

УДК 577.2.08

## ДЕТЕКЦИЯ ПИРЕТРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНО-КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

© 2013 г. А. Г. Буренин\*, М. П. Никитин\*, А. В. Орлов\*, Т. И. Ксенович\*\*, П. И. Никитин\*\*

\*Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, 117303  
e-mail: AGBurenin@gmail.com

\*\*Институт общей физики им. А.М. Прохорова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 7.09.2012 г.

Разработан безмаркерный метод на основе спектрально-корреляционной интерферометрии для высокочувствительной детекции пиретроидов с помощью конкурентного иммуноанализа на поверхности сенсорных чипов, в качестве которых используются широкодоступные микроскопные покровные стекла. Показано, что данный метод позволяет независимо оптимизировать каждую стадию модификации сенсорной поверхности, что может применяться для повышения эффективности разработки протоколов широкого круга иммуноанализов, использующих стеклянную поверхность в качестве твердой фазы. С помощью предложенного метода продемонстрирована регистрация на поверхности оптимизированных сенсорных чипов одного из наиболее стабильных метаболитов целого ряда пиретроидов – 3-феноксibenзойной кислоты – на уровне 15 пг/мл, что в 50 раз лучше чувствительности иммуноферментного анализа.

DOI: 10.7868/S0555109913030057

Пиретроиды – один из классов синтетических инсектицидов различных по строению, но сходных по механизму действия с пиретринами (естественные инсектициды, выделяемые такими растениями, как *Pyrethrum cinerariifolium* и *Tanacetum cinerariifolium*). Долгое время пиретроиды считались безопасными для человека [1], что способствовало их широкому применению в сельском хозяйстве, ветеринарии и санитарно-эпидемиологическом контроле. Как следствие, эти химические соединения в значительных количествах могут поступать в организм человека с продуктами питания и водой. В ходе последних исследований установлено, что пиретроиды могут оказывать негативное влияние на иммунную систему [2], вызывать нарушения в работе эндокринной системы [3] и даже обладать канцерогенным действием [4]. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется разработке методов контроля содержания этих веществ в продуктах питания, почве и естественных водоемах.

Поскольку сами молекулы пиретроидов быстро разлагаются под действием света, детекцию обычно осуществляют по их метаболитам. Среди производных, наиболее часто используемых для оценки загрязнения окружающей среды, про-

дуктов питания или дозы пиретроидов, попавших в организм человека, следует отметить 3-феноксibenзойную кислоту (**3-ФБК**) [5]. Этот метаболит был выбран в качестве маркера пиретроидов из-за своей стабильности и универсальности: он является продуктом деградации целого ряда пиретроидов второго поколения, например циперметрина, перметрина и дельтаметрина [6]. Отсутствие других распространенных источников 3-ФБК делают ее одним из самых часто употребляемых маркеров, используемых для экологического мониторинга [7].

Для детекции малых молекул, к которым относится 3-ФБК, традиционно используются жидкостная хроматография [8] и масс-спектрометрия [9]. Эти методы обладают высокой чувствительностью на уровне десятков пикограмм на 1 мл. Однако необходимость длительной пробоподготовки, высокая цена оборудования и расходных материалов ограничивают их применение.

В последнее время все большее развитие получают иммунологические методы детекции 3-ФБК [5, 7]. Это связано с тем, что иммуноанализ позволяет существенно сократить время пробоподготовки и значительно повысить специфичность анализа. Для детекции малых молекул, как правило, используется конкурентный иммуноферментный анализ (**ИФА**), позволяющий специфично определять вещества по их взаимодействию с антителами. Наиболее быстрые ИФА-методы дают возможность определять концентрацию вещества в образце за 2 ч [7] при пределе детекции, на уровне

Список сокращений. ППР – поверхностный плазмонный резонанс, ДМФА – диметилформамид, 3-ФБК – 3-феноксibenзойная кислота, БСА – бычий сывороточный альбумин, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан, ГОТС – глицидоксипропилтриэтоксисилан.

нескольких нанограмм на 1 мл, что достаточно для многих практических целей.

