с конъюгатами иммуноглобулинов, меченными НЧАи, широко используют для определения антигенов/антител в различных объектах, включая иммунобиологические препараты [5, 6].

В данной работе нами предложено использовать в качестве электрохимической маркерной метки НЧАи в твердофазном сэндвич-формате иммуносенсора для более экспрессного по сравнению с ИФА определения ОВА в некоторых иммунобиологических препаратах.

По сравнению с ферментами НЧАи обладают рядом преимуществ: высокой стабильностью, экономичностью, биосовместимостью с иммуноглобулинами при получении конъюгатов и возможностью регистрировать электрохимические сигналы с использованием недорогого оборудования. Синтез НЧАи осуществляли по методу Френса [7]. Конъюгаты иммуноглобулинов кролика (IgG) против овальбумина с наночастицами золота (IgG@НЧАи) синтезировали методом пассивной адсорбции [8]. В качестве твердой субстратной подложки для иммобилизации рецепторного слоя захватывающих антител кролика против овальбумина использовали углеродную поверхность планарного печатного электрода, которая была модифицирована оксидом графена (ОГ). Для увеличения токопроводящих свойств рабочей поверхности электрода ОГ восстанавливали с помощью лазерного гравера. Белковые рецепторные слои электрохимического иммуносенсора оказывали пассивирующее действие на регистрацию чувствительного вольтамперометрического сигнала от НЧАи, в связи с этим в качестве проявителя НЧАи использовали смесь

0.5%-ного раствора нитрата серебра и смеси растворов восстановителей — 0.25%-ной лимонной кислоты и 0.2%-ного метола. Для определения ОВА в некоторых иммунобиологических препаратах регистрировали чувствительный сигнал окисления серебра методом анодной инверсионной вольтамперометрии.

Новый электрохимический иммуносенсор позволил сократить время определения ОВА на 30 мин по сравнению с традиционными ИФА тест-системами в связи с отсутствием дополнительных стадий анализа, связанных с введением субстратов и стоп-реагентов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Методика синтеза конъюгатов IgG@НЧАи.

В основе метода Френса [7] лежит восстановление НЧАи из 0.01%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты 1%-ным раствором цитрата натрия. Синтезировали НЧ Au со средним размером  $17.3 \pm 5.0$  нм.

Для синтеза конъюгатов IgG@НЧАи методом пассивной адсорбции [8] использовали коммерческие иммуноглобулины класса G кролика против овальбумина (Имтек, Россия). Для подбора минимального количества иммуноглобулинов для стабилизации коллоидного раствора золота проводили титрование в лунках микротитровального планшета в присутствии 100 мкл 1 М раствора NaCl по методике [8]. В случае отсутствия изменения цвета лунки по сравнению с первоначальным винным количеством иммуноглобулинов достаточно для защитного действия НЧ Au от коагулирующего действия NaCl. Масштабируя объемы растворов иммуноглобулинов кролика против овальбумина и раствора НЧАи, установили, что на 300 мкл раствора НЧАи необходимо 700 мкл раствора иммуноглобулинов с концентрацией 0.01 мг/мл. Приведенные фактические данные характеризуют защитную способность иммуноглобулинов в условиях эксперимента в отношении НЧАи со средним размером  $17.3 \pm 5.0$  нм.

Конъюгат IgG@НЧАи очищали от несвязанных компонентов методом центрифугирования. Центрифужную пробирку объемом 3 мл наполняли 500 мкл 96% глицерина (Sigma, США) и 1 мл раствора полученного конъюгата. Центрифугирование осуществляли при скорости 25 000 об/мин и температуре +4 °C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отделяли, конъюгат с глицерином переносили в пробирку

