БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2005, том 31, № 1, с. 108–112

УДК 547.943:57.083.3

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МОРФИНА В ВОДНЫХ ОБРАЗЦАХ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ КОЛЛОИДНЫМ ЗОЛОТОМ

© 2005 г. **И. А. Любавина*#, А. А. Зинченко*, М. И. Лапенков**, Т. Л. Николаева****

**Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;*

***Российский гематологический научный центр РАМН, Москва*

Поступила в редакцию 11.03.2004 г. Принята к печати 06.05.2004 г.

Разработан простой и доступный экспресс-метод обнаружения морфина в водных образцах с помощью конкурентной иммунохроматографии. В качестве детектирующего агента использовали комплекс моноклональных антител против морфина с коллоидным золотом. Предел обнаружения морфина в водной пробе 10 нг/мл, время определения 5 мин.

Ключевые слова: морфин, комплекс моноклональные антитела к морфину–коллоидное золото, иммунохроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка аналитических методов, позволяющих проводить оперативное обнаружение наркотических препаратов в различных пробах, имеет важное социальное и медицинское значение. Одним из наиболее распространенных наркотиков является морфин – наркотический анальгетик, относящийся к опийным алкалоидам, обычно употребляемый в виде гидрохлорида [1].

Для скринингового контроля повышенного содержания морфина в биологических жидкостях (слюна, моча, кровь/сыворотка крови/плазма крови и т.д.) используются различные методы: качественные (иммунохроматография [2, 3], ИФА [4, 5]) и количественные (ИФА [1, 5], РИА [6], поляризационная флуориметрия [7], газовая хроматография [8, 9]).

В качестве методов, подтверждающих наличие в образце наркотического препарата, используются газовая и жидкостная хроматомасс-спектрометрия [10, 11].

В настоящее время одним из наиболее распространенных аналитических методов для первоначального обнаружения повышенного содержания морфина в организме является иммунохроматография [7, 12]. Широкое использование этого метода обусловлено коротким временем анализа (до 10 мин), невысокой стоимостью теста, простой и доступной процедурой определения, не требующей никаких дополнительных приспособлений.

Цель данного исследования – разработка высокочувствительного качественного иммунохроматографического метода обнаружения морфина в водных образцах с использованием поливалентного антигена – конъюгата морфина с овальбумином (M-OVA) и комплекса моноклональных антител с коллоидным золотом (AT-gold).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунохроматографическое определение гидрохлорида морфина (в дальнейшем морфина) основано на принципе конкурентного иммуноанализа, при котором морфин, находящийся в определяемом водном образце, конкурирует с морфином, иммобилизованным на твердой фазе, за центры связывания ограниченного количества моноклональных антител против морфина, меченных коллоидным золотом [12, 13]. Комплекс моноклональных антител с коллоидным золотом был синтезирован нами по методике [14].

Визуализирующую способность полученного комплекса характеризовали с помощью метода

Сокращения: AT – моноклональные антитела против морфина; AT-gold – комплекс моноклональных антител морфина с коллоидным золотом; HRP – пероксидаза хрена; M-OVA – поливалентный конъюгат овальбумина с морфином; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBST – PBS, содержащий 0.05% Твин-20; PBS/OVA – PBS, содержащий овальбумин (2 мг/мл); PBST/OVA – PBST, содержащий овальбумин (2 мг/мл); ИФА – иммуноферментный анализ; РИА – радиоизотопный анализ.

#Автор для переписки (тел.: (095) 330-66-74; эл. почта: lia@ibch.ru).