Использование оптических безмаркерных методов на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [10] позволяет значительно сократить время анализа, например до 0.5 ч при регистрации атразина [11]. Более того, такие методы дают возможность наблюдать также кинетику сорбции биомолекул, что увеличивает динамический диапазон анализа. Коммерчески доступные биосенсорные системы, основанные на ППР, хорошо зарекомендовали себя как удобный инструмент для проведения биохимических исследований. Однако их применение для задач экологического мониторинга и иммунодиагностики затруднено в силу высокой стоимости расходных материалов – сенсорных чипов. Это связано с тем, что для таких методов необходимо с точностью до единиц нанометров напылять пленки золота. Кроме того, ППР-методы обладают паразитной чувствительностью к объемному показателю преломления, который, в свою очередь, сильно зависит от температуры исследуемой жидкости.

Ранее авторами данной работы был предложен метод спектрально-корреляционной интерферометрии [12, 13] для высокочувствительной регистрации в реальном времени биохимических реакций на сенсорных чипах, в качестве которых могут применяться недорогие покровные микроскопные стекла без нанесения каких-либо металлических или диэлектрических покрытий. Этот метод позволяет регистрировать изменение усредненной по поверхности сенсорного чипа оптической толщины слоя молекул, сорбировавшихся за время протекания биохимической реакции. Такой подход обеспечивает сигнал, не зависящий от показателя преломления исследуемого раствора. Метод спектрально-корреляционной интерферометрии был успешно использован для разнообразных иммунохимических исследований [14], выявления механизмов действия лекарственных препаратов [15], изучения взаимодействия белков с новыми полимерами [16], детекции ряда аутоантител в сыворотке крови человека [17].

Цели работы – адаптация спектрально-корреляционного интерферометрического метода для высокочувствительной детекции ряда пиретроидов по их стабильному метаболиту – 3-ФБК, а также разработка с помощью данного метода протоколов модификации поверхности стекла для использования в качестве твердой фазы для широкого круга иммуноанализов.

## МЕТОДИКА

**Реагенты.** В работе использовались серная кислота ( $H_2SO_4$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), диметилформамид (ДМФА) (квалификация о.с.ч.,

“Диаэм”, Россия), метанол ( $CH_3OH$ ) (маркировка “Аналитический реагент”, “LabScan”, США), биотин, биотин-NHS, бычий сывороточный альбумин (БСА), малеимидо-R-N-сукцинимидный эфир (“Sigma-Aldrich”, США), стрептавидин (“Thermo Scientific”, США). Все прочие реактивы имели маркировку “Аналитический реагент”.

**Иммунореагенты.** 3-феноксibenзойная кислота, конъюгат 3-ФБК с БСА и кроличья антисыворотка на него, титр 1 : 10000, были предоставлены Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболensk, Россия).

**Приготовление буферов.** Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – NaCl 130 мМ, KCl 3 мМ,  $Na_2HPO_4$  10 мМ,  $KH_2PO_4$  2 мМ, pH 7.4. Для приготовления карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ) использовались готовые таблетки (“Sigma-Aldrich”, США, pH 8.6). Блокирующий буфер (ББ) состоял из КББ и 10 мМ глицина. Для конъюгации использовался буфер (КБ) со следующим составом: 100 мМ  $Na_2CO_3$ , 300 мМ NaCl, pH 8.5.

**Метод спектрально-корреляционной интерферометрии.** Протекание биохимических реакций регистрировалось в реальном времени с помощью оптического безмаркерного биосенсора Пикоскоп® [16, 17], принцип действия которого основан на методе спектрально-корреляционной интерферометрии. Метод позволяет применять в качестве сенсорных чипов стандартные покровные микроскопные стекла толщиной 100 мкм. Подача реагентов осуществлялась с помощью специально сконструированной проточной системы, имеющей 3 независимых канала. Один из каналов являлся опорным. Два других канала, каждый размером 3 мм × 2 мм × 0.1 мм и объемом 0.6 мкл, использовались для проведения и мониторинга биохимических реакций в реальном времени. По одному из них пропускался контрольный образец, который содержал поликлональные антитела и 3-ФБК в концентрации 100 нг/мл и, соответственно, не вызывающий прирост сигнала при используемом формате анализа. По второму каналу пропускался исследуемый образец.