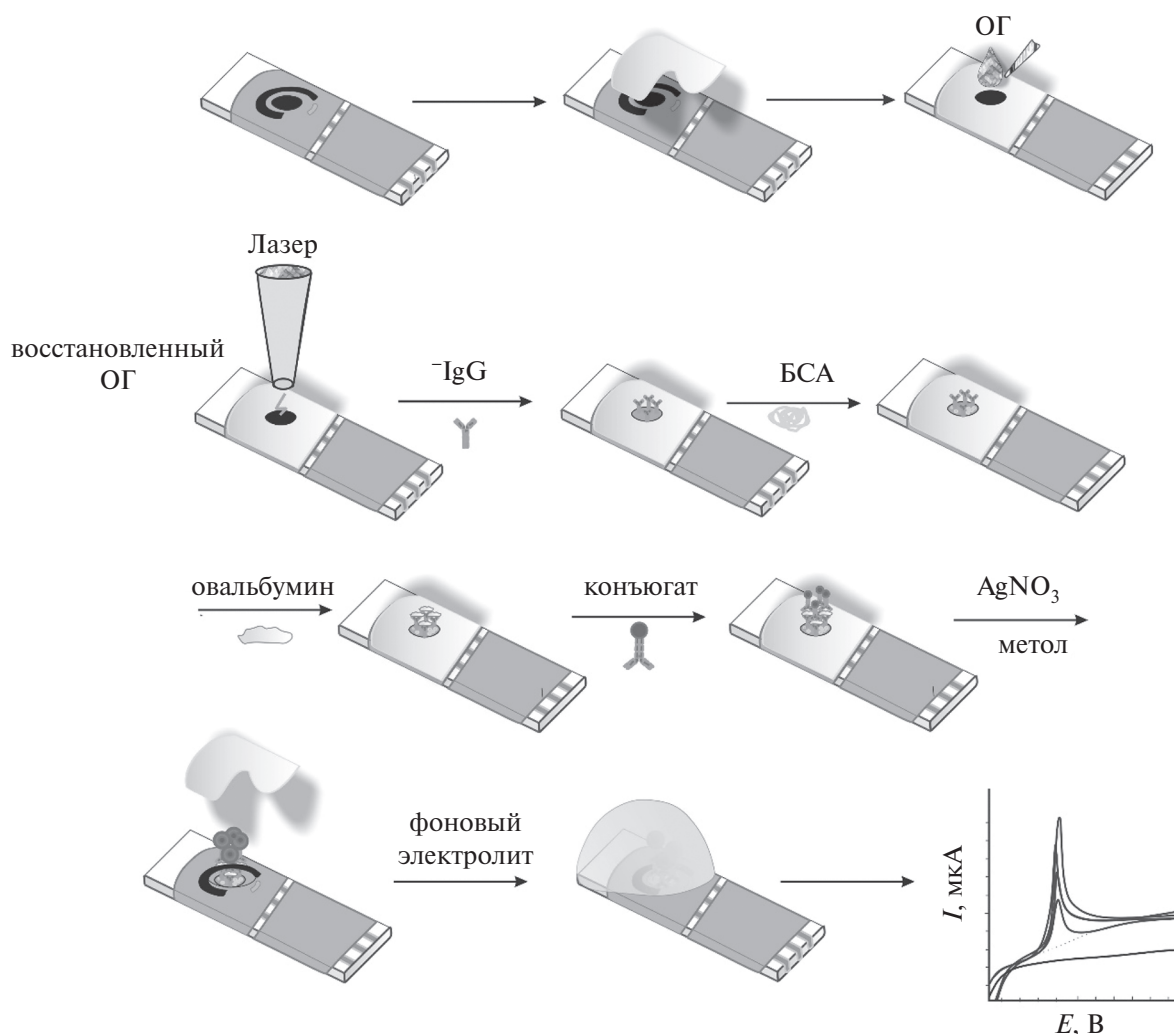


Рис. 1. Схема электрохимического иммуносенсора для определения овалбумина в вакцинах.

для хранения. Конъюгат хранили в морозильной камере при  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 года. Морфологию конъюгата  $\text{IgG@HCAu}$  исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с контрастированием белков 2.0%-ным раствором безводного уранил ацетата на просвечивающем электронном микроскопе Philips CM12 (FEI Electron Optics, Нидерланды) в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск, Россия). Средние размеры неконъюгированных НЧ Au рассчитывали по изображениям ПЭМ с помощью программного обеспечения Fiji ([www.fiji.sc](http://www.fiji.sc)) и Origin Pro 8.0 (OriginLab, США). Для каждого образца брали не менее десяти репрезентативных изображений. Распределение частиц по размерам получали путем подсчета по меньшей мере 100 частиц для каждого образца.

**Изготовление электрохимического иммуносенсора.** Электрохимический иммуносенсор

представлял собой сэндвич-формат, где в качестве твердой подложки для иммобилизации иммуноглобулинов использовали углеродсодержащий планарный печатный электрод (ООО "Русенс", Москва, Россия). Схема изготовления электрохимического иммуносенсора для определения овалбумина в вакцинах представлена на рис. 1.

На первой стадии разработки электрохимического иммуносенсора модифицировали углеродсодержащий планарный печатный электрод ОГ. Для того чтобы в модификации электрода не участвовали части электрода, выполняющие функцию электрода сравнения и вспомогательного электрода, поверхность предварительно закрывали трафаретом из двустороннего скотча. При этом поверхность рабочего электрода оставалась незакрытой. Далее 100 мкл суспензии ОГ (2 мг/мл) (Sigma, Германия) наносили на рабочую часть поверхности электрода и осторожно

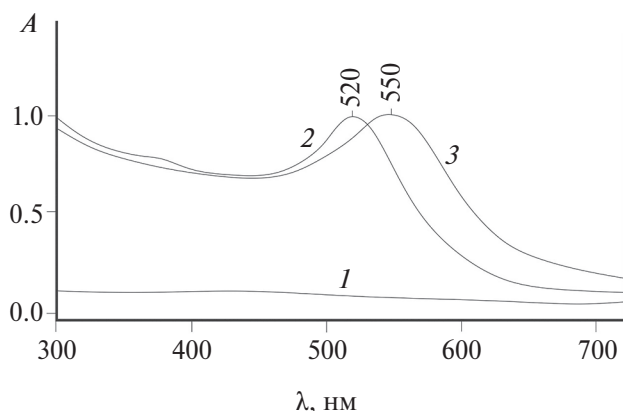


Рис. 2. Спектры светопоглощения в видимой и УФ-областях в бидистиллированной воде (1) НЧАи (2) и конъюгатов IgG@НЧАи (3).

