

УДК 543.645:57.083.3

РАЗРАБОТКА КИНЕТИЧЕСКОГО МИКРОПЛАНШЕТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИБУТИЛФТАЛАТА

© 2023 г. А. Н. Берлина¹, К. В. Серебренникова¹, Н. С. Комова¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1, *}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

В работе предложена методика быстрого иммуноферментного анализа (ИФА) для определения дибутилфталата (ДБФ) в фруктовых соках, основанная на конкурентном взаимодействии между свободным и связанным антигеном за центры связывания специфических антител. Изучены аналитические характеристики метода в различных кинетических режимах проведения стадии конкуренции. Установлены оптимальные условия, обеспечивающие минимальный предел обнаружения и высокую точность измерений. Выбрана продолжительность конкурентной стадии ИФА – 30 мин. Диапазон определяемых концентраций ДБФ составил от 0.37 до 68.34 нг/мл; предел обнаружения – 0.08 нг/мл. Выбран режим экстрагирования ДБФ, для которого показана эффективность предложенного ИФА при тестировании фруктовых соков.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, кинетика иммунных взаимодействий, дибутилфталат, безопасность пищевых продуктов, фруктовый сок, экстракция, экотоксикант

DOI: 10.31857/S0555109923030030, **EDN:** AYNQGU

Эфиры фталевой кислоты широко используются в качестве добавок, обеспечивающих гибкость и прочность пластиковых изделий бытового, пищевого, медицинского и строительного назначения [1, 2]. Миграция фталатов из материалов в воду, воздух и почву объясняется отсутствием химического связывания между эфирами фталевой кислоты и пластмассами [3–5]. Фталаты оказывают негативное влияние на секрецию гормонов в организме человека и обладают репродуктивной, эмбриологической и генетической токсичностью [6]. Кроме того, серьезной проблемой является медленная деградация фталатов и аккумуляция их производных в тканях живых организмов [7, 8].

Один из наиболее распространенных и широко используемых пластификаторов в промышленных и потребительских товарах – дибутилфталат (ДБФ) [9]. Для ДБФ как токсиканта класса эндокринных разрушителей различными контролирующими организациями установлены максимально допустимые уровни содержания в диапазоне 100–450 нг/мл [10, 11]. Однако значительные превышения этих уровней часто обнаруживаются в продуктах питания и воде [12]. К тому же разнообразие фталатов и их встречаемость в разных сочетаниях [13] требует в каких-то случаях группового, в каких-то – селективного выявления. Среди методов определения фталатов преобладают инструментальные методы, такие как хроматография или хромато-масс-спектрометрия [14–16].

Несмотря на высокую чувствительность и селективность, реализация этих методов сопряжена с долгой пробоподготовкой и трудозатратами, а также необходимостью дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала [17, 18]. В этой связи востребованы быстрые аналитические методы, сочетающие высокую специфичность, чувствительность и надежность.

К таким методам можно отнести иммунохимические [19–23], в частности иммуноферментный анализ (ИФА) [24–26], в основе которых лежит реакция антиген-антитело. ИФА широко используется для обнаружения различных органических загрязнителей в экологическом мониторинге [27–29], что подтверждает преимущества метода, связанные со скоростью и производительностью. Как правило, для определения низкомолекулярных органических загрязнителей реализуется конкурентная схема ИФА с мечением ферментом антигена или антител против анализируемого соединения. Так, для определения ДБФ в водных средах разработан ряд систем ИФА с различными модификациями, направленными на повышение аналитических характеристик [30–32]. Однако, помимо предварительной иммобилизации антигена, ИФА занимает, как правило, не менее 3 ч с двумя продолжительными стадиями инкубации. Для ряда анализов описан и успешно применен кинетический формат ИФА с сокращением продолжительности стадий [33, 34]. Отмечены также возможности ки-

нетических иммуноаналитических систем в управлении селективностью определения [35]. Тем не менее, традиционно используются иммуоферментные системы с продолжительностью взаимодействия антиген-антитело не менее часа на каждой стадии, что обеспечивает достижение химического равновесия.

Цель работы — разработка ИФА дибутилфталата в кинетическом режиме, определение его аналитических характеристик и селективности, а также апробация при тестировании образцов соков.

МЕТОДИКА

Реактивы. Для приготовления калибровочных и контрольных растворов использовали дибутилфталат (ДБФ), монобутилфталат, диэтилфталат, монооктилфталат, моно-2-октилфталат, диоктилфталат, монобензилфталат, моноциклогексилфталат, монометилфталат, диметилфталат, дигептилфталат, дифенилфталат и фталевую кислоту фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Для получения конъюгата гаптен-белок использовали 4-амино-дибутилфталат (4-амино-ДБФ), синтезированный и предоставленный профессором Чжао (Гуандунский технологический университет, Гуанчжоу, Китай), соевый ингибитор трипсина (СИТ) и овальбумин (ОВА) фирмы “Sigma-Aldrich” (США), диметилсульфоксид (ДМСО), соляную кислоту и нитрит натрия (“Химмед”, Россия).

Для проведения ИФА использовались следующие реагенты: конъюгат БСА-ДБФ, мышинные моноклональные антитела (мАт) к ДБФ производства “Creative Diagnostics” (США), антивидовые (иммуноглобулины козы, связывающие иммуноглобулины мыши) антитела, меченные пероксидазой хрена (“Jackson ImmunoResearch, США”), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, ЗАО “НВО Иммунотех”, Россия), Твин-20 (“Sigma-Aldrich”, США) и серная кислота (“Химмед”, Россия), а также 96-луночные прозрачные микропланшеты Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli Q (сопротивление 18 МОм·см), полученной с помощью системы очистки воды Simplicity (“Millipore”, США).