**Иммобилизация органосиланов на поверхность стекла.** Для аминирования и эпоксилирования поверхности покровных микроскопных стекол они в течение 1 ч промывались в кислоте Каро (1 : 3 30%-ный пероксид водорода – серная кислота) при 70°C. Затем стекла погружались в 5%-ный раствор соответственно (3-аминопропил)триэтоксисилана или глицидоксипропилтриметоксисилана в метаноле. Продолжительность силанизации, а также объемная доля воды, содержащаяся в растворителе, являлись предметом оптимизации для целей настоящего исследования. Результаты такой оптимизации описаны ниже. Затем, после трое-

кратной промывки ДМФА, стекла подвергались термической обработке при 105°C в течение 1 ч.

**Оценка эффективности силанизации стекла.** Для проверки качества аминирования стекла биотинилировались. Для этого на каждое стекло наносилась смесь, состоящая из 200 мкл ДМФА, 12.5 мкл триэтиламина и 1 мг биотин-NHS. Стекла в течение 2 ч инкубировались в камере, предотвращающей испарение растворителя. После трехкратной промывки ДМФА они нагревались до 105°C для удаления физически сорбированного растворителя. Модифицированные таким образом стекла использовались в качестве сенсорных чипов. В проточной системе биосенсора наблюдалась посадка на данные стеклянные сенсорные чипы стрептавидина в ФСБ, концентрация белка – 50 мкг/мл. По величине сигнала оценивалось качество аминирования слайдов.

Для оценки эффективности эпоксилирования в проточной системе биосенсора наблюдалась сорбция на сенсорный чип иммуноглобулина G в ФСБ, концентрация белка – 50 мкг/мл.

**Иммобилизация конъюгата на сенсорные чипы.** Для аминированных чипов малеимида-R-N-сукцинимидный эфир растворялся в ДМФА до концентрации 20 мМ. Затем на сенсорный чип наносилось по 50 мкл полученного раствора. Стекла инкубировались в течение 3 ч при комнатной температуре. Для предотвращения испарения использовался плотно закрывающийся контейнер. После трехкратной промывки ДМФА на поверхность наносилось по 200 мкл конъюгата 3-ФБК с БСА в КБ, концентрация конъюгата 50 мкг/мл. Стекла инкубировались в течение 16 ч при 4°C. Для блокировки поверхность обрабатывалась 3%-ным раствором обезжиренного молока в ФСБ в течение 4 ч при комнатной температуре. После трехкратной промывки дистиллированной водой стекла высушивались и хранились при 4°C.

Иммобилизация конъюгата на поверхность эпоксилированных сенсорных чипов осуществлялась непосредственно перед началом анализа в проточной системе биосенсора. Она производилась в КББ при рН 8.6 и концентрации конъюгата 50 мкг/мл. Для снижения неспецифического связывания поверхность стекла дополнительно обрабатывалась ББ.

**Приготовление тестовых образцов.** 3-ФБК растворяли в смеси вода–метанол (6 : 4) до получения необходимой концентрации. Затем к полученному раствору добавлялся БСА в количестве, необходимом для получения концентрации белка 50 мкг/мл. Перед анализом к полученному раствору добавлялось по 20 мкл антисыворотки на 1 мл образца.

**Конкурентный иммуноанализ.** В проточной системе биосенсора регистрировалась сорбция свободных поликлональных антител из образца, приготовленного, как описано выше, на сенсорный

чип с иммобилизованным конъюгатом. Скорость протекания раствора устанавливалась равной 5 мкл/мин. Сигналом считалось регистрируемое при пропуске образца изменение толщины биослоя. Для контроля величины неспецифического сигнала проводилось два типа экспериментов: использовались сенсорные чипы с иммобилизованным БСА, не содержащим сайтов для специфической сорбции, и образцы с концентрацией 3-ФБК 100 нг/мл, которой достаточно для связывания всех антител в образце.

**Статистическая обработка результатов.** В качестве итогового значения в каждой серии экспериментов принималось среднее арифметическое между результатами отдельных экспериментов серии, а в качестве погрешности – среднеквадратичное отклонение. Предел детекции определялся по критерию двух  $\sigma$ , т.е. принимался равным такой концентрации, при которой сигнал отличался от получаемого в отсутствие антигена в образце на удвоенное среднеквадратичное отклонение нулевого контроля. Значение верхней границы динамического диапазона вычислялось, как концентрация, при которой сигнал отличается от нуля на значение, равное удвоенному среднеквадратичному отклонению.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность и чувствительность иммуноанализа во многом зависят от способа иммобилизации биомолекул на твердую фазу, поскольку именно он определяет плотность центров специфической сорбции и степень нарушения нативной структуры биораспознающих молекул. Исходя из этого, при разработке метода детекции малых молекул, особое внимание было обращено на оптимизацию протоколов присоединения конъюгата к твердой фазе.