высушивали в течение 2 ч при  $22 \pm 2$  °С. Для улучшения токопроводящих свойств поверхности электрода и увеличения электроактивной площади поверхности ОГ восстанавливали с помощью лазерного гравера мощностью 600 мВт при длине волны 405 нм [9, 10]. Инкубационный период для каждого шага иммобилизации биологического материала на поверхности восстановленного ОГ составлял 1 ч при 37 °С. После каждого этапа иммобилизации биологического материала трижды ополаскивали поверхность сенсора дистиллированной водой для удаления несвязанных компонентов. Для иммобилизации коммерческих иммуноглобулинов кролика против овалбумина использовали 100 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл. Далее на поверхность сенсора наносили блок-реагент — 0.5%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), по 100 мкл на каждый электрод. После этого на поверхности электрохимических сенсоров раскапывали по 100 мкл растворов овалбумина в концентрациях, соответствующих линейному диапазону от 0.5 до 24.0 нг/мл, или испытываемую вакцину в том же объеме. После иммобилизации овалбумина на поверхность каждого сенсора наносили по 100 мкл конъюгата IgG@НЧАи. Далее на поверхность сенсоров наносили по 100 мкл 0.5%-ного раствора AgNO<sub>3</sub> и 100 мкл раствора восстановителя — смеси 0.25%-ной лимонной кислоты и 0.2%-ного метола. Данная процедура позволила усилить сигнал золота серебром при его каталитическом восстановлении на поверхности НЧАи конъюгата IgG@НЧАи. Время восстановления серебра составило 3 мин. Далее на поверхность сенсора наносили 200 мкл фоновый электролит и регистрировали сигнал

серебра методом инверсионной вольтамперометрии. Для контроля специфичности разработанного электрохимического иммуносенсора в качестве отрицательных контрольных образцов использовали неспецифические к овалбумину IgG свиньи, иммобилизованные на поверхности иммуносенсора, а также БСА. В качестве метода сравнения для определения овалбумина в вакцинах использовали метод ИФА.

**Регистрация электрохимического сигнала серебра иммуносенсора.** Для регистрации электрохимического сигнала серебра использовали фоновый электролит состава 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO<sub>4</sub> (1 : 1, по объему). Объем фонового электролита, который наносили в виде капли на рабочую поверхность иммуносенсора, составил 200 мкл. Условия регистрации электрохимического сигнала: анодная инверсионная вольтамперометрия, потенциал накопления –0.8 В, время накопления 60 с, диапазон потенциалов от –0.6 до +1.0 В со скоростью сканирования потенциала 100 мВ/с.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированные НЧАи и конъюгаты IgG@НЧАи для определения овалбумина в вакцинах характеризовали методами спектrophотометрии в видимой и УФ-областях и ПЭМ.

Спектры светопоглощения НЧАи и конъюгатов IgG@НЧАи регистрировали в диапазоне 300–700 нм (рис. 2). Максимум поглощения при  $520 \pm 2$  нм обусловлен проявлением поверхностного плазмонного резонанса НЧАи, в то время как более широкий максимум поглощения при 550 нм, смещенный в более длинноволновую область по сравнению с пиком НЧАи, косвенно указывает на связывание НЧАи с IgG кролика против овалбумина.

На рис. 3 представлены ПЭМ-изображения НЧАи и конъюгатов IgG@НЧАи. На рис. 3а видны НЧАи сферической формы со средним размером  $17.3 \pm 5.0$  нм.

После синтеза и очистки конъюгатов IgG@НЧАи отмечено, что в их состав включены белковые компоненты иммуноглобулинов кролика (IgG) белого цвета с аморфной структурой, тогда как НЧАи сферической формы, распределенные на поверхности IgG, имеют темную окраску (рис. 3б). Изображение ПЭМ подтверждает успешность синтеза конъюгатов IgG@НЧАи.



