

Высококочувствительная иммунохроматография на основе концентрирования аналитов конъюгатами антител и стабилизированных магнитных частиц

***Н.А. Таранова, А.А. Буланая, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев**

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Институт биохимии им. А.Н. Баха,
Российская Федерация, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33

*Адрес для переписки: Таранова Надежда Алексеевна, e-mail: taranovana@gmail.com

Поступила в редакцию 15 ноября 2024 г., после доработки – 4 декабря 2024 г.

Магнитные частицы (МЧ) с иммобилизованными на их поверхности антителами – эффективный компонент аналитических систем, обеспечивающий селективное связывание контролируемых соединений из больших объемов проб, простое и быстрое концентрирование при наложении внешнего магнитного поля и последующее высококочувствительное выявление. Однако для аналитического применения МЧ необходимо покрытие их поверхности, исключающее агрегацию частиц и неспецифические взаимодействия с ними компонентов проб. В статье представлены результаты исследования, включавшего синтез, модификацию МЧ и их применение в иммунохроматографических тест-системах. МЧ получали, восстанавливая смесь хлоридов железа (II) и (III) аммиаком в различных условиях. В качестве стабилизаторов поверхности использовали олеиновую кислоту, тетраэтоксисилан и его смесь с (3-аминопропил)триэтоксисиланом. Варьируя pH и температуру реакционной среды, соотношения МЧ и стабилизаторов, продолжительность ультразвуковой обработки и последующей инкубации реагентов, получили 20 препаратов поверхностно модифицированных МЧ. Размеры и коллоидную стабильность препаратов характеризовали методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света. Выбранные МЧ адсорбционно конъюгировали с антителами к различным низкомолекулярным веществам (антибиотики, гормонально активные соединения) и применяли полученные конъюгаты для концентрирования аналитов из разных объемов проб. Разработаны иммунохроматографические тест-системы, в которых используются ресуспендируемые комплексы (МЧ – антитела – аналит). Предложенное иммуномагнитное концентрирование снизило минимальные выявляемые концентрации аналитов по сравнению с традиционной иммунохроматографией до 20 раз (контроль тетрациклина, предел обнаружения 1.5 нг/мл). Методика объединяет три быстрые стадии – связывание аналита (2 мин), магнитное разделение (2 мин) и иммунохроматографию (от 7 мин), позволяя проводить тестирование без использования стационарного оборудования и с возможностью визуальной оценки результатов.

Ключевые слова: магнитные частицы, иммуносорбенты, концентрирование, иммунохроматография, низкомолекулярные аналиты

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2024, vol. 28, no. 4, pp. 345 - 355

DOI: 10.15826/analitika.2024.28.4.001

High sensitivity immunochromatography based on concentrating analytes by conjugates of antibodies and stabilized magnetic particles

***N.A. Taranova, A.A. Bulanaya, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev**

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, A.N. Bach
Institute of Biochemistry,
33 Leninsky Prospekt, Moscow, 119071, Russian Federation

*Corresponding author: Nadezhda A. Taranova, e-mail: taranovana@gmail.com

Magnetic particles (MPs) with antibodies immobilized on their surface are an effective component of analytical systems, providing selective binding of controlled compounds from large volumes of samples, simple and rapid concentration using applied external magnetic field, and subsequent highly sensitive detection. However, analytical use of MPs requires coating their surface for eliminating particle aggregation and non-specific interactions with sample components. The article presents the results of a study that included synthesis, modification of MPs and their application in immunochromatographic test systems. MPs were prepared by reducing a mixture of iron (II) and (III) chlorides with ammonia under various conditions. Oleic acid, tetraethoxysilane and its mixture with (3-aminopropyl)triethoxysilane were used as surface stabilizers. Temperature and pH of the reaction medium, the ratio of MPs and stabilizers, the duration of ultrasonic treatment and subsequent incubation of the reagents were varied and 20 samples of surface-modified MPs were prepared. Size and colloidal stability of the samples were characterized by transmission electron microscopy and dynamic light scattering. Selected MPs were adsorptionally conjugated with antibodies to various low-molecular substances (antibiotics, hormonally active compounds) and the resulting conjugates were used to concentrate analytes from different sample volumes. Immunochromatographic test systems that use resuspended complexes (MP – antibodies – analyte) were developed. The proposed immunomagnetic concentration reduced the minimum detectable concentrations of analytes by up to 20 times compare to traditional immunochromatography (tetracycline control, detection limit 1.5 ng/ml). The method combines three rapid stages – analyte binding (2 min), magnetic separation (2 min) and immunochromatography (from 7 min), allowing testing without the use of stationary equipment and with the possibility of visual assessment of the results.