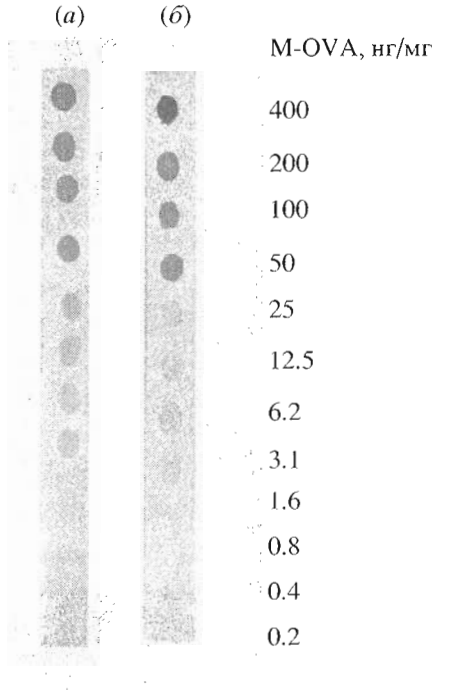

Рис. 1. Обнаружение M-OVA методом дот-иммуноанализа с использованием: AT-gold (*а*); AT-HRP (*б*).

дот-анализа в модельной системе, определяя поливалентный антиген M-OVA, точечно нанесенный на полоски нитроцеллюлозной мембраны и растворенный кратно двум, начиная с концентрации 400 мкг/мл или 400 нг/точку.

В качестве контроля при проведении дот-определения использовали конъюгат антител против морфина с пероксидазой хрена (AT-HRP), синтезированный стандартным методом [15]. На рис. 1 показано, что предел обнаружения морфина с помощью AT-gold и с помощью AT-HRP одинаков и составляет 3.1 мкг/мл или 3.1 нг/точку.

Стабильность полученного комплекса в условиях хранения при различных температурах характеризовали, сравнивая предел обнаружения M-OVA в модельной системе. При 4°C чувствительность определения M-OVA не менялась в течение 12 мес., при температуре 22°C чувствительность была неизменной в течение 8 мес., а затем уменьшалась.

Для проведения иммунохроматографического анализа использовали тест-полоски, предоставленные фирмой "Fisher Scientific" (Великобритания). Схематическое изображение тест-полоски приведено на рис. 2.

Основу тест-полоски составляет полистирол с клеевой поверхностью, в центре которого закреплена нитроцеллюлоза, используемая как тестовая зона. Ниже и выше прикреплены целлюлозные мембраны, создающие впитывающий и поглощающий участки.

Первоначально на нитроцеллюлозную мембрану в виде линии наносили поливалентный антиген M-OVA (конъюгат содержит примерно 8–10 моль морфина на 1 моль OVA), который образует детектируемую полосу. Выше детектируемой полосы в виде линии наносили антимышинные антитела, которые образуют контрольную полосу, показывающую при проведении тестирования, работает ли тест-система. Интенсивность окраски контрольной полосы является стандартом для оценки результатов выявления морфина.

На верхнюю часть впитывающего участка целлюлозы наносили комплекс AT-gold. После этого полоски высушивали 12 ч при комнатной температуре.

Для проведения анализа тест-полоску опускали в водный раствор образца впитывающим участком до места нанесения конъюгата. Под действием капиллярных сил образец поднимался вверх и взаимодействовал с нанесенным выше комплексом AT-gold, после чего реакционная смесь поступала в тестовую зону полоски, где происходило связывание морфина, сорбированного на твердой фазе, и меченых антител. Результат реакции оценивали визуально по образованию детектируемой полосы розового цвета. Не связавшиеся компоненты реакции поступали в поглощающую зону тест-полоски, отделяясь таким образом от компонентов реакционной смеси.

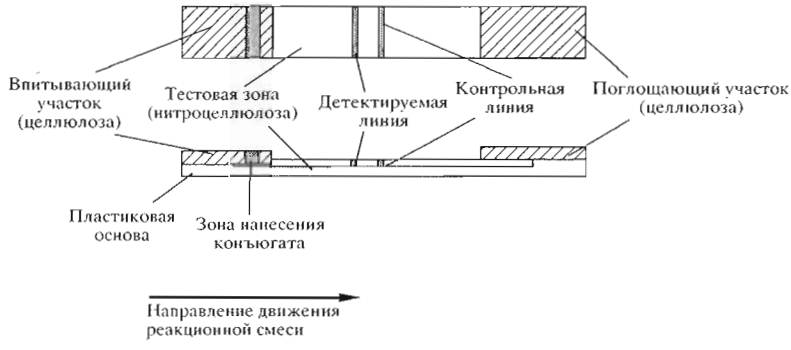

Рис. 2. Схематическое изображение тест-полоски для проведения иммунохроматографии.