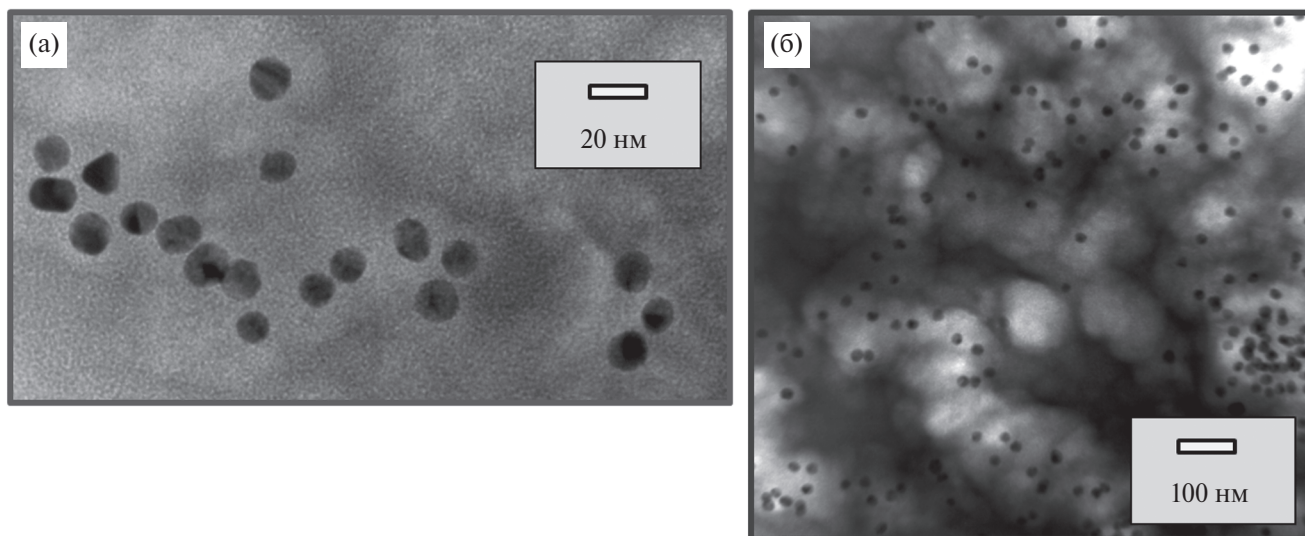


Рис. 3. Изображения, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, (а) НЧАи и (б) конъюгатов IgG@НЧАи (контрастирование IgG 2.0%-ным раствором уранил ацетата).

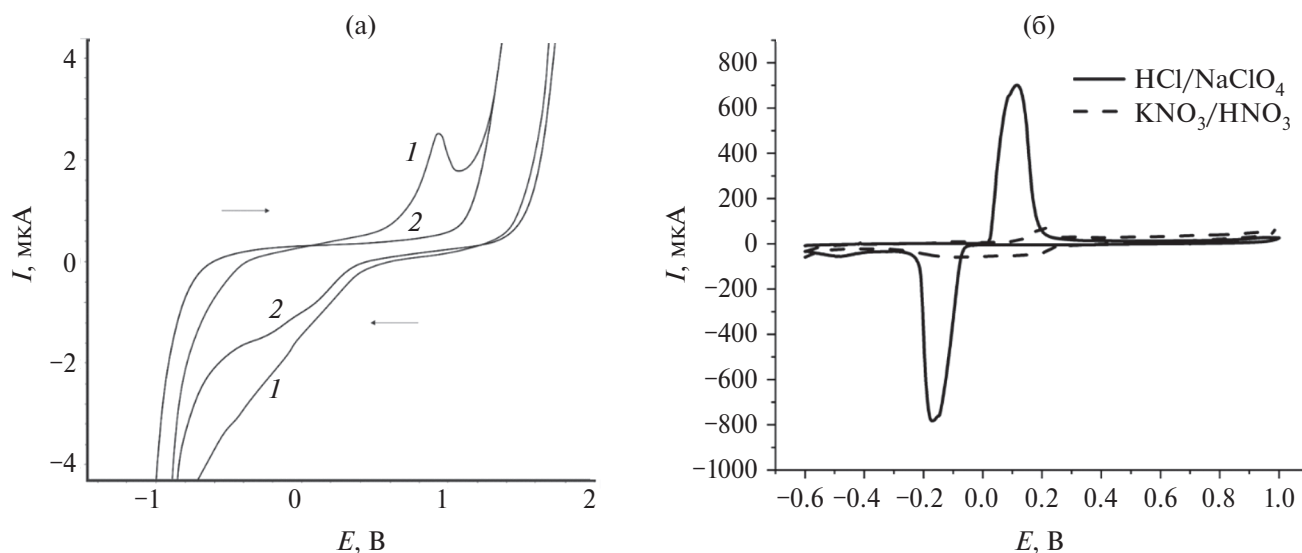
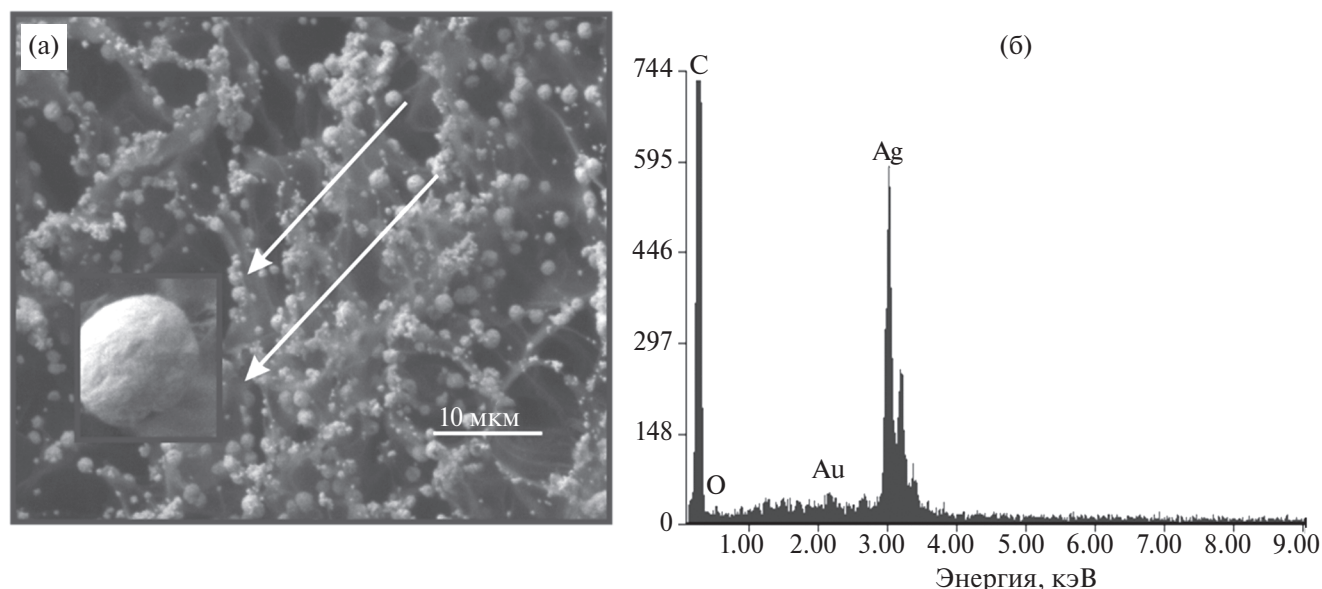