Оборудование. Спектры поглощения конъюгата ОВА-ДБФ и оптические плотности измеряли в лунках микропланшетов с помощью многофункционального планшетного анализатора EnSpire Multimode Plate Reader (“PerkinElmer”, США). Спектр ИК-Фурье ОВА-ДБФ регистрировали в диапазоне 400–4000 см⁻¹ с использованием FTIR-спектрофотометра FT/IR-6700 (“JASCO”, Япония) при комнатной температуре.

Получение конъюгата овальбумин-дибутилфталат (ОВА-ДБФ). Синтез конъюгата ОВА-ДБФ основан на реакции азосочетания, в которой первичные аминогруппы используемого производного дибутилфталата (4-амино-ДБФ) реагируют с карбоксильными группами белка-носителя. Для

этого к 5.8 мг 4-амино-ДБФ, растворенного в 25 мкл ДМСО, при 0°C добавляли 12.5 мкл 31%-ной соляной кислоты, 375 мкл Н₂О, 15 мкл Твин-20 и 0.5 мл раствора нитрита натрия с концентрацией 2.75 мг/мл. К полученной смеси добавляли 10 мг овальбумина (белок-носитель), растворенного в 5 мл 0.1 М боратного буфера, pH 8.3, после чего цвет реакционной смеси изменялся на желто-коричневый. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре проводили диализ против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7.4. Концентрацию препарата ОВА-ДБФ рассчитывали по белку-носителю, исходя из спектров поглощения. Полученный конъюгат ОВА-ДБФ разделяли на аликвоты и хранили при –20°C до использования. Молярное соотношение ОВА : ДБФ при синтезе составляло 1 : 60.

Иммуоферментный анализ дибутилфталата. Иммуобилизацию конъюгата ОВА-ДБФ, растворенного в 50 мМ фосфатном буфере с 0.1 М соли натрия хлорида (ФБС), pH 7.4 проводили, внося его в концентрации 3.0 мкг/мл по 100 мкл в лунки микропланшета и инкубируя в течение ночи при 4°C. Затем микропланшет три раза промывали ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ). На первой стадии ИФА варьировали концентрацию моноклональных антител, специфичных к ДБФ. Различные разведения антител добавляли для взаимодействия с адсорбированным конъюгатом ОВА-ДБФ и инкубировали 1 ч при +37°C. Затем после отмывки добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000), и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывки (три раза ФБСТ и один раз дистиллированной водой) определяли активность ферментной метки, связавшейся с носителем, добавляя 100 мкл раствора субстрата (коммерческий раствор ТМБ + Н₂О₂). Реакцию останавливали через 15 мин добавлением 50 мкл 0.1 М Н₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм и строили график зависимости ОП от концентрации антител с использованием программного обеспечения Origin 9.0 (“OriginLab”, США). Концентрацию антител, соответствующую ОП₄₅₀ = 1.0, использовали для конкурентного ИФА.

Конкурентный ИФА дибутилфталата и исследование селективности включали те же первоначальные стадии. После иммобилизации конъюгата ОВА-ДБФ и промывки микропланшета в лунки вносили 50 мкл растворов дибутилфталата (концентрации в диапазоне 3000–0.05 и 0 нг/мл) или альтернативных соединений (в концентрациях от 3000 нг/мл) и 50 мкл мАт-ДБФ (2.35 мкг/мл) в ФБСТ. Время конкурентной стадии было 8, 15, 30 и 60 мин. Заключительные стадии ИФА были как описано выше.

Иммуоферментный анализ с предварительным инкубированием растворов анализата с антителами проводили следующим образом. В микропробирки объемом 500 мкл вносили такие же растворы ДБФ и антител, как и при проведении

конкурентного анализа. Затем по истечении 10, 20 или 30 мин растворы переносили в микропланшет с предварительно иммобилизованным конъюгатом ОВА-ДБФ и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем после отмывки лунок микропланшета добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000). Время взаимодействия с антивидовым конъюгатом составляло 15, 30, 45 или 60 мин при 37°C. Последующее определение активности связанной ферментной метки проводили, как описано выше.

Параметры кривых определяли на основании четырехпараметрического уравнения сигмоидной зависимости $y = (A1 - A2)/(1 + (x/x_0)^p) + A2$. Значения IC_{10} , IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} рассчитывались как концентрации, ингибирующие аналитический сигнал на 10, 20, 50 и 80% соответственно. Значение IC_{10} оценивали как предел обнаружения, IC_{20} – IC_{80} – рабочий диапазон определяемых концентраций.

Значения кросс-реактивности рассчитывали по формуле: $CR(\%) = IC_{50}(ДБФ)/IC_{50}(аналог) \times 100\%$.

Подготовка образцов сока. Мандариновый сок получали прямым отжимом. Мандариновые дольки очищали от кожуры и перетирали в чистой фарфоровой ступке пестиком. Затем сок сливали в стеклянную колбу, а мякоть отжимали через марлю. Образцы, содержащие и не содержащие ДБФ, готовили следующим образом. К 1 мл сока добавляли раствор ДБФ, 1 мл метанола и выдерживали в течение 12 ч. Из полученных таким образом искусственно контаминированных и отрицательных неконтаминированных образцов экстрагировали ДБФ. Экстракцию проводили в стеклянных флаконах, затем центрифугировали 15 мин при 10000 g при 4°C, отделяли супернатант и использовали в ИФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез конъюгата гаптен-белок и проверка реагентов в ИФА. Аминопроизводное ДБФ конъюгировали с белком-носителем овальбумином методом азосочетания, как описано в предыдущей работе [21], поскольку ДБФ не имеет функциональных групп, доступных для конъюгирования. Полученный конъюгат характеризовали методами UV-vis и ИК-спектроскопии. Спектральные пики при 277 и 330 нм конъюгата ОВА-ДБФ соответствовали поглощению белка и ковалентно связанного гаптена (рис. 1). Пик поглощения для нативного ДБФ – 295 нм. При синтезе использовали избыток гаптена, поэтому для очистки от несвязавшегося гаптена и компонентов реакционной среды применяли диализ.