Keywords: magnetic particles, immunosorbents, concentrating, immunochromatography, low molecular weight analytes

ВВЕДЕНИЕ

Современная практика контроля токсичных загрязнителей в окружающей среде и продуктах питания требует оперативного выявления целевых аналитов в крайне низких концентрациях [1, 2]. Традиционные виды пробоподготовки с экстракцией и выпариванием, предложенные для хроматографических методов [3, 4], применительно к данным задачам неэффективны из-за продолжительности и трудоемкости. Перспективное решение, преодолевающее эти ограничения, состоит в использовании дисперсий магнитных частиц (МЧ) с иммобилизованными на их поверхности связывающими реагентами, прежде всего антителами [5, 6]. Магнитные иммуносорбенты позволяют последовательно осуществлять: 1) связывание аналита (быстрое благодаря взаимодействиям во всем объеме пробы), 2) отделение полученных комплексов МЧ–аналит при наложении внешнего магнитного поля и 3) ресуспендирование этих комплексов после удаления магнита. Такая пробоподготовка позволяет за минимальное время существенно повысить содержание аналита в конечной тестируемой пробе и исключить из ее состава компоненты матрицы исходной пробы, потенциально влияющие на специфические взаимодействия и генерацию детектируемого сигнала [7-9]. Отметим, что для аналитического применения МЧ необходимо покрытие их поверхности, исключающее агрегацию частиц и неспецифические взаимодействия с ними компонентов проб [10-12].

Как правило, после перерастворения комплексов МЧ–аналит проводится их диссоциация с целью последующей оценки содержания высвободившихся молекул. Однако при этом тестирование удлиняется, а воспроизводимость его результатов

снижается. Кроме того, выбор условий для полной и быстрой диссоциации без деструкции аналита является сложной задачей, которая должна решаться заново для каждого нового соединения и его иммунного комплекса. В связи с этим особый интерес представляет непосредственная детекция целевых соединений в составе комплексов с МЧ. Для достижения этой цели нами в [13-15] предложено сочетание магнитных иммуносорбентов с иммунохроматографическими тест-полосками. Комплекс МЧ–антитела со связанными молекулами аналита из пробы перемещался с потоком жидкости вдоль тест-полоски и, в зависимости от оставшихся свободными антиген-связывающих сайтов антител, в большей или меньшей степени связывался с конъюгатом антиген-белок, нанесенным на тест-полоску в определенной зоне. На основании окрашивания этой зоны делался вывод о наличии и содержании в пробе контролируемого соединения. Применительно к низкомолекулярным токсикантам данный подход был успешно реализован для обнаружения микотоксинов зеараленона и Т-2 токсина [15]. Однако вопросы о наиболее эффективном поверхностном покрытии синтезируемых МЧ, а также об оптимальном соотношении пробы и конъюгата МЧ–антитела при концентрировании оставались открытыми.

Поэтому в настоящем исследовании решали задачи по синтезу различных вариантов модифицированных МЧ и сравнению достигаемых с их помощью аналитических параметров иммунохроматографических тест-систем для обнаружения токсичных загрязнителей – различных антибиотиков и техногенных гормонально активных веществ. Были получены МЧ, модифицированные в разных условиях олеиновой кислотой либо производными кремния,

синтезированы их адсорбционные комплексы (конъюгаты) с антителами и охарактеризованы возможности применения этих препаратов как концентрирующих аналиты компонентов иммунохроматографических тест-систем для обнаружения токсичных контаминант пищевой продукции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Реагенты