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы (а) НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи на углеродсодержащем планарном печатном электроде в 0.1 М растворе фонового электролита HCl–NaCl (1 : 1, по объему),  $\nu = 100$  мВ/с, до иммобилизации рецепторного слоя (1), после иммобилизации рецепторного слоя (2); (б) циклические вольтамперограммы серебра после проявления на поверхности электрохимического иммуносенсора в разных фоновых электролитах: 1 – 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO<sub>4</sub> (1 : 1), 2 – 0.25 М раствор KNO<sub>3</sub>–0.5 М HNO<sub>3</sub> (1 : 1), объем фонового электролита – 200 мкл.

После синтеза конъюгатов IgG@НЧАи регистрировали циклические вольтамперограммы от золотой метки до и после сборки электрохимического иммуносенсора (рис. 4а) в фоновом электролите состава HCl–0.1 М раствор NaCl. Согласно данным [6], в HCl можно растворить коллоидное золото конъюгата. Кроме того, хлорид-ионы позволяют окислить золото с образованием комплекса  $[\text{AuCl}_4]^-$ , который окисляется в диапазоне потенциалов от +1.0 до +1.2 В на

электроде, изготовленном по типу трафаретной печати [6].

На рис. 4а показано, что после иммобилизации рецепторного слоя на поверхность сенсора сигнал от золотой метки конъюгатов не обнаружен, в отличие от поверхности без рецепторного слоя. Слои иммуноглобулинов и овальбумина экранируют электродную поверхность, что не позволяет зарегистрировать сигнал от золотой метки конъюгатов IgG@НЧАи в указанных

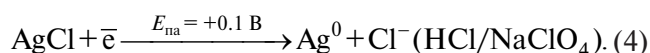
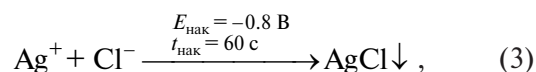
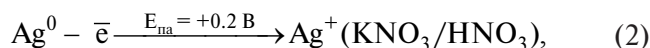
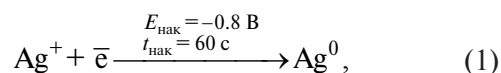


**Рис. 5.** (а) Изображение поверхности иммуносенсора, полученное методом скагирующей электронной микроскопии, после каталитического восстановления серебра смесью 0.2%-ной лимонной кислоты и 0.25%-ного метола на НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи (режим обратного рассеяния электронов поверхности); (б) спектр ЭДС поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра с характерными рентгеновскими линиями С, О, Аи и Аg.

электрохимических условиях. В связи с этим было решено усилить электрохимический сигнал золота серебром. Известно, что на поверхности НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи можно каталитически восстановить другой металл, например Ag, Hg, Cu как электрохимическим, так и химическим способами [11–15]. Апробировали несколько потенциальных химических восстановителей серебра – п-фенилендиамин, гидрохинон, борогидрид натрия, метол и лимонную кислоту – на поверхности НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи для усиления вольтамперометрического сигнала. Наилучшие результаты по регистрации чувствительного вольтамперометрического сигнала серебра для определения овальбумина в вакцинах достигнуты при использовании раствора восстановителя состава 0.2%-ная лимонная кислота и 0.25%-ный метол.

С целью выбора лучшего фонового электролита для регистрации вольтамперометрического сигнала серебра использовали два типа фоновых электролитов: смесь 0.25 М раствора  $\text{KNO}_3$  и 0.5 М  $\text{HNO}_3$  (1 : 1) и смесь 0.05 М  $\text{HCl}$  и 0.05 М раствора  $\text{NaClO}_4$  (1 : 1). Для регистрации электрохимических сигналов серебра использовали метод циклической вольтамперометрии (ЦВА) со скоростью развертки 100 мВ/с в диапазоне потенциалов от –0.6 до +1 В. Электродные механизмы окисления-восстановления серебра в различных фоновых электролитах можно описать уравнениями (1), (2) для фонового электролита

$\text{KNO}_3\text{--HNO}_3$  и (3), (4) для фонового электролита  $\text{HCl--NaClO}_4$ :