На рис. 2 приведены спектры ИК-Фурье исходного овальбумина и его конъюгата с ДБФ, интерпретация которых основана на объяснении колебательных спектров аминокислот, входящих в состав белка. Согласно [36], в колебательных

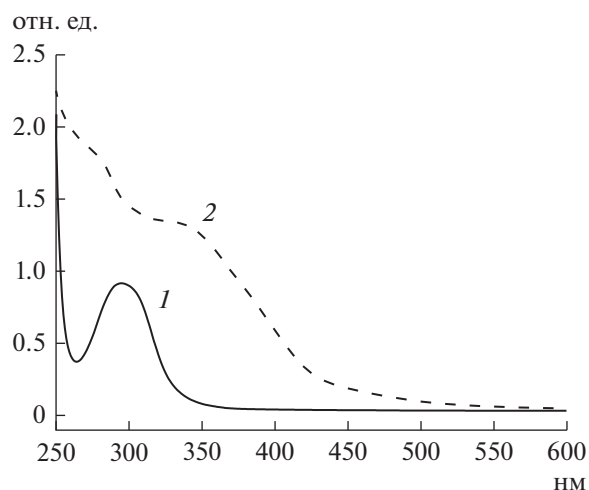


Рис. 1. Спектры поглощения ДБФ (1) и конъюгата ОВА-ДБФ (2).

спектрах белковых молекул можно выделить колебания амидной группы полипептидов, характерные частоты которых находятся в диапазонах 1700–1600, 1575–1480 и 1230–1300 cm^{-1} . Зарегистрированные ИК-спектры демонстрировали полосу поглощения при 1645 cm^{-1} (рис. 2а), обусловленную валентными колебаниями C=O групп пептидных цепей. Такие колебания отражают изменение геометрии молекул, а также возникновение или изменение водородных связей между пептидными группами [37]. Валентные колебания C–N дают ИК-спектре пик при 1549 cm^{-1} . Наличие данной полосы поглощения отражает изгиб NH [38]. Деформационные колебания связи N–H характеризовались полосой при 1248 cm^{-1} . Функциональные группы ДБФ повторялись также и в молекуле конъюгата с имеющимися сложноэфирными связями, что затрудняло индивидуальное распознавание соединений в ИК-спектре. Взаимодействие привело к появлению новых полос 1725, 2920 и 2867 cm^{-1} , связанных с растяжением карбонильной группы сложноэфирной группировки, а также насыщением C–H симметричных/асимметричных валентных колебаний алкильных групп [39, 40]. Таким образом, ИК-Фурье-спектры подтвердили успешность синтеза конъюгата ОВА-ДБФ.

Полученный конъюгат использовали вместе с другими конъюгатами (СИТ-ДБФ и коммерческим препаратом БСА-ДБФ) для оценки антител в неконкурентном и конкурентном форматах ИФА. Первый вариант применяли для определения концентрации антител, необходимой для проведения конкурентного взаимодействия. Как видно на рис. 3а, антитела связываются со всеми конъюгатами гаптен-белок, но разведения, соответствующие оптической плотности 1.0, различались. Для конъюгатов ОВА-ДБФ, СИТ-ДБФ и БСА-ДБФ эти концентрации составили 1174, 94 и 156.5 нг/мл соответственно, которые и были выбраны для кон-