Один из возможных подходов к иммобилизации биологических молекул на стеклянную поверхность – использование самоорганизующихся монослоев (СОМ) [18], состоящих из молекул, способных соединиться с поверхностью стекла и между собой. При этом образуется упорядоченный монослой, ковалентно прикрепленный к сенсорному чипу во многих точках. Примерами коммерчески доступных СОМ являются триэтокси- и триметоксисиланы. При работе с белками удобно использовать аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС) и глицидокситриметоксисилан (ГОТС). При их иммобилизации на стекло на поверхности образуется упорядоченный слой из amino- или эпокси-групп, которые могут применяться для ковалентного присоединения биомолекул или низкомолекулярных лигандов.

Многостадийность процесса иммобилизации белков на сенсорные чипы затрудняет разработку соответствующих протоколов с помощью традиционных методов, использующих флуоресцентные и ферментные метки. Такие методы позволяют наблюдать только конечный результат и требуют одновременной оптимизации всех стадий анализа. Использование спектрально-корреляционной интерферометрии существенно облегчает и ускоряет процесс разработки протоколов, поскольку позволяет наблюдать все стадии иммуноанализа в реальном времени. Соответственно, оптимизация каждого этапа может проводиться независимо от других.

Первым этапом при иммобилизации биомолекул на сенсорный чип, роль которого в предлагаемом методе выполняет микроскопное покровное стекло, является модификация его поверхности органосиланами. Для оптимизации этой стадии исследовалась зависимость плотности посадки сорбционных центров на получаемых модифицированных стеклах от таких параметров, как продолжительность силанизации стекла и объемная доля воды в растворе. Для оценки указанной характеристики сенсорного чипа с помощью биосенсора Пикоскоп® наблюдалась специфическая сорбция белка, как описано в разделе "Методика". Зависимость сигнала для аминированных слайдов от времени инкубации приведена на рис. 1.

Из приведенного графика видно, что спустя 16 ч достигалась сорбционная емкость поверхности, отличающаяся от максимально достигнутой в экспериментах не более, чем на 5%. Такое время является оптимальным для практического использования, поскольку дальнейшее увеличение длительности инкубирования приводило к ухудшению оптического качества получаемых сенсорных чипов из-за сорбции полимеризовавшихся агломератов молекул АПТЭС.

В ходе экспериментов было установлено, что эффективность аминирования слабо зависит от объемной доли воды в растворе при изменении данного параметра в пределах от 0.01 до 3%. В дальнейшем для изготовления сенсорных чипов аминирование стекла проводилось в течение 16 ч, объемная доля воды в используемом метаноле при этом составляла 1%.

Максимальная величина сигнала при сорбции стрептавидина составила 1.2 нм. Теоретическая оценка показывает, что сигнал при иммобилизации плотного монослоя данного белка должен составлять около 3.5 нм. Таким образом, разработанный протокол аминирования позволяет получить степень заполнения поверхности чипа около 30%.

При оптимизации протоколов эпоксилирования покровных стекол было экспериментально показано, что величина сигнала при сорбции бел-

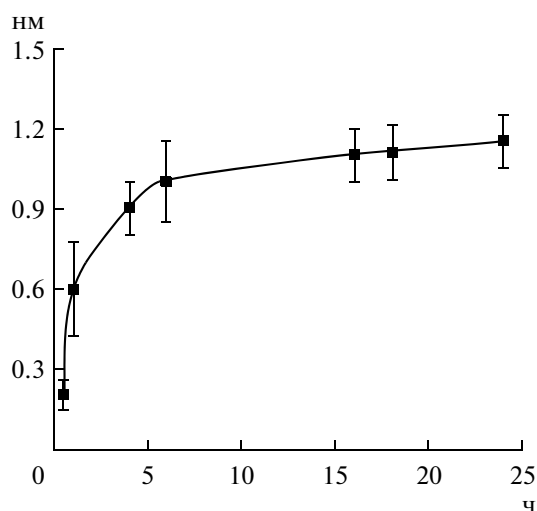
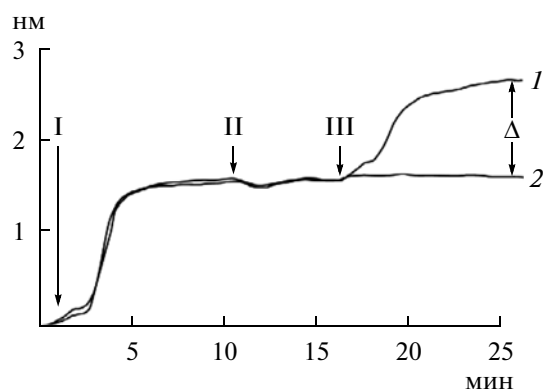