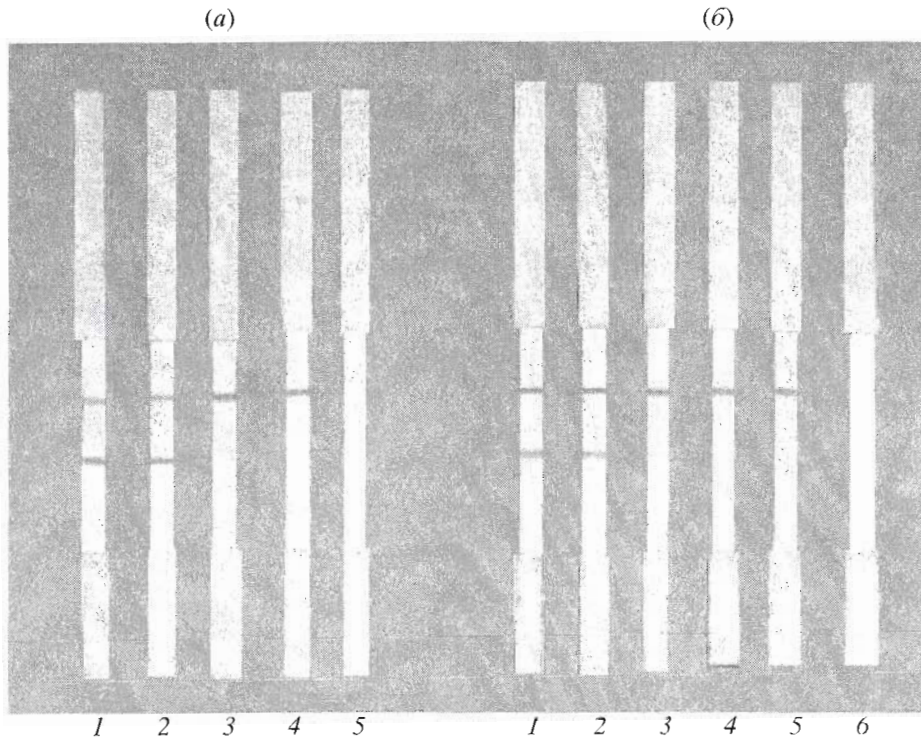

Рис. 3. Обнаружение морфина в водных образцах методом иммунохроматографии. Концентрации морфина в пробах (нг/мл): для *а*) 2.5 (*1*), 5 (*2*), 10 (*3*), 15 (*4*), определение не достоверно, так как не проявилась контрольная полоса (*5*); для *б*) 1.25 (*1*), 2.5 (*2*), 5 (*3*), 10 (*4*), 15 (*5*), определение не достоверно, так как не проявилась контрольная полоса (*6*). Концентрации M-OVA 0.5 (*а*) и 2 мкг/мл (*б*). Концентрация AT-gold 1 OE_{520}/мл.

Свободный морфин, содержавшийся в образцах, и морфин, связанный с твердой фазой, конкурировали за центры связывания меченых антител. При низком содержании морфина в испытуемых образцах большая часть меченых антител взаимодействовала с морфином, связанным с твердой фазой, образуя в результате детектируемую полосу. При определенной концентрации свободного морфина происходило полное ингибирование реакции между связанным поливалентным антигеном и мечеными антителами, т.е. детектируемая полоса не наблюдалась. Через 2–5 мин процесс определения полностью завершался.