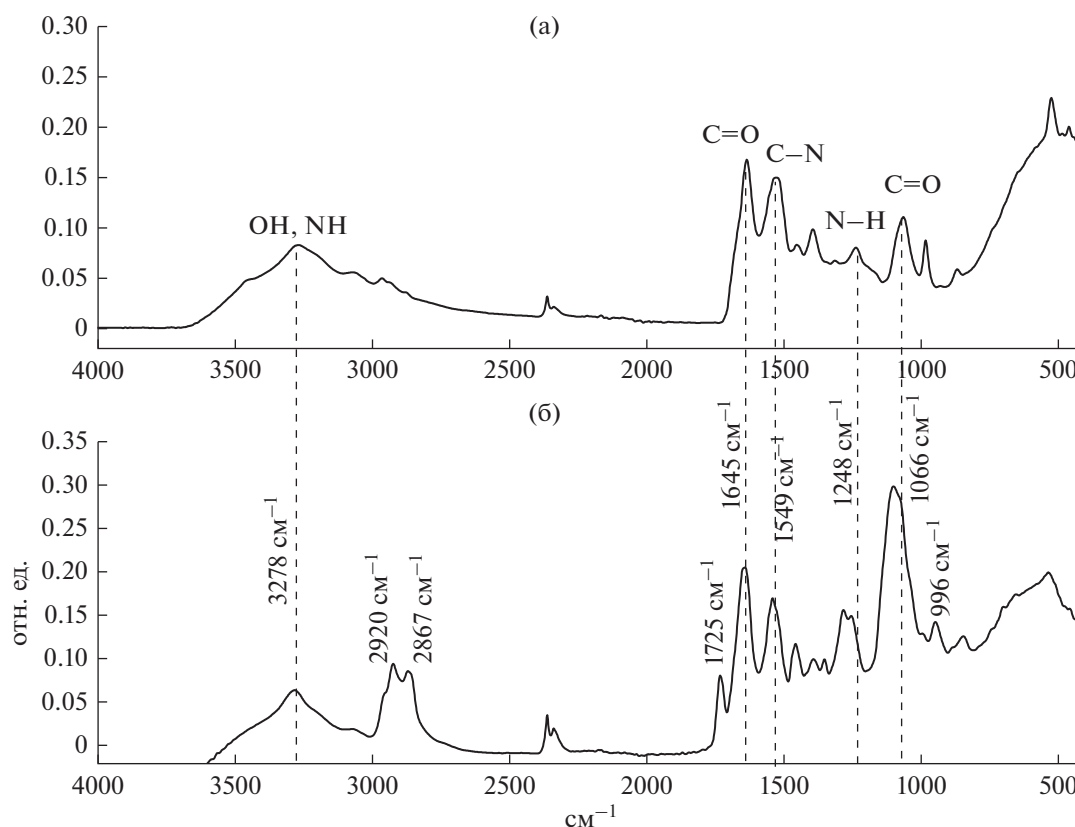


Рис. 2. ИК-спектры нативного ОВА (а) и конъюгата ОВА-ДБФ (б).

курентного ИФА (рис. 3б). Однако конъюгат БСА-ДБФ продемонстрировал высокий фоновый сигнал и низкие соотношения сигнал/фон, тогда как другие два конъюгата были пригодны для использования в ИФА. Отметим, что наиболее чувствительное определение ДБФ обеспечивал конъюгат ОВА-ДБФ, который и был выбран для дальнейшей работы.

Конкурентный ИФА ДБФ при различных кинетических режимах и выбор оптимального протокола. Выбранная пара иммунореагентов (антитела и конъюгат ОВА-ДБФ) использовалась в конкурентном ИФА при времени конкурентного взаимодействия 8, 15, 30 и 60 мин (рис. 4). Как видно на рис. 4а, с течением времени происходило нарастание оптической плотности и увеличение соотношения сигнал/фон. Проведение конкурентной стадии в течение 8 и 15 мин было исключено в связи с недостоверностью получаемых данных. Слишком узкий диапазон определяемых концентраций и низкие отношения сигнал/фон не позволяли различить образцы, содержащие и не содержащие ДБФ. Значения ошибок для режимов 8 и 15 мин составили 4–11 и 3–19% соответственно. Однако за 30 мин в системе устанавливалось равновесие, рабочий диапазон (IC_{20} – IC_{80}) составлял от 0.4 до 100 нг/мл с пределом обнаружения 0.15 нг/мл. Значения среднеквадратичных отклонений в этом диапазоне – 4.4–8.3%. При проведении конкурентной реакции в течение 60 мин

происходило еще большее возрастание сигнала с одновременным сужением и смещением рабочего диапазона до 0.5–40 нг/мл с пределом обнаружения 0.3 нг/мл. Значения среднеквадратичных отклонений в этом диапазоне составили 0.4–11%. С учетом широты линейного диапазона и значений предела обнаружения время проведения конкурентной реакции было выбрано равным 30 мин.

Для выбора оптимального протокола взаимодействия в иммуноферментной системе рассматривались также варианты с предварительным инкубированием антигена (ДБФ) со специфическими антителами, а также сокращение времени взаимодействия с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой. Стадия предварительного инкубирования проводилась вне микропланшета в микропробирках для разделения во времени взаимодействия антител со свободным и конъюгированным ДБФ. С увеличением времени предварительного взаимодействия предел обнаружения возрастал с 0.3 до 0.71 нг/мл, но рабочий диапазон определяемых концентраций становился шире (см. табл. 1). По сравнению с экспериментом без предынкубации, в котором диапазон концентраций составил 0.95–47.5 нг/мл, при времени выдерживания реакционной смеси 30 мин рабочий диапазон составил 1.82–82.83 нг/мл. Однако значение IC_{50} при этом возрастало с 6.7 до 12.3 нг/мл. Таким образом, стадия предварительного инкубирования не только увеличивала время анализа, но и ухуд-