Хлорид железа (II) (FeCl_2), хлорид железа (III) (FeCl_3), пентакарбонил железа ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), водный раствор аммиака (30 %), олеиновая кислота, тетраэтоксисилан (ТЭОС), (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЕС), хлорамфеникол, бисфенол А, дибутилфталат, трис, диметилсульфоксид (ДМСО), Тритон X-100, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – производства «Sigma Aldrich» (США). Тетрациклин, бычий сывороточный альбумин (БСА), хлорид натрия, гидроксид калия, дигидрофосфат калия приобретены у «Химмед» (Россия). Моноклональные антитела против хлорамфеникола получены Всероссийским научным центром молекулярной диагностики и лечения (Россия). Моноклональные антитела против бисфенола А и дибутилфталата приобретены у «Creative Diagnostics» (США). Конъюгаты БСА–хлорамфеникол, БСА–дибутилфталат и БСА–бисфенол А синтезированы в лаборатории иммунобиохимии ФИЦ Биотехнологии РАН [16-18]. Моноклональные антитела против тетрациклина и конъюгат соевый ингибитор трипсина–тетрациклин приобретены у «Eximio» (Китай).

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали наборы мембран Mdi Easyrack фирмы «Advanced Microdevices» (Индия), включающие рабочую нитроцеллюлозную мембрану CNPC со средним диаметром пор 15 мкм, стекловолоконную мембрану PT-R7, разделительную мембрану GFB-R4 и впитывающую мембрану AP045.

Для проведения иммуноферментного анализа использовали полистироловые микропланшеты (Costar 9018), приобретенные у «Corning Costar» (США). Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, антивидовые поликлональные антитела были приобретены у ИМТЕК (Россия).

Все водные растворы готовили на деионизированной воде с удельным сопротивлением при 25 °С не менее 18.2 МΩ·см, получаемой с помощью системы «Simplicity» фирмы «Millipore» (США).

Синтез магнитных частиц

МЧ синтезировали по методике, описанной в работе [19]. К 42 мл воды добавляли 0.11 г FeCl_2 и 0.3 г FeCl_3 . Затем по каплям при перемешивании добавляли 4 мл 30 %-ого раствора аммиака и помещали реакционную смесь на 30 мин в ультразвуковую баню («Сапфир», Россия) (частота 35 кГц, мощность

100 Вт, $T = 50$ °С). Полученные частицы осаждали при помощи неодимового магнита (диаметр 2 см, высота 3 см), переводили в 50 мМ фосфатный буфер pH 7.4 (ФБ) и хранили при +4 °С.

Поверхностная модификация магнитных частиц олеиновой кислотой

Протокол 1 [20]. Олеиновую кислоту растворяли в ДМСО до 17 %-ной концентрации, нагревали до 130 °С и к 12 мл раствора по каплям добавляли 0.2 мл пентакарбонила железа. Реакционную смесь инкубировали 60 мин при 130 °С и перемешивании. Полученные модифицированные МЧ осаждали при помощи магнита и промывали ДМСО. Суспензию МЧ переводили в ФБ и хранили при +4 °С.

Протокол 2 [21]. К МЧ (3 мг/мл, 2 мл), полученным согласно методике синтеза, приведенной выше, и очищенных от ФБ, добавляли олеиновую кислоту (2 мл) и водный раствор цитрата натрия (1 %, 0.5 мл). Реакционную смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Полученные МЧ, покрытые олеиновой кислотой, осаждали при помощи магнита, промывали ФБ и хранили при +4 °С.

Покрывание магнитных частиц силикатной оболочкой

К 6,2 мл взвеси МЧ с концентрацией 3 мг/мл, полученных согласно методике синтеза, приведенной выше, добавляли 1.5 мл раствора аммиака (30 %) и 8.7 мл воды. К полученной смеси приливали 10 мл 0.12 %-ного раствора ТЭОС или АПТЭС в этаноле, помещая реакционную смесь сначала в ультразвуковую баню (30 мин, 35 °С), а затем инкубируя ее в течение суток при комнатной температуре. Полученные модифицированные частицы отделяли магнитным осаждением и переводили в ФБ.

Соотношения реагентов и продолжительности стадий, использованные в 20 реализованных вариантах синтеза, представлены в разделе «Результаты и их обсуждение».