Рис. 1. Зависимость сигнала (нм), наблюдаемого при сорбции стрептавидина, от времени аминирования (ч).

ка на сенсорные чипы не зависит от времени силанизации в диапазоне от 2 до 24 ч. Зависимость от объемной доли воды в растворе при этом носит более сложный характер, а максимум достигается при значении 0.1%. Согласно проведенным экспериментам, наиболее оптимальными для изготовления сенсорных чипов являются время эпоксилирования 16 ч и объемная доля воды 0.1%. При сорбции стрептавидина на изготовленные по данному протоколу стеклянные сенсорные чипы наблюдался сигнал величиной 2.4 нм, что соответствовало степени заполнения поверхности 60%.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были разработаны протоколы создания аминированных и эпоксилированных сенсорных чипов. Для последних была достигнута в два раза большая сорбционная емкость, что эквивалентно увеличению количества иммобилизованных центров специфической сорбции. При этом эпоксилированные чипы позволяют использовать простые и удобные протоколы иммобилизации на них белка за счет ковалентного связывания с аминоклассами последнего.

Поскольку для многих практических применений важным параметром является время хранения сенсорных чипов, была проведена серия экспериментов, направленных на изучение зависимости регистрируемого сигнала от времени хранения модифицированного стекла. Было установлено, что при применении разработанных протоколов эпоксилирования, сигнал остается неизменным при хранении до полугода. Так, разница между сигналами, наблюдаемыми при сорбции белка на эпоксилированный чип непосредственно после его изготовления и после хранения в течении 6 месяцев при 4°C, не превышала 10%. Ввиду того, что основная причина снижения специфических сигналов —



**Рис. 2.** Сенсограммы при пропускании в проточной системе биосенсора Пикоскоп® по поверхности эпоксилированного сенсорного чипа: I – конъюгата 3-ФБК с БСА, II – карбонатно-бикарбонатного буфера с добавлением глицина, III – тестируемого образца.

1 – нулевой контроль (образец, не содержащий 3-ФБК), 2 – образец 3-ФБК в концентрации 100 нг/мл.

гидролиз эпокси-групп на поверхности, хранение в инертной атмосфере может дополнительно увеличить срок годности. Аминирование слайдов позволяет снизить влияние времени хранения чипа на сигнал, такая поверхность обеспечивает стабильный сигнал более 1 года. Однако для иммобилизации биомолекул на аминированную поверхность требуются более сложные протоколы, включающие стадию предварительной активации, что несколько увеличивает время проведения анализа.

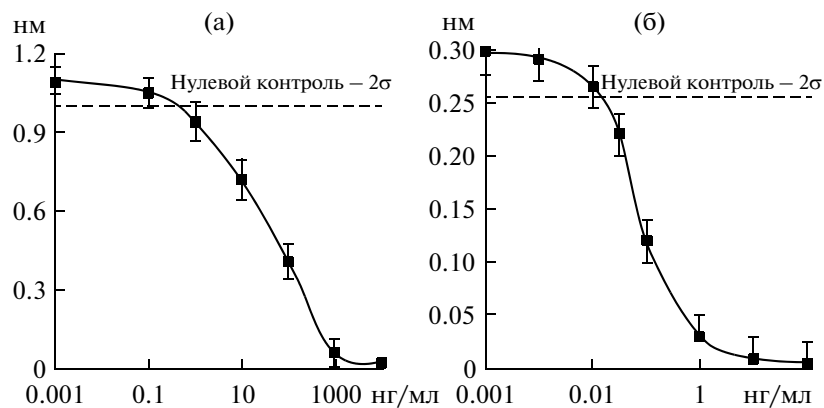
Поскольку для обоих исследованных вариантов сенсорных чипов существуют практические задачи, в которых их преимущества наиболее востребованы, дальнейшие эксперименты проводились как с аминированными, так и с эпоксилиро-

ванными по оптимизированным протоколам сенсорными чипами.