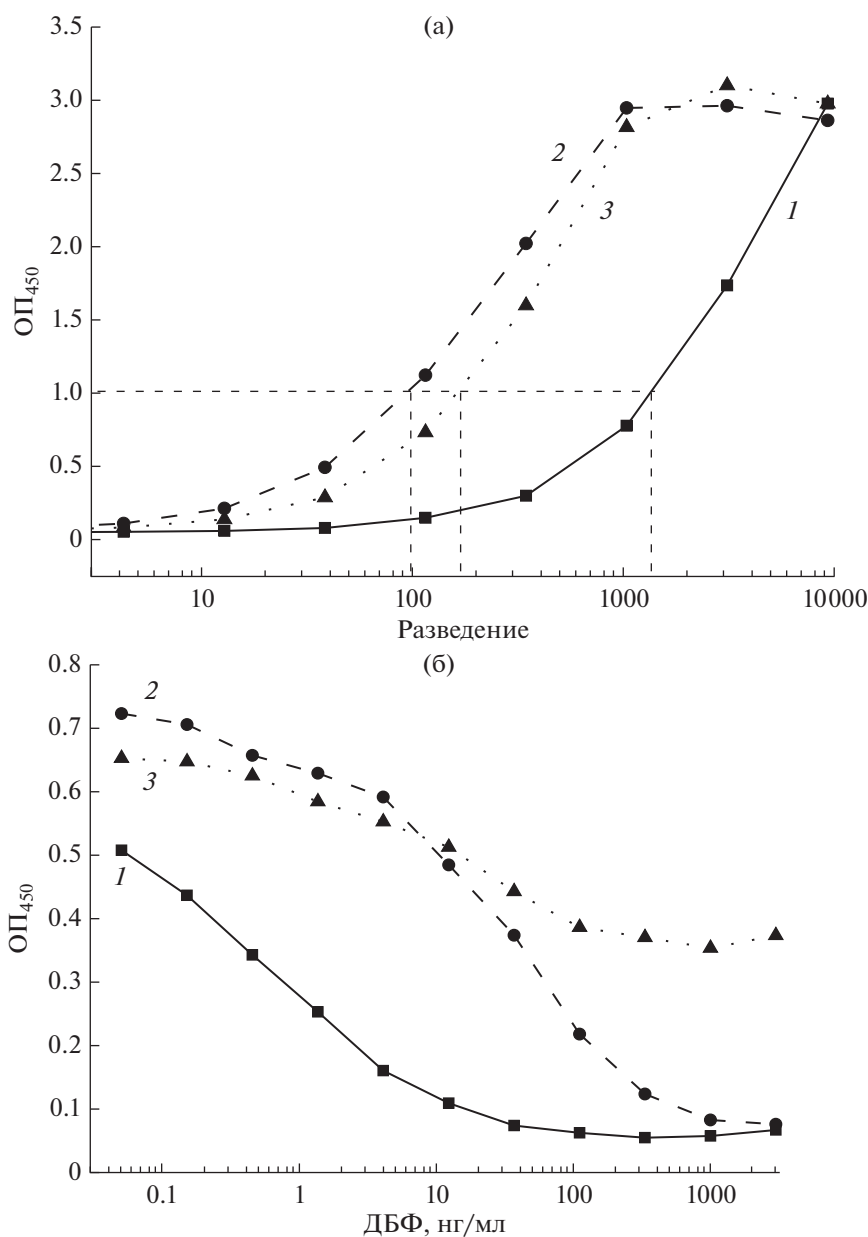


Рис. 3. Характеристика антител методом ИФА: а — титрование антител, б — кривые конкурентного взаимодействия: 1 — конъюгат ОВА-ДБФ, 2 — СИТ-ДБФ, 3 — БСА-ДБФ.

шила чувствительность определения ДБФ. Поэтому дальнейшие эксперименты проводили без использования этой стадии.

При выбранном времени конкурентного взаимодействия (30 мин) оптимизировали условия взаимодействия с антивидовым конъюгатом. Обычно продолжительность этой стадии в ИФА составляет 45–60 мин. Однако эксперимент показал, что с увеличением продолжительности стадии увеличивался предел обнаружения с 0.08 нг/мл для инкубации в течение 15 мин до 0.64 нг/мл для 45 мин (табл. 1). Ухудшались и другие аналитические характеристики — IC_{50} и ширина диапазона определяемых концентраций, поэтому время взаимо-

действий на данной стадии было выбрано равным 15 мин, а общая продолжительность ИФА составила 45 мин.

Изучение селективности ИФА. Для оценки селективности анализа были исследованы в качестве конкурентов тринадцать соединений, являющихся гомологами, метаболитами либо продуктами частичного гидролиза ДБФ, поскольку химические структуры многих фталатов очень сходны. Из всех изученных соединений только диэтилфалат продемонстрировал незначительный уровень кросс-реактивности (0.001%); другие моно- и дизамещенные производные, а также фталевая кислота не показали достоверных кросс-реакций. С близки-