На рис. 4б интенсивность редокс-сигналов  $\text{AgCl}$  в фоновом электролите 0.05 М  $\text{HCl}$ –0.05 М  $\text{NaClO}_4$  в пять раз интенсивнее редокс-сигналов Ag в азотнокислом фоновом электролите 0.25 М раствор  $\text{KNO}_3$ –0.5 М  $\text{HNO}_3$ . Это свидетельствует о том, что хлорид серебра накапливается лучше на поверхностях НЧАи конъюгатов по сравнению с  $\text{Ag}^0$  при измерении аналитических сигналов методом ЦВА. В фоновом электролите 0.05 М  $\text{HCl}$ –0.05 М раствор  $\text{NaClO}_4$  можно использовать как катодный, так и анодный ток в качестве аналитического сигнала. В дальнейших исследованиях применяли метод анодной инверсионной вольтамперометрии, а в качестве фонового электролита – 0.05 М  $\text{HCl}$ –0.05 М раствор  $\text{NaClO}_4$  (1 : 1, по объему).

На рис. 5 представлено полученное методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изображение поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра на

**Таблица 1.** Результаты определения правильности и воспроизводимости овальбумина в модельных образцах на трех уровнях концентрации ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

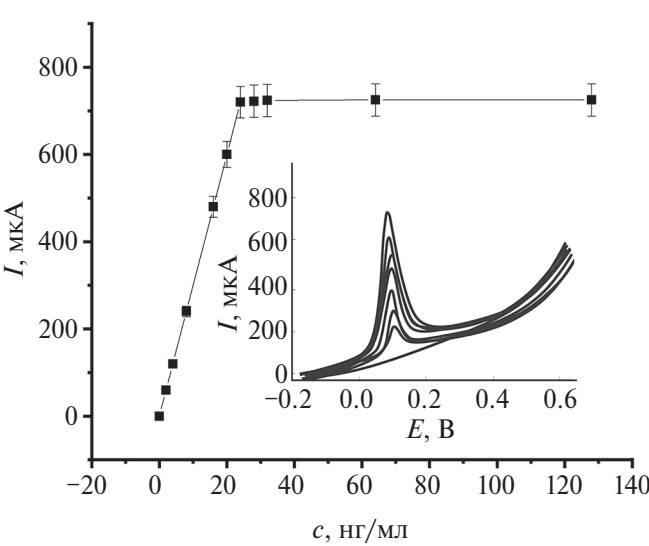
| Введено ОВА, нг/мл                                                         | Найдено, $c(\text{ОВА}) \pm s$ , нг/мл | Степень извлечения, % | $s_r$ , % | $s_r$ (между сериями), % | Найдено ИФА, $c(\text{ОВА}) \pm s$ , нг/мл |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------------------|
| 0.50                                                                       | $0.47 \pm 0.01$                        | 94                    | 3.1       | 12                       | $0.52 \pm 0.02$                            |
| 8.0                                                                        | $7.7 \pm 0.2$                          | 96                    | 3.2       | 8                        | $7.8 \pm 0.3$                              |
| 24.0                                                                       | $23.0 \pm 0.7$                         | 96                    | 3.5       | 7                        | $23.8 \pm 1.0$                             |
| Требуемая степень извлечения (%) для биоаналитических методик (ГФ XV), ICH |                                        | 85–115                |           |                          |                                            |
| Критерий (ГФ XV) (ICH)                                                     |                                        |                       |           | 20.0                     |                                            |

НЧAu конъюгатов IgG@НЧAu смесью 0.2%-ной лимонной кислоты и 0.25%-ного метола, а также полученный методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) спектр поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра с характерными рентгеновскими линиями С, О, Au и Ag. На рис. 5а отчетливо видны крупные сферические образования на поверхности иммуносенсора после восстановления серебра. На ЭДС-спектре (рис. 5б) присутствуют характеристические рентгеновские линии С, О, Au и интенсивная линия Ag, что подтверждает наличие серебра на поверхности иммуносенсора после его каталитического восстановления.

Для построения градуировочной зависимости интенсивности тока окисления AgCl от концентрации ОВА готовили серию градуировочных растворов ОВА с концентрациями от 0.125 до 24 нг/мл. На рис. 6 представлена градуировочная зависимость и вольтамперограммы окисления AgCl.

Линейный диапазон, включающий концентрации от 0.5 до 24 нг/мл ( $\lg I = \lg c + 1.5$ ,  $R^2 = 0.999$ ), находится в пределах допустимой нормы и ожидаемых концентраций ОВА в иммунобиологических препаратах [16] с учетом разведения проб. Предел обнаружения (ПО) ОВА, рассчитанный по  $3s$ -критерию ( $\text{ПО} = 3s/b$ , где  $s$  — стандартное отклонение холостой пробы,  $b$  — наклон прямолинейного участка градуировочной прямой), составил 0.1 нг/мл [17].

Воспроизводимость работы иммуносенсора оценивали по значению относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) в пределах одного эксперимента и между экспериментами, повторно исследуя стандартные растворы ОВА линейного диапазона на трех уровнях концентрации (0.5, 8.0 и 24 нг/мл). Значение  $s_r$  в пределах одного эксперимента оценивали по 10 параллельным определениям, между разными экспериментами — по 6



**Рис. 6.** Градуировочная зависимость для определения овальбумина с помощью электрохимического иммуносенсора в диапазоне концентраций от 0.125 до 128 нг/мл (вставка — анодные инверсионные вольтамперограммы окисления серебра).