Характеристика магнитных частиц

Для проведения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) препараты МЧ наносили на сетки с плотностью ячеек 300 меш («Pelco International», США), покрытые пленкой поливинилформаль. Изображения получали с помощью микроскопа JEM CX-100 («Jeol», Япония) при 80 кВ и анализировали, используя программу Image Tool (Центр медицинских наук Техасского университета, США).

Гидродинамический размер и ζ -потенциал МЧ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano («Malvern Pananalytical», Великобритания). При этом динамическое рассеяние света регистрировали при 25 °С в течение 10 с под углом рассеяния 173°.

Синтез конъюгатов магнитных наночастиц с антителами

Для адсорбции на поверхностно модифицированных МЧ использовали антитела против тетрациклина, хлорамфеникола, бисфенола А и дибутилфталата. Смешивали 650 мкл коллоидного раствора МЧ (3 мг/мл) и 20.5 мкл антител (3.5 мг/мл), добавляли ФБ до конечного объема 1000 мкл и инкубировали 30 мин при постоянном перемешивании. Затем к реакционной смеси добавляли 50 мкл 10 %-ного водного раствора БСА и инкубировали 15 мин. Полученные конъюгаты осаждали при помощи магнита и промывали ФБ.

Иммуноферментное определение количества антител в конъюгатах с магнитными частицами

В лунках микропланшета сорбировали конъюгат гаптен–белок из раствора с концентрацией 1 мкг/мл в ФБ, инкубируя при 4 °С в течение ночи. Лунки промывали четыре раза для удаления несвязанных молекул с использованием ФБ с 0.05 % об./об. детергента Тритон X-100 (ФБТ). Затем в лунки микропланшета добавляли (i) растворы антител в диапазоне концентраций 0–1000 нг/мл для получения калибровочной кривой или (ii) супернатанты реакционной смеси после конъюгирования МЧ с антителами (см. **Синтез конъюгатов**). Микропланшет инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего промывали лунки, как описано выше. К образовавшимся в лунках комплексам добавляли антивидовой иммунопероксидазный конъюгат (разведение коммерческого препарата 1:3000 в ФБТ) и инкубировали 1 ч при 37 °С. После промывки микропланшета определяли каталитическую активность связанной пероксидазы. Для этого добавляли субстратную смесь, содержащую 0.4 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и 3 мМ H₂O₂ в 40 мМ натрий-цитратном буфере, pH 4.0. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 1 М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с помощью фотометра для микропланшетов Zenyth 3100 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

Содержание связанных антител рассчитывали с помощью линеаризованной калибровочной кривой, исходя из разности между концентрациями добавленных при конъюгировании антител и антител, обнаруженных в супернатанте. Полученные концентрации пересчитывали для определения соотношения антитело : частица в конъюгатах.

Изготовление иммунохроматографических тест-полосок

На листе рабочей мембраны (длина 24 см, высота листа 8 см, высота рабочей мембраны 2,5 см) формировали аналитическую и контрольную

зоны (А.З. и К.З., соответственно), нанося с помощью диспенсера («Imagene Technology», США) конъюгаты гаптен–белок (1 мг/мл в ФБ, расход раствора 1.2 мкл на 1 см длины наносимой полосы) и антивидовые поликлональные антитела (1 мг/мл в ФБ, 1.2 мкл на 1 см), соответственно. Мембраны высушивали 2 ч при 37 °С. Далее собирали мультимембранный композит из рабочей и впитывающей мембраны и нарезали его на тест-полоски шириной 3.5 мм с помощью резака («IndexCutter», США). Тест-полоски хранили запаянными в фольгированную упаковку в присутствии силикагеля при комнатной температуре.