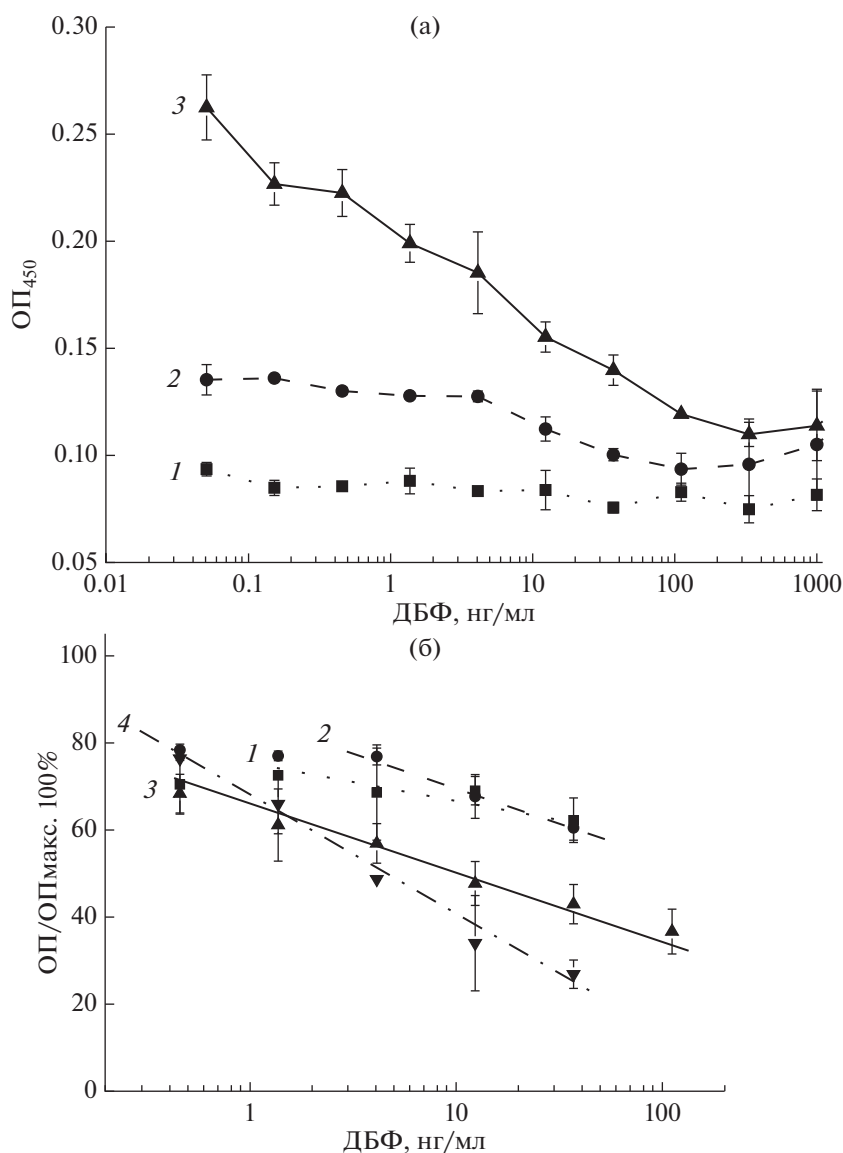


Рис. 4. Концентрационные зависимости ИФА ДБФ при разной длительности конкурентного взаимодействия: а — абсолютные значения оптической плотности, б — значения оптической плотности в % и рабочие диапазоны ИФА: 1 — 8 мин, 2 — 15 мин, 3 — 30 мин, 4 — 60 мин.

ми гомологами, например, диоктилфталатом, перекрестные взаимодействия не наблюдались, хотя это соединение отличается от ДБФ лишь длиной радикала. Таким образом, разработанный ИФА высокоселективен по отношению к целевому аналиту — ДБФ.

Применение ИФА для тестирования образцов соков. Для анализа использовали свежевыжатый мандариновый сок, в котором, в отличие от коммерческих продуктов, отсутствуют стабилизирующие и консервирующие агенты и исключено вымывание фталатов из упаковочного материала [41–43]. Исключив эти риски, рассматривали способы получения экстрактов для изучения влияния окружения на экстракцию ДБФ. Экстракцию

проводили в метаноле в стеклянной бюксе в темноте (экстракт 1), в пластиковой пробирке (экстракт 2) и используя перенос экстракта, полученного в стекле, в пластиковую пробирку с хранением в течение ночи (экстракт 3). После экстракции образцы центрифугировали для удаления остатков мякоти и присутствующих в ней нерастворимых соединений. Параллельно были получены экстракты сока без добавления ДБФ (отрицательные образцы). Эти образцы использовали для оценки влияния матрикса. Если экстракция проходила полностью, без потерь аналита, то кривые в чистом матриксе, в который вводили ДБФ непосредственно перед анализом, и в образце после экстракции должны были совпадать. Как видно из табл. 2, способ получения и хранения экстракта имел большое значение при работе с фталатами. Проведение

Таблица 1. Аналитические характеристики при различных режимах ИФА ДБФ

Продолжительность взаимодействия, мин	IC ₁₀ , нг/мл	IC ₂₀ , нг/мл	IC ₈₀ , нг/мл	IC ₅₀ , нг/мл	Параметры сигмоидных кривых
С предварительным инкубированием антиген – антитело					
10	0.53	1.36	33.17	6.71	A1 = 0.43 A2 = 0.18 x ₀ = 6.71 p = 0.87
20	0.71	1.98	65.16	11.37	A1 = 0.37 A2 = 0.12 x ₀ = 11.37 p = 0.79
30	0.60	1.82	82.83	12.28	A1 = 0.42 A2 = 0.14 x ₀ = 12.28 p = 0.73
Стадия взаимодействия с антивидовым конъюгатом					
15	0.08	0.37	68.34	5.01	A1 = 0.17 A2 = 0.06 x ₀ = 5.01 p = 0.53
30	0.12	0.47	48.95	4.77	A1 = 0.27 A2 = 0.08 x ₀ = 4.77 p = 0.60
45	0.64	1.70	48.95	9.14	A1 = 0.33 A2 = 0.11 x ₀ = 9.14 p = 0.83
60	0.30	0.95	47.45	6.70	A1 = 0.24 A2 = 0.11 x ₀ = 6.70 p = 0.71

экстракции в стеклянной емкости позволило достоверно обнаружить ДБФ, процент обнаружения составил 75–98%. Значительные сложности с выявлением целевого анализата наблюдались при проведении экстракции в пластиковой пробирке: в экстрактах обнаруживалось лишь 2–5% от исходной концентрации ДБФ. При переносе экстракта из стекла в пластиковую пробирку и выдерживании в течение 8–10 ч при 4°C также происходили существенные потери: обнаруживалось только 20–40% от исходного количества. Вероятно, имела место неспецифическая сорбция ДБФ на стенки пробирок, что обуславливало снижение концентрации ДБФ в экстрактах. Из полученных результатов следует, что необходимо предпочтительно и готовить, и хранить экстракты в стеклянных емкостях, поскольку состав пластиковых материалов может существенным образом влиять на экстракцию и сорбцию–десорбцию. Однако это условие не учитывается в публикациях по детек-

ции фталатов в различных образцах, что вызвало необходимость изучения при проведении данной работы.