определениям, выполненным в разные дни. Вариабельность в пределах одного эксперимента по определению концентраций ОВА в 10 повторях для каждого уровня концентраций не превышала 8% ( $s_r < 8\%$ ). Вариабельность между сериями определений, которую оценивали по измерениям в шести повторях для каждого уровня концентраций, составила менее 12% ( $s_r < 12\%$ ), что соответствует требованиям [16].

Правильность работы электрохимического иммуносенсора на ОВА оценивали методом введено—найдено и рассчитывали степень извлечения (%) на трех уровнях концентрации (0.5, 8.0 и 24 нг/мл). В качестве метода сравнения выбрали метод ИФА (табл. 1). Как видно из таблицы, значения степени извлечения находятся в диапазоне от 94 до 96% и укладываются в диапазон требований нормативной документации; компоненты матрицы не влияют на правильность полученных

**Таблица 2.** Показатели селективности электрохимического иммуносенсора для определения овальбумина

| Перекрестно-реагирующий антиген | CR, %           |
|---------------------------------|-----------------|
| Бычий альбумин                  | $0.82 \pm 0.20$ |
| Человеческий альбумин           | $0.64 \pm 0.20$ |
| Лошадиный альбумин              | $0.34 \pm 0.09$ |
| Критерий [ГФ XV, (ICH)]         | Не более 1%     |

результатов определения ОВА предложенным электрохимическим иммуносенсором, которые согласуются с результатами ИФА.

Для оценки селективности анализа изучали перекрестную реактивность ОВА с близкими по структуре антигенами. В качестве отрицательных контрольных образцов использовали бычий, человеческий и лошадиный альбумины, которые являются перекрестно реагирующими антигенами и могут вносить ложно положительные вклады в аналитические сигналы электрохимического иммуносенсора. Для каждого перекрестно реагирующего антигена рассчитывали процент перекрестной реактивности по формуле:

$$CR (\%) = (IC_{OVA}) / (IC_{аналог}) \times 100 \%, \quad (5)$$

где CR – перекрестная реактивность, %;  $IC_{OVA}$  – концентрация ОВА в середине градуировочной прямой;  $IC_{аналог}$  – концентрация перекрестно реагирующего соединения, которое на 50% ингибирует максимальный сигнал овальбумина [18].

Результаты определения перекрестной реактивности представлены в табл. 2. Из данных табл. 2 можно сделать вывод, что для исследуемого электрохимического иммуносенсора не выявлено выраженной перекрестной реакции ни с одним из анализируемых антигенов, что свидетельствует о его высокой селективности в отношении определения ОВА.

В табл. 3 представлены сравнительные результаты определения ОВА в вакцинах с

помощью электрохимического иммуносенсора и методом ИФА в иммунобиологических препаратах. Полученные результаты показали, что найденные с помощью разработанного электрохимического иммуносенсора концентрации ОВА соответствуют значениям, заявленным производителем, и согласуются с результатами традиционно используемого метода ИФА.

\* \* \*

Разработан электрохимический иммуносенсор на основе наночастиц золота для определения овальбумина, который отличается экономичностью и более высокой стабильностью конъюгатов по сравнению с ферментными тест-системами. Электрохимический иммуносенсор позволяет сократить продолжительность определения ОВА на 30 мин по сравнению с традиционными ИФА тест-системами, так как не требует дополнительных стадий введения субстратов и стоп-реагентов. Конъюгат и электрохимический иммуносенсор могут быть использованы в сэндвич-формате для высокочувствительного определения остатков овальбумина в некоторых иммунобиологических лекарственных препаратах с пределом обнаружения 0.1 нг/мл и диапазоном определяемых содержаний от 0.5 до 24 нг/мл. Значения степени извлечения при оценке правильности определения ОВА не превышали 94–96% и соответствовали требованиям нормативной документации. При исследовании селективности электрохимического иммуносенсора показана отрицательная перекрестная реактивность ( $CR < 1\%$ ) со структурно родственными овальбумину соединениями.

# ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены за счет субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения госзадания, проект

**Таблица 3.** Сравнительные результаты определения овальбумина в иммунологических препаратах с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и методом иммуноферментного анализа ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

| Название препарата                                                             | Заявлено производителем, мкг/мл | Найдено электрохимическим методом, мкг/мл | Найдено ИФА, мкг/мл |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|
| Вакцина для профилактики гриппа Ваксигрип (SANOFI PASTEUR, S.A., Франция)      | Не более 2.0                    | $0.08 \pm 0.02$                           | $0.09 \pm 0.03$     |
| Вакцина для профилактики желтой лихорадки СинСаВак (ООО “Смартбиотех”, Россия) | Не более 2.0                    | $1.1 \pm 0.3$                             | $1.2 \pm 0.4$       |