Проведение иммунохроматографического анализа

Иммунохроматографический анализ (ИХА) проводили при комнатной температуре. К тестируемой пробе объемом 0.1 мл добавляли конъюгат МЧ–антитела (50 мкл, 3 мг/мл). В полученную смесь погружали тест-полоску краем впитывающей мембраны на 7–15 мин. По завершении тестирования с помощью сканера получали изображения тест-полосок. Для количественной оценки интенсивности окрашивания аналитической и контрольной зон использовали программу TotalLAB («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

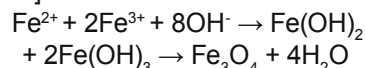
Проведение иммунохроматографии с иммуномагнитным концентрированием

Тестируемые пробы объемом от 1 до 50 мл смешивали с конъюгатом МЧ–антитела (50 мкл, 3 мг/мл) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем отделяли МЧ и связанные с ними вещества с помощью магнитного поля. После удаления магнита осадок ресуспендировали в 0.1 мл ФБ и далее проводили иммунохроматографию (см. **Проведение иммунохроматографического анализа**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор сопоставляемых режимов получения магнитных частиц и их поверхностной модификации

При синтезе МЧ использовали наиболее широко применяемую трансформацию растворимых солей Fe²⁺ и Fe³⁺ в присутствии основания с последующим образованием нерастворимого смешанного оксида Fe₃O₄ [22, 23]:



В качестве модифицирующих МЧ кремнийорганических реагентов использовали ТЭОС, АПТЭС. Альтернативным реагентом была олеиновая кислота, формирующая тонкую оболочку с функциональными карбоксильными группами. С целью выбора методики модификации поверхности МЧ варьировали несколько параметров (рис. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации ТЕОС на гидродинамический диаметр МЧ, (n=3)

Table 1

The effect of TEOS concentration on the hydrodynamic diameter of MP, (n=3)

ГДД МЧ, мкм, при концентрации ТЭОС, мМ						
0	30	60	80	210	270	430
0.95±0.18	0.65±0.15	1.16±0.11	1.00±0.09	1.00±0.14	0.78±0.05	4.3±0.1

В качестве основного параметра для оценки получаемых препаратов был выбран гидродинамический диаметр (ГДД) благодаря простоте проведения измерений, высокой пропускной способности и отсутствию пробоподготовки в отличие от просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Требование к модифицированным МЧ состояло в том, что их ГДД не должен превышать 1 мкм, так как в противном случае мобильность частиц при движении в порах нитроцеллюлозных мембран иммунохроматографических тест-систем значительно снижается за счет неспецифического взаимодействия [24].

Выбор pH среды основывался на том, что снижение pH ниже 9 приводит к разложению МЧ и растворению препарата [25]. При проведении реакции при pH ниже 9 наблюдали окрашивание надосадочной жидкости в оранжевый цвет, что свидетельствует об образовании растворимых солей железа вместо нерастворимого оксида железа. Следовательно, для данных вариантов условий синтеза дальнейшую оптимизацию выбора условий модификации МЧ не проводили. Поэтому все реакции модификации поверхности МЧ проводили в трис-буфере с pH 9.5.

Сравнительная оценка и выбор препарата стабилизированных магнитных частиц для аналитического применения

В табл. 1 представлена зависимость ГДД МЧ от концентрации ТЭОС в реакционной смеси (синтезировано 6 препаратов). При увеличении концентрации ТЕОС с 30 до 210 мМ на поверхности МЧ формируется объемная «шуба» более 1 мкм, обладающая высокой гидрофильностью из-за наличия водородных связей между ТЭОС и молекулами воды растворителя. При увеличении концентрации ТЕОС до 270 мМ размер оболочки уменьшается до 780 нм. Однако при увеличении

концентрации ТЕОС еще в 2 раза размер частиц вырастает до 4.3 мкм.

При малых концентрациях формируется рыхлая оболочка, содержащая большое количество воды. Далее при увеличении концентрации ТЭОС (или АПТЕС) избыточная вода вытесняется и оболочка уплотняется, что приводит к уменьшению общего размера. При еще большем повышении концентрации растет толщина оболочки.

Уменьшение ГДД модифицированных МЧ относительно нативных частиц можно объяснить высокой агрегационной способностью свободных МЧ, что приводит к определению размеров фактически агрегатов. При модификации поверхности МЧ происходит разделение агрегатов на отдельные кластеры МЧ, меньшие по размеру, и дальнейшее их покрытие соединениями.