Полученные сенсорные чипы далее использовались при проведении конкурентного иммуноанализа для детектирования малых молекул. С помощью биосенсора Пикоскоп® в режиме реального времени регистрировалась сорбция поликлональных антител из образцов, приготовленных, как описано в разделе “Методика”, содержащих различную концентрацию 3-ФБК, на поверхность сенсорных чипов с иммобилизованным конъюгатом – 3-ФБК-БСА. Характерный вид регистрируемых при этом сенсограмм приведен на рис. 2.

В качестве сигнала  $\Delta$  рассматривается прирост толщины биослоя на этапе пропускания образца. Как видно из рис. 2, специфическая сорбция антител из образцов с высокой концентрацией 3-ФБК отсутствует. Аналогично в контрольных опытах отсутствовали сигналы при пропускании образцов над поверхностью с иммобилизованным БСА. Это свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания компонентов образца с поверхностью. При отсутствии 3-ФБК в образцах для аминированных стекол величина сигнала составляла 0.3 нм при среднеквадратичном отклонении 0.02 нм, для эпоксилированных слайдов значения этих параметров составили соответственно 1.1 и 0.05 нм.

Зависимость сигнала от концентрации 3-ФБК при сорбции антител из образца для эпоксилированных слайдов приведена на рис. 3а. Как видно из приведенной зависимости, предел детекции 3-ФБК на эпоксилированных сенсорных чипах составил 0.2 нг/мл, что почти на порядок лучше, чем у существующих методов определения метаболитов пиретроидов с помощью ИФА, позволяющего детектировать концентрации больше 1 нг/мл [7]. Динамический диапазон составил 3 порядка величины, что охватывает весь спектр концентраций, важных с точки зрения задач экологиче-



**Рис. 3.** Зависимость сигнала (нм) при проведении конкурентного анализа от концентрации 3-ФБК в образце (нг/мл). а – на эпоксилированных чипах, б – на аминированных чипах.

ского мониторинга и проведения токсикологического анализа.

Дальнейшее улучшение предела детекции было достигнуто путем иммобилизации конъюгата на поверхность аминированных сенсорных чипов. Полученная зависимость сигнала от концентрации 3-ФБК в образце приведена на рис. 3б. Как видно из приведенной зависимости, предел детекции 3-ФБК на аминированных слайдах составил 0.015 нг/мл, что на порядок лучше показанного для эпоксилированных сенсорных чипов и находится на уровне результатов, получаемых методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [19]. Такой результат был достигнут благодаря малому разбросу результатов, получаемых в отсутствие 3-ФБК и большому наклону кривой вблизи предела детекции. Динамический диапазон при этом составляет 2 порядка. Более широкий диапазон в случае эпоксилированных сенсорных чипов может объясняться большей сорбционной емкостью.

Достигнутые пределы детекции как в случае эпоксилированных, так и аминированных сенсорных чипов, позволяют использовать их для целей высокочувствительной биосенсорики. Большой динамический диапазон, удобство работы и скорость проведения анализа делают эпоксилированные слайды привлекательным решением для задач токсикологической проверки продуктов питания. Высокая чувствительность, достигнутая при использовании аминированных сенсорных чипов, может быть востребована в экологическом мониторинге и контроле потенциально опасных производств.

Таким образом, проведенная оптимизация протоколов модификации поверхности сенсорных чипов и адаптация разработанного оптического метода мониторинга в реальном времени конкурентных иммунохимических реакций позволяют оперативно определять концентрацию малых молекул с высокой чувствительностью. Эффективность данного подхода продемонстрирована на примере детекции 3-ФБК. Достигнут предел детекции 15 пг/мл, что превосходит существующие методы детекции пиретроидов с помощью иммуноанализа более чем в 50 раз и находится на уровне современных методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Использование стандартных микроскопных покровных стекол в качестве широкодоступных расходных материалов – сенсорных чипов, а также компактность и простота используемого оборудования наряду с малым временем анализа, позволяют применять разработанную технологию не только в исследовательских целях, но и для экологического мониторинга окружающей среды.