№ FSWW-2023-0008. Исследование выполнено при поддержке программы развития Томского политехнического университета.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamamoto T., Juneja L. R., Hatta H., Kim M. Hen Eggs: Basic and Applied Science. CRC Press, 1996. 216 p.
2. Edevag G., Eriksson M., Granström M. The development and standardization of an ELISA for ovalbumin determination in influenza 101 vaccines // J. Biol. Stand. 1986. V. 14. № 3. P. 223.  
[https://doi.org/10.1016/0092-1157\(86\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0092-1157(86)90007-7)
3. Давлетбаева Л.Р. Валидация количественных иммуноферментных тест-систем для контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов. Дис. ... канд. биол. наук. Уфа: Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 2007. 111 с.
4. Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Перспективы использования коллоидного серебра как маркера иммуноанализа // Сибирь-Восток. 2002. Т. 3. № 51. С. 10.
5. Iglesias-Mayor A., Amor-Gutiérrez O., Costa-García A., de la Escosura-Muñiz A. Nanoparticles as emerging labels in electrochemical immunosensors // Sensors. 2019. V. 19. № 23. Article 5137.  
<https://doi.org/10.3390/s19235137>
6. Beck F., Horn C., Baeumner A. J. Ag nanoparticles outperform Au nanoparticles for the use as label in electrochemical point-of-care sensors // Anal. Bioanal. Chem. 2022. V. 414. P. 475.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03288-6>
7. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. № 105. P. 20.  
<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
8. Schwartzbach S. D., Osafune T. Immunoelectron Microscopy: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. 351 p.
9. Rodriguez R.D., Khalelov A., Postnikov P.S., Lipovka A., Dorozhko E., Amin I., Murastov G.V., Chen J.-J., Sheng W., Trusova M.E., Chehimi M.M., Sheremet E. Beyond graphene oxide: Laser engineering functionalized graphene for flexible electronics // Materials Horizons. 2020. V. 7. № 4. P. 1030.  
<https://doi.org/10.1039/C9MH01950B>
10. Saqib M., Dorozhko E.V., Barek J., Vyskocil V., Korotkova E.I., Shabalina A.V. A laser reduced graphene oxide grid electrode for the voltammetric determination of carbaryl // Molecules. 2021. V. 26. № 16. Article 5050.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26165050>
11. Rusling J. F. Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for proteins // Chemical Record. 2012. V. 12. № 1. P. 164.  
<https://doi.org/10.1002/tcr.201100034>
12. Qin X., Dong Y., Wang M., Zhu Z., Li M., Chen X. et al. C-dots assisted synthesis of gold nanoparticles as labels to catalyze copper deposition for ultrasensitive electrochemical sensing of proteins // Sci. China Chem. 2018. V. 61. P. 476.  
<https://doi.org/10.1007/s11426-017-9204-8>
13. Chen Z.-P., Peng Z.-F., Luo Y., Qu B., Jiang J.-H., Zhang X.-B. et al. Successively amplified electrochemical immunoassay based on biocatalytic deposition of silver nanoparticles and silver enhancement // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 23. № 4. P. 485.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.06.005>
14. Zhao C., Wu J., Ju H., Yan F. Multiplexed electrochemical immunoassay using streptavidin/nanogold/carbon nanohorn as a signal tag to induce silver deposition // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 847. P. 37.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.035>
15. Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Крупницкая Ю.А. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. Т. 61. № 4. С. 229.
16. ICH Q. R. The international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH). Text and methodology Q. 2022. V. 2.
17. Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А. Еще раз о пределах обнаружения и определения // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. №. 3. С. 229. (Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A. Once again about determination and detection limits // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. P. 223.  
<https://doi.org/10.1134/S1061934810030020>)
18. Dankwardt A., Hock B., Simon R., Freitag D., Kettrup A. Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: Investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids // Environ. Sci. Technol. 1996. V. 30 № 12. P. 3493.  
<https://doi.org/10.1021/es9601604>

## ORIGINAL ARTICLES

**ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS BASED ON GOLD NANOPARTICLES FOR THE DETERMINATION OF OVALBUMIN IN IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS****E. V. Dorozhko<sup>a, \*</sup>, A. N. Solomonenko<sup>a</sup>, M. Saqib<sup>a</sup>, V. O. Semin<sup>b</sup>**<sup>a</sup>*National Research Tomsk Polytechnic University, Lenin Avenue 30, Tomsk, 634050 Russia*<sup>b</sup>*Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Academic Avenue, 2/4, Tomsk, 634055 Russia**\*E-mail: evd@tpu.ru*

**Abstract.** A sandwich-type voltammetric immunosensor based on conjugates of gold nanoparticles (AuNP) with specific immunoglobulins (IgG) against ovalbumin (IgG@AuNP) is developed for the determination of ovalbumin in some immunobiological preparations. The IgG@AuNP conjugate is synthesized by passive adsorption. A carbon-containing planar printed electrode modified by laser reduced graphene oxide is used as a substrate electrode for immobilizing the receptor layer of specific immunoglobulins. A possibility of the catalytic reduction of silver nitrate with a mixture of reducing agents, citric acid and metol, is considered in order to enhance the signal of AuNP. Conditions for the voltammetric recording of the electrochemical signal of silver on an immunosensor, which has been successfully tested in determining ovalbumin residues in some immunobiological drugs, are selected. Enzyme-linked immunosorbent assay is used as a reference method.

**Keywords:** gold nanoparticles, conjugates based on immunoglobulins and gold nanoparticles, electrochemical immunosensor, ovalbumin, vaccines.