В табл. 2 представлена зависимость ГДД МЧ от концентрации АПТЕС в реакционной смеси (синтезировано 5 препаратов). Благодаря разветвленной структуре молекул АПТЕС на поверхности МЧ формируется рыхлая оболочка. Так, при низких концентрациях АПТЕС (< 16 мМ) размер частиц достигает 4 мкм, вероятно, формируется мягкая гидрофильная оболочка. При дальнейшем увеличении концентрации происходит уплотнение оболочки с вытеснением избыточного количества воды. Минимальный ГДД МЧ достигается при 16.1 мМ АПТЕС в реакционной смеси. Дальнейшее увеличение концентрации приводит к росту размера кремнийсодержащей оболочки.

Таблица 2

Влияние концентрации АПТЕС на гидродинамический диаметр модифицированных МЧ, ((n=3)

Table 2

The influence of APTES concentration on the hydrodynamic diameter of modified MPs, (n=3)

ГДД МЧ, мкм, при концентрации АПТЕС, мМ				
0	1	16	80	430
0.95±0.18	4.0±1.2	0.76±0.24	1.2±0.1	3.2±1.1

Показано, что для МЧ с большим содержанием кремнийорганических производных (> 300 мМ) резко снижаются магнитные свойства: исключается возможность их осаждения в магнитном поле. Для препаратов МЧ с содержанием кремниевых производных, равным 80-270 мМ, скорость осаждения частиц в магнитном поле снижается в 2–4 раза (от 5 мин до 20 мин). Исходя из полученных данных, для



Рис. 1. Варьируемые параметры при модификации МЧ
Fig. 1. Variable parameters during modification of the MP

дальнейших исследований были выбраны препараты МЧ@ТЭОС с концентрацией ТЭОС 270 мМ и МЧ@АПТЕС с концентрацией 16 мМ. Проведение иммуноанализа с магнитным концентрированием требует высокой аффинности конъюгатов МЧ с антителами по отношению к выявляемым и концентрируемым соединениям в сочетании с возможностью простого и быстрого отделения конъюгатов от реакционной среды под действием внешнего магнитного поля. В связи с этим были отобраны МЧ с размерами в диапазоне 100–1000 нм. Их намагниченность достаточна для практической реализации отделения конъюгатов, а высокая поверхностная емкость для иммобилизации антител обеспечивает эффективность связывания выявляемых соединений. Данный выбор соответствует существующей практике иммуномагнитного концентрирования при решении различных задач [26, 27].

Выбор концентрации олеиновой кислоты проводили исходя из условий синтеза (см. **Поверхностная модификация магнитных частиц олеиновой кислотой**), где соотношение МЧ : олеиновая кислота составило 17 % и 40 % от общего объема реакционной смеси (2 препарата). Высокая концентрация кислоты приводит к формированию вязкого препарата, что затрудняет его очистку от несвязанной олеиновой кислоты и дальнейшую модификацию антителами. ГДД данного препарата МЧ составил 5 мкм. Для дальнейшего исследования выбрали препарат с содержанием олеиновой кислоты 17 %, полученный при термическом разложении пентакарбонила железа как описано в [20] (протокол 1, **Поверхностная модификация магнитных частиц олеиновой кислотой**»), для которого ГДД составил 220 ± 30 нм.

Сравнительная оценка и выбор условий модификации поверхности МЧ

Так как при покрытии МЧ кремнийорганическими производными (ТЕОС и АПТЕС) реакция полимеризации происходит на поверхности МЧ, была проведена оценка влияния условий полимеризации на свойства получаемых препаратов (рис. 1). Для препаратов МЧ@ТЭОС и МЧ@АПТЕС с ГДД 780 ± 53 нм и 800 ± 200 нм, соответственно, проводили выбор температурного режима инкубации реакционной смеси. В табл. 3 представлены результаты по оценке влияния температуры реакционной смеси на ГДД МЧ. Показано, что повышение температуры реакционной смеси до 40 °С приводит к росту размера кремнийсодержащей оболочки. Препараты, получаемые при 40 и 80 °С включали существенную часть агрегатов исходных МЧ. Поэтому результаты измерений их ГДД характеризовались большими отклонениями, особенно при 40 °С. Выбранный вариант 35 °С обеспечивал однородность продукта по размерам.