Авторы благодарят Государственный научный центр прикладной микробиологии (г. Оболensk, Россия) за предоставленные иммунореагенты.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК 16.512.11.2124 и 14.740.11.1179) и грантов РФФИ (11-04-12181, 10-02-01185 и 11-02-01440).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Class T.J., Kintrup J.* // *J. Anal. Chem.* 1991. V. 340. № 7. P. 446–453.
2. *Hadnagy W., Leng G., Sugiri D., Ranft U., Idel H.* // *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2003. V. 206. № 2. P. 93–102.
3. *Liu J., Yang Y., Zhuang S., Yang Y., Li F., Liu W.* // *Toxicology.* 2011. V. 290. № 1. P. 42–49.
4. *Fortes C. Cancer* // *Encyclopedia of Environmental Health.* N.Y.: Elsevier B. V. 2011. P. 489–497.
5. *Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Trubaceva J.N.* // *Analytica Chimica Acta.* 1997. V. 347. № 1–2. P. 131–138.
6. *Kaneko H.* // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. № 7. P. 2786–2791.
7. *Wang J., Yu G., Sheng W., Shi M., Guo B., Wang S.* // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. № 7. P. 2997–3003.
8. *Karcher B.D., Davies M.L., Delaney E.J., Venit J.J.* // *Clinics in Laboratory Medicine.* 2007. V. 27. № 1. P. 93–111.
9. *Toyooka T.* // *Journal of Chromatography B.* 2012. V. 883–884. P. 59–67.
10. *Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.* // *Sensors and Actuators.* 1983. V. 4. P. 299–304.
11. *Farré M., Martínez E., Ramón J., Navarro A., Radjenovic J., Mauriz E., Lechuga L., Marco M. P., Barceló D.* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2007. V. 388. № 1. P. 207–214.
12. *Nikitin P.I., Valeiko M.V., Gorshkov B.G.* // *Sensors and Actuators B.* 2003. V. 90. № 1–3. P. 46–51.
13. *Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I.* // *Sensors and Actuators B.* 2005. V. 111–112. P. 500–504.
14. *Nikitin P.I.* // *Handbook-Biosensors & Biochips* / Ed. R.S. Marks et al. N.Y.: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-0-470-01905-4. 2007. Chapter 27. P. 1–13.
15. *Красникова Т.Л., Никитин П.И., Кseneвич Т.И., Горшков Б.Г., Орлов А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Беспалова Ж.Д.* // *Докл. РАН.* 2010. Т. 433. № 1. С. 559–562.
16. *Иванов А.Е., Солодухина Н.М., Нильсон Л., Никитин М.П., Никитин П.И., Зубов В.П., Вихров А.А.* // *Высокомолекулярные соединения, Серия А.* 2012. Т. 54. № 1. С. 3–13.
17. *Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И.* // *Труды МФТИ.* 2012. Т. 4. № 15. С. 11–17.
18. *Chaki N.K., Vijayamohanan K.* // *Biosensors and Bioelectronics.* 2002. V. 17. № 1–2. P. 1–12.
19. *Wang Y., Du R.* // *Forensic Science International.* 2010. V. 198. № 1–3. P. 70–73.

## Detection of Pyrethroids by Spectral Correlation Interferometry

A. G. Burenin<sup>a</sup>, M. P. Nikitin<sup>a</sup>, A. V. Orlov<sup>a</sup>, T. I. Ksenevich<sup>b</sup>, and P. I. Nikitin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, 117303 Russia*

*e-mail: AGBurenin@gmail.com*

<sup>b</sup> *Prokhorov General Physics Institute, Moscow, 119991 Russia*

Received September 7, 2012

**Abstract**—A marker-free method of highly sensitive detection of pyrethroids was developed on the basis of spectral correlation interferometry using competitive immunoanalysis on the surface of sensor chips made of readily available microscopy cover slips. The method was demonstrated to allow for the independent optimization of each step of sensor surface modification which may be used to increase the efficiency in the development of protocols for a wide spectrum of immunoanalyses using a glass surface as a solid phase. One of the most stable metabolites of a number of pyrethroids—3-phenoxybenzoic acid—at a level of 15 pg/mL on the surface of optimized sensor chips; the assay sensitivity exceeded that of the enzyme-linked immunosorbent assay 50 times.