Результаты определения оценивали визуально в течение 5–15 мин после образования контрольной полосы и интерпретировали следующим образом: образование в тестовой области тест-полоски контрольной и детектируемой полос розового цвета, близких по интенсивности окрашивания, указывало на то, что в испытуемой пробе либо совсем не было морфина, либо его концентрация была ниже 10 нг/мл; а выявление в тестовой области иммунохроматографической тест-полоски только одной контрольной полосы указывало на то, что содержание морфина в пробе было выше или равно 10 нг/мл. Если при проведении анализа в течение 5 мин не проявлялась контрольная полоса, тест повторяли.

При визуальной оценке результатов теста в зависимости от соотношения фон/сигнал определение может проходить по типу "+/–" (яркая полоса, полосы нет) или "+/±/–" (яркая полоса, неяркая полоса, полосы нет). Результаты типичного определения морфина представлены на рис. 3. Иммунохроматографическое выявление содержания морфина, представленное на рис. 3*а*, проходило по типу "+/–", предел обнаружения мофина 10 нг/мл. На рис. 3*б* представлены результаты выявления содержания морфина по типу "+/±/–", предел обнаружения морфина 10 нг/мл. Для оценки качественного иммунохроматографического выявления содержания морфина в водных пробах простым и доступным для интерпретации является результат определения по типу "+/–", в то же время для полуколичественного или количественного иммунохроматографического определения морфина подходит определение по типу "+/±/–".

В ходе работы нами было оптимизировано соотношение наносимых на тест-полоску антител, меченных коллоидным золотом, и поливалентного антигена, что позволило обеспечить максимальную чувствительность и специфичность теста. Варьирование концентрации комплекса AT-gold в пределах 0.5–4 OE_{520}/мл [14] при постоянной концентрации M-OVA показало, что нижний предел обнаружения морфина в водном растворе 10 нг/мл достигается

при концентрации комплекса AT-gold 1 OE_{520}/мл. Уменьшение концентрации комплекса AT-gold ниже 1 OE_{520}/мл приводило к снижению чувствительности теста, повышение концентрации не увеличивало чувствительность тест-системы, но приводило к возрастанию фонового окрашивания в тестовой зоне (данные не приводятся).

Изменение концентрации наносимого на тест-полоску поливалентного антигена M-OVA в пределах 0.5–2 мкг/мл при постоянной концентрации меченых моноклональных антител не приводило к изменению предела выявления морфина в водных образцах. При концентрации M-OVA меньше 0.5 мкг/мл чувствительность определения морфина снижалась, при концентрации M-OVA выше 2 мкг/мл изменения чувствительности выявления морфина не наблюдалось. Ингибирование реакции по типу "+/–" проходило при концентрации поливалентного антигена 0.5 мкг/мл и концентрации комплекса антител с коллоидным золотом 1 OE_{520}/мл.

Таким образом, разработанный нами конкурентный иммунохроматографический метод позволяет не только проводить качественное обнаружение повышенного содержания морфина в водных пробах, но также может служить моделью для разработки полуколичественного, а при использовании дополнительного оборудования, например, сканирующего устройства BioDot SR3000 (BioDot, Великобритания), и количественного экспресс-теста для определения содержания морфина в водных образцах.

Для определения специфичности разработанного нами теста были исследованы перекрестные реакции с несколькими структурно-родственными морфину соединениями (таблица). Работа проводилась на базе Российского центра криминалистики. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности предложенного метода.