Таблица 3

Влияние температуры реакционной смеси на гидродинамический диаметр МЧ, ($n=3$)

Table 3

The effect of reaction mixture temperature on the hydrodynamic diameter of the MP, ($n=3$)

ГДД МЧ, мкм, при температуре реакционной смеси T, °C				
4	25	35	40	80
0.99±0.08	1.00±0.09	0.78±0.05	1.38±0.19	1.16±0.11

В табл. 4 представлены результаты по оценке влияния времени ультразвуковой обработки реакционной смеси на ГДД МЧ. Показано, что за оптимальное время озвучивания реакционной смеси, 30 мин, формируется плотная кремнийсодержащая оболочка на поверхности МЧ.

Таблица 4

Влияние продолжительности озвучивания реакционной смеси на гидродинамический диаметр МЧ, ($n=3$)

Table 4

The effect of the duration of the reaction mixture sounding on the hydrodynamic diameter of the MP, ($n=3$)

ГДД МЧ, мкм, при продолжительности ультразвуковой обработки реакционной смеси t, мин		
15	30	60
1.16±0.11	0.78±0.05	1.00±0.09

После озвучивания ультразвуком реакционной смеси в течение 30 мин смесь оставляли перемешиваться в течение 2, 4 и 17 ч. В табл. 5 представлены результаты по оценке влияния времени инкубации реакционной смеси на ГДД МЧ. Как видим, вариант с 17-часовой инкубацией реакционной смеси оптимален и позволяет получить кремнийсодержащую оболочку меньшего размера.

Таблица 5

Влияние времени инкубации реакционной смеси на гидродинамический диаметр поверхностно модифицированных МЧ, ($n=3$)

Table 5

The effect of reaction mixture incubation time on the hydrodynamic diameter of surface-modified MPs, ($n=3$)

ГДД МЧ, мкм, при продолжительности инкубации реакционной смеси t _и , ч		
2	4	17
1.55±0.23	1.16±0.11	0.78±0.05

Итак, панель синтезированных препаратов модифицированных МЧ насчитывает 20 образцов, из которых только четыре удовлетворяют требованию: ГДД < 1 мкм. Именно эти 4 препарата (МЧ@ТЭОС, МЧ@АПТЕС, два препарата МЧ@олеиновая кислота) были далее исследованы.

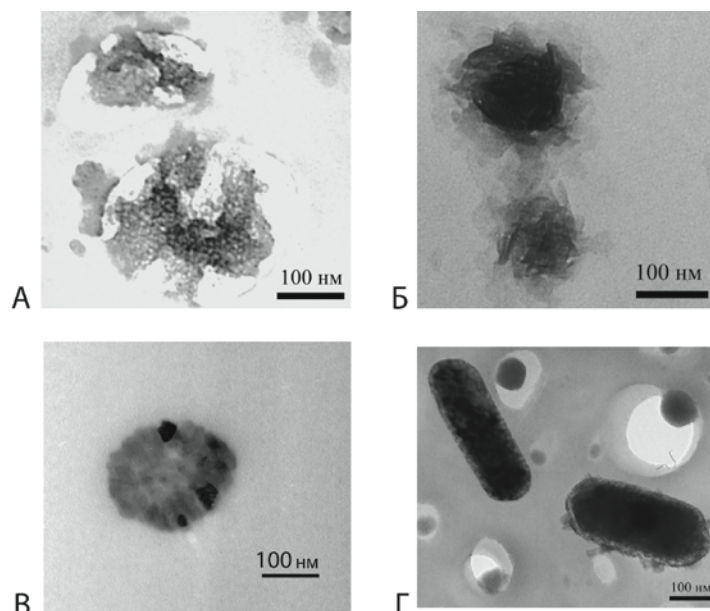


Рис. 2. Электронные микрофотографии МЧ: А — нативные МЧ; Б — МЧ@олеиновая кислота; В — МЧ@ТЭОС; Г — МЧ@АПТЭС

Fig. 2. Electron micrographs of MPs: A – native MP; B – MP@oleic acid; C – MP@TEOS; D – MP@APTES

Таблица 6

Физические характеристики синтезированных МЧ, ($n=3$)

Table 6

Physical characteristics of synthesized MPs, ($n=3$)