Сравнение с ранее разработанными ИФА дибутилфталата (табл. 3) показало, что проведенная работа позволила сократить продолжительность анализа без потери чувствительности в 4 раза. Использование альтернативных меток вместо пероксидазы в работах [44, 45] увеличивало чувствительность анализа, но не сокращало его продолжительность. Установлено, что испытанный ИФА может быть использован для тестирования образцов соков и перспективен для разработки и применения.

Таким образом, впервые разработан кинетический иммуноферментный анализ ДБФ. Проведено сравнение параметров ИФА при варьировании длительности конкурентной стадии, выбранное время – 30 мин. Показана селективность

Таблица 2. Результаты ИФА ДБФ в искусственно контаминированных образцах мандаринового сока при экстракции метанолом в разных условиях

Добавлено, нг/мл	Обнаружено					
	экстракт 1		экстракт 2		экстракт 3	
	нг/мл	%	нг/мл	%	нг/мл	%
1	0.75	75	<0.1	НД*	<0.1	НД*
10	8.7	87	0.2	2.0	4.0	40
50	44	88	1.0	2.0	10	20
100	98	98	5.0	5.0	20	20

* НД – не детектируется

Таблица 3. Характеристики определения ДБФ методом ИФА

Вид и продолжительность ИФА	Предел обнаружения, нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл	Образец	Ссылка
Классический, 3 ч	4.0	НД	Молоко, вода, напитки	[31]
ИФА с двойным сигналом, 3 ч	3.9	7–167	Вода	[44]
ИФА с двойным сигналом, 3 ч	0.24	1.0–145	Вода и напитки	[45]
Классический, 3 ч	21.5	НД	Спиртные напитки	[46]
Классический, 3 ч	10.5	25.2–445	Озерная вода	[47]
Кинетический ИФА, 45 мин	0.08	0.37–68.34	Соки цитрусовых	Данная работа

разработанного ИФА к ДБФ и его пригодность для тестирования фруктовых соков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00306).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen Y., He Q., Shen D., Jiang Zh., Eremin S.A., Zhao S. // Food Control. 2019. V. 105. P. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.052>
- Huang Zh., Tu Ch., Liu H., Wang L., Zhu Z., Watanabe I. // J. Chromatogr. A. 2020. V. 1619. Article 460953. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460953>
- Yan Y., Lu Y., Wang B., Gao Y., Zhao L., Liang H., Wu D. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2018. V. 10. № 31. P. 26539–26545. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b08934>
- Tang M., Wu Y., Deng D., Wei J., Zhang J., Yang D., Li G. // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 258. P. 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.120>
- Giuliani A., Zuccarini M., Cichelli A., Khan H., Reale M. // Int. J. Environ. Health Res. 2020. V. 17. № 16. Article 5655. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165655>
- Zhou Y., Li J., Zhang L., Ge Z., Wang X., Hu X., Xu T., Li P. // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. № 22. P. 5691–5701. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01947-3>
- Luo H., Liu C., He D., Sun J., Li J., Pan X. // Sci. Total Environ. 2022. V. 849. Article 157951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157951>
- Guo W., Li J., Luo M., Mao Y., Yu X., Elskens M., Baeyens W., Gao Y. // Water Res. 2022. V. 214. Article 118189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118189>
- Zhu N., Zou Y., Huang M., Dong S., Wu X., Liang G., Han Z., Zhang Z. // Talanta. 2018. V. 186. P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.023>
- Baranovskaya V.S., Berlina A.N., Eremin S.A. // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 4. P. 466–472. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040037>
- Montuori P., Jover E., Morgantini M., Bayona J.M., Triassi M. // Food Addit. Contam. – Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 2008. V. 25. № 4. P. 511–518. <https://doi.org/10.1080/02652030701551800>
- Adeniyi A.A., Okedeyi O.O., Yusuf K.A. // Environ. Monit. Assess. 2011. V. 172. № 1. P. 561–569. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1354-2>
- Luís C., Algarra M., Câmara J.S., Perestrelo R. // Toxics. 2021. V. 9. № 7. Article 157. <https://doi.org/10.3390/toxics9070157>
- Otero P., Saha S.K., Moane S., Barron J., Clancy G., Murray P. // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2015. V. 997. P. 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.036>
- Barciela-Alonso M.C., Otero-Lavandeira N., Bermejo-Barrera P. // Microchem. J. 2017. V. 132. P. 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.007>
- Sakaki J.R., Melough M.M., Provatas A.A., Perkins Ch., Chun O.K. // Toxicol. Rep. 2020. V. 7. P. 1020–1024. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.015>
- Wang X., Chen Ch., Chen Y., Kong F., Xu Zh. // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. № 1. P. 811–836. <https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1774746>
- Liu S., Cheng R., Chen Y., Shi H., Zhao G. // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 254. P. 1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.003>
- Zhang Z., Zeng K., Liu J. // Trends Anal. Chem. 2017. V. 87. P. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.002>
- Li J., Jin H., Wei M., Ren W., Wang J., Zhang Y., Wu L., He B. // Sens. Actuators B Chem. 2021. V. 331. Article 129401. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129401>
- Berlina A.N., Ragozina M.Y., Komova N.S., Serebrennikova K.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosensors.