В ходе испытаний разработанного нами теста было показано, что, изменив соотношение концентраций M-OVA и AT-gold, тест-систему можно использовать для обнаружения содержания морфина в пробах мочи с концентрацией наркотика 100 нг/мл и выше. Нами были исследованы пробы мочи 28 человек, предоставленные Российским центром криминалистики. Параллельно в качестве контроля содержание морфина в пробах определяли количественно с помощью ИФА-теста (Human, Германия). С его помощью было установлено, что в 17 пробах морфин не содержался или его концентрация была ниже 100 нг/мл, в 11 пробах концентрация морфина была выше или равна 100 нг/мл. С помощью разработанного нами иммунохроматографического теста положительный результат был получен в 12 пробах, отрицательный – в 16, т. е. результат одного иммунохроматографического определения был ложноположительным. Таким образом, чувствительность иммунохроматографического определения составила 100%, специфичность определения – 94%.

Результаты определения морфина и структурно-родственных соединений [16] методом конкурентной иммунохроматографии

Соединение	Минимальная определяемая концентрация, нг/мл
Морфин	10
Кодеин	40
Дионин (этилморфин)	40
Гидроморфон (дилаудид)	100
Морфин-3-глюкуронид	300
Меперидин (димерол)	10

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растворы калибраторов из ИФА-тест-системы для определения морфина (Human, Германия), хлорид золота (Fluka), цитрат натрия (Sigma), поливалентный антиген M-OVA (RDI, США). Моноклональные антитела против морфина были получены Т.Л. Николаевой, Российский гематологический центр РАМН. Конъюгат AT-HRP был синтезирован нами по методу [14].

Комплекс моноклональных антител против морфина с коллоидным золотом. Синтез комплекса AT-gold был описан нами ранее [13]. Оптимальной нагрузкой золя по антителам в пределах 0.1–1.6 мг/мл являлась нагрузка 0.4 мг/мл, что было показано, определяя чувствительность полученных комплексов. Комплексы хранили при 4°C. Рабочая концентрация AT-gold – 2 OE_{520}/мл для дот-определения, 1 OE_{520}/мл для иммунохроматографии.

Определение чувствительности комплекса AT-gold. На поверхность полосок нитроцеллюлозы (Schleicher and Schuell, Германия) точечно наносили по 1 мкл водного раствора поливалентного конъюгата M-OVA в разведении от 400 до 0.2 мкг/мл, полоски высушивали на воздухе и блокировали PBS/OVA 30 мин при комнатной температуре. Затем полоски высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Для проведения определения полоски помещали в раствор AT-gold (2 OE_{520}/мл в PBS/OVA) и раствор AT-HRP (4 мкг/мл в PBS/OVA), инкубировали 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании и трижды промывали PBST. При определении M-OVA с помощью пероксидазного конъюгата антител против морфина полоски дополнительно инкубировали в 50 мМ имидазольном буфере, pH 7.5, содержащем 2.0 мг/мл 1,4-хлорнафтола и 0.02% H_2O_2 с добавлением 0.2 мг/мл *орто-*

фенилендиамина и 0.1 мг/мл бисульфата натрия [15]. Каждое определение повторяли трижды.

Обнаружение морфина с помощью метода конкурентной иммунохроматографии. На середину нитроцеллюлозной мембраны готовой тест-полоски для иммунохроматографии (Fisher Scientifics) шириной 3 мм тонкой поперечной линией с помощью гамильтоновского шприца наносили 1 мкл поливалентного конъюгата M-OVA (0.5 мг/мл в PBS). На верхнюю часть впитывающего участка тест-полоски наносили 3 мкл комплекса моноклональных антител к морфину, меченных коллоидным золотом, концентрация 1 $ОЕ_{520}$/мл. Хроматографическую полоску высушивали 12 ч при комнатной температуре и хранили в герметично закрытой упаковке. Срок хранения иммунохроматографической полоски при комнатной температуре до 12 мес.