Препарат	ГДД, нм	Диаметр, ПЭМ, нм	ζ -потенциал, мВ
Нативные МЧ	950 \pm 183	~15 нм (агрегаты до 150 нм)	-8.8 \pm 0.6
МЧ@олеиновая кислота	220 \pm 30	100 \pm 12	-8 \pm 1
МЧ@ТЭОС	780 \pm 53	110 \pm 10	-1.4 \pm 0.3
МЧ@АПТЭС	800 \pm 200	300 \pm 50	-11 \pm 6

Размерная характеристика полученных препаратов

Синтезированные оптимальные препараты МЧ охарактеризованы методами динамического рассеяния света (ДРС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Результаты просвечивающей электронной микроскопии представлены на рис. 2. На рис. 2А хорошо видно предрасположенность немодифицированных МЧ формировать агрегаты.

Также для данных препаратов МЧ были изучены ζ -потенциалы, которые свидетельствуют о стабильности коллоидных растворов [26].

В табл. 6 суммированы размерные характеристики и значения ζ -потенциалов для нативных МЧ и четырех модифицированных МЧ при pH 9.5.

Наибольшей стабильностью (ζ -потенциал -11 \pm 6 мВ) обладают МЧ@АПТЭС. Синтезированные частицы обладают стержневидной формой: 350 \pm 30 нм по максимальной оси и 105 \pm 15 нм по минимальной оси. Размер и эллипсоидная форма (по данным ПЭМ) затрудняет их движение по иммунохроматографическим мембранам. То же относится и к МЧ@олеиновая кислота, поверхность которых обладает

нестабильной структурой. Из микрофотографий видно, что поверхность МЧ, покрытых олеиновой кислотой имеет размытые контуры, т.е. нерегулярную структуру.

Характеристика полученных конъюгатов магнитных частиц с антителами

Так как МЧ@АПТЭС и МЧ@олеиновая кислота имеют на поверхности функциональные группы: аминогруппу у АПТЭС и карбоксильную группу у олеиновой кислоты, то для получения их конъюгатов с антителами были использованы ковалентные методики на основе карбодиимидных активаторов. Однако использование активаторов привело к формированию сшитых между собой частиц с образованием крупных агрегатов. Поэтому для дальнейшего использования в иммунохроматографии были выбраны МЧ@ТЭОС, несмотря на их высокое значение ζ -потенциала (-1.4 \pm 0.3 мВ), но благодаря оптимальному размеру (780 нм), сферической форме МЧ, плотной структуре оболочки. Также они позволяют иммобилизовать антитела методом физической адсорбции.

Методом иммуноферментного анализа показано, что на поверхности МЧ адсорбируется до 44 % антител от общего введенного количества (табл. 7).

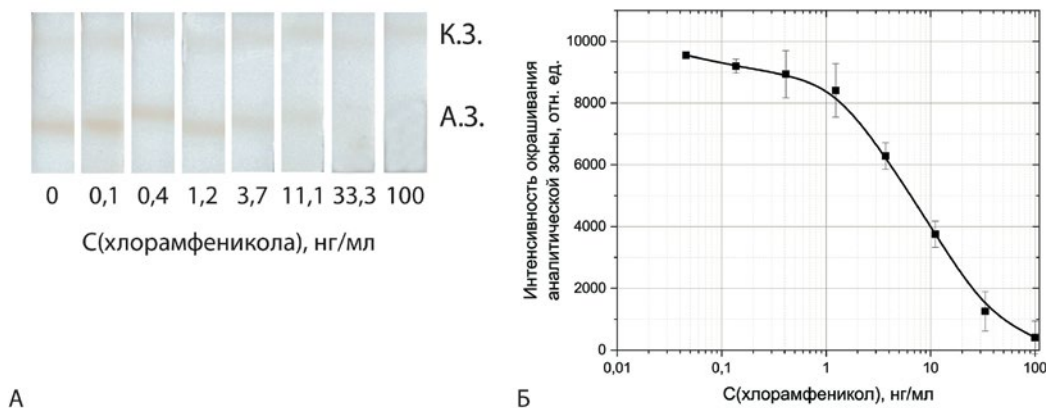


Рис. 3. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (А.З.) иммунохроматографической тест-полоски от концентрации хлорамфеникола: А – внешний вид тест-полосок, Б – калибровочная кривая

Fig. 3. Dependence