2022. V. 12. № 11. Article 1002.
https://doi.org/10.3390/bios12111002
22. Xu F., Ren K., Yang Y.-Z., Guo J.-P., Ma G.-P., Liu Y.-M., Lu Y.-Q., Li X.-B. // J. Integr. Agric. 2015. V. 14. № 11. P. 2282–2295.
https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61121-2
 23. Sanchis A., Salvador J.P., Marco M.P. // Trends Anal. Chem. 2018. V. 106. P. 1–10.
https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.015
 24. Sun R., Zhuang H. // Food Anal. Methods. 2015. V. 8. № 8. P. 1990–1999.
https://doi.org/10.1007/s12161-014-0085-3
 25. Jaria G., Calisto V., Otero M., Esteves V.I. // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. № 17. P. 3983–4008.
https://doi.org/10.1007/s00216-020-02509-8
 26. Dou L., Zhang Y., Bai Y., Li Y., Liu M., Shao Sh., Li Q., Yu W., Shen J., Wang Zh. // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. № 4. P. 976–991.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06750
 27. Huebner M., Weber E., Niessner R., Boujday S., Knopp D. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 29. P. 8873–8882.
https://doi.org/10.1007/s00216-015-9048-9
 28. Chen Y., Li J., Lu P., Hu D., Xue W., Ding X. // Food Agric. Immunol. 2017. V. 28. № 5. P. 904–915.
https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1320356
 29. Liu Z., Zhang Z., Zhu G., Sun J., Zou B., Li M., Wang J. // Sci. Total Environ. 2016. V. 551–552. P. 484–488.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.017
 30. Xiong Y., Leng Y., Li X., Huang X., Xiong Y. // TrAC Trends Anal. Chem. 2020. V. 126. Article 115861.
https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115861
 31. Zhang Zh., Zhu N., Zou Y., Wu X., Qu G., Shi J. // Talanta. 2018. V. 179. P. 64–69.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.051
 32. Zhou L., Lei Y., Zhang D., Ahmed S., Chen S. // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 570–578.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.110
 33. Yanagisawa N., Dutta D. // Biosensors. 2011. V. 1. № 2. P. 58–69.
https://doi.org/10.3390/bios1020058
 34. Urusov A.E., Zherdev A.V., Petrakova A.V., Sadykhov E.G., Koroleva O.V., Dzantiev B.B. // Toxins. 2015. V. 7. № 2. P. 238–254.
https://doi.org/10.3390/toxins7020238
 35. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // Appl. Sci. 2021. V. 11. № 14. Article 6581.
https://doi.org/10.3390/app11146581
 36. Wang Y., He C.H., Zheng H., Zhang H.B. // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. № 1. P. 84–96.
https://doi.org/10.3390/ijms13010084
 37. Campanella B., Palleschi V., Legnaioli S. // ChemTexts. 2021. V. 7. № 1. P. 1–21.
https://doi.org/10.1007/s40828-020-00129-4
 38. Kong J., Yu S. // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2007. V. 39. № 8. P. 549–559.
https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x
 39. Ramesh S., Yin T.S., Liew C.-W. // Ionics. 2011. V. 17. № 8. P. 705–713.
https://doi.org/10.1007/s11581-011-0568-9
 40. Rajamanikyan M., Vadlapudi V., Parvathaneni S.P., Koude D., Sripadi P., Misra S., Amanchy R., Upadhyayula S.M. // EXCLI J. 2017. V. 16. P. 375–387.
https://doi.org/10.17179/excli2017-145
 41. Ye X., Wang P., Wu Y., Zhou Y., Sheng Y., Lao K. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2020. V. 27. № 33. P. 42082–42091.
https://doi.org/10.1007/s11356-020-10136-0
 42. Xu Zh., Xiong X., Zhao Y., Xiang W., Wu Ch. // J. Hazard. Mater. 2020. V. 384. Article 121282.
https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121282
 43. Rastkari N., Jeddi M.Z., Yunesian M., Ahmadvaniha R. // J. Environ. Health Sci. Eng. 2018. V. 16. № 1. P. 27–33.
https://doi.org/10.1007/s40201-018-0292-8
 44. Zhu F., Zhang H., Qiu M., Wu N., Zeng K., Du D. // Sci. Total Environ. 2019. V. 695. Article 133793.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133793
 45. Xiong D., Zhu N., Zhu F., Yakubu S., Lv J., Liu J., Zhang Z. // J. Hazard. Mater. 2022. V. 425. Article 127991.
https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127991
 46. Kuang H., Liu L., Xu L., Ma W., Guo L., Wang L., Xu C. // Sensors. 2013. V. 13. № 7. P. 8331–8339.
https://doi.org/10.3390/s130708331
 47. Wei C., Ding S., You H., Zhang Y., Wang Y., Yang X., Yuan J. // PLoS One. 2011. V. 6. № 12. Article e29196.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029196

Development of Kinetic Microplate Immunoenzyme Determination of Dibutyl Phthalate

A. N. Berlina^a, K. V. Serebrennikova^a, N. S. Komova^a, A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a, *}

^a A.N. Bach Institute of Biochemistry. Research Center of Biotechnology
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Phthalic acid esters are integral components of modern plastic products and packaging materials, which causes significant contamination of food products and the environment, leading to the need for simple productive monitoring methods. The article presents a rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of dibutyl phthalate (DBP) in fruit juices, based on the competitive interaction between free and bound antigen for the binding sites of specific antibodies. The analytical characteristics of the method were studied in various kinetic regimes of the competition stage. Optimal conditions have been established to ensure the minimum detection limit and high measurement accuracy. The duration of the competitive stage of ELISA was chosen 30 min; the range of determined concentrations of DBP was from 0.37 to 68.34 ng/mL with a detection limit of 0.08 ng/mL. The efficiency of the proposed ELISA for testing fruit juices was shown for the chosen DBP extraction mode.

Keywords: immunoenzyme assay, kinetics of immune interactions, dibutyl phthalate, food safety, fruit juice, extraction, ecotoxicant