В лунках иммунологической микропланшеты готовили серию двукратных разведений раствора анализируемого образца в PBST объемом 100 мкл. Для проведения определения в лунки опускали впитывающую часть хроматографических пластин. За счет сил капиллярного всасывания раствор, содержащий морфин и комплекс антитело–коллоидное золото, поднимался вверх по полоскам со скоростью 1.5 см/мин. Через 3–4 мин результаты анализа оценивали визуально после образования контрольной полосы и интерпретировали следующим образом: выявление в тестовой области тест-полоски контрольной полосы ярко-розового цвета и детектируемой полосы розового цвета, имеющей интенсивность окрашивания, сравнимую с интенсивностью окрашивания контрольной полосы, указывало на то, что в пробе не содержится морфин или его содержание ниже 10 нг/мл. Выявление в тестовой области иммунохроматографической тест-полоски одной контрольной полосы означало, что содержание морфина в пробе выше или равно 10 нг/мл. Если в течение 5 мин анализа не выявлялась контрольная полоса, тест проводили повторно.

В качестве отрицательного контроля использовали раствор, не содержащий определяемого образца. Каждое определение повторяли трижды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kerrigan S., Phillips W.H.* // Clinical Chemistry. 2001. V. 47. P. 540–547.
2. Principles and Practice of Immunoassay / Eds Price C.P., Newman D.J. London: Macmillian Reference, 1999. P. 579–603.
3. *Albrecht R.M., Simmons S.R., Pawley J.B.* Immunochemistry. Oxford: Oxford Univ. Press, 1999. P. 151–176.
4. *Shou W.Z., Pelzer M., Addison T., Jiang X., Naidong W.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. V. 27. P. 143–152.
5. *Wilson J.F., Smith B.L.* // Ann. Clin. Biochem. 1999. V. 36. P. 593–600.
6. *Moody D.E., Cheever M.L.* // Anal. Toxicol. 2001. V. 25. P. 190–197.
7. *Moeller M.R., Kraemer T.* // Ther. Drug Monit. 2002. V. 24. P. 210–212.
8. *Ferrara S.D., Tedeschi L., Frison G., Brusini G., Castagna F., Bernardelli B., Soregaroli D.* // J. Anal. Toxicol. 1994. V. 18. P. 278–291.
9. *Moeller M.R., Steinmeyer S., Kraemer T.* // J. Chromatogr. Biomed. Sci. 1998. V. 713. P. 91–109.
10. *Niedbala R.S., Kardos K., Waga J., Fritch D., Yeager L., Doddamane S., Schoener E.* // J. Anal. Toxicol. 2001. V. 25. P. 310–315.
11. *Мелентьев А.Б.* // Мат. Всероссийской научно-практической конф. 23–24 сентября 1999 г. Санкт-Петербург, 1999. С. 23–26.
12. *Paek S.-H., Lee S.-H., Cho J.-H., Kim Y.-S.* // Methods. 2001. V. 25. P. 53–60.
13. *Любавина И.А., Зинченко А.А., Саломатина И.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Биоорган. химия. 2004. Т. 30. С. 201–207.
14. Антитела. Методы / Ред. Кэтти Д. Пер. с англ. М.: Мир, 1991. Кн. 2. С. 167.
15. *Kobayashi R., Tachima Y.* // Anal. Biochem. 1989. V. 183. P. 9–13.
16. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм / Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., Папазов И.П.,. Галузин К.А, Москаль И.В., Шибанова Н.И. М.: Нарконет, 2002. 228 с.

An Express Morphine Assay in Aqueous Samples by Immunochromatography Using Monoclonal Antibodies Labeled with Colloidal Gold

I. A. Lyubavina*#, A. A. Zinchenko*, M. I. Lapenkov, and T. L. Nikolaeva****

#Phone: +7 (095) 330-6674; e-mail: lia@ibch.ru
**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*
***National Hematology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novozykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia*

A simple and accessible express method was developed for the detection of morphine in aqueous samples using competitive immunochromatography. A complex of colloidal gold with monoclonal antibodies to morphine was used as the detection agent. The detection limit for morphine in aqueous samples was 10 ng/ml, and the analysis time was 5 min. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also http://www.maik.ru.

Key words: immunochromatography; monoclonal antibodies to morphine, complex with colloidal gold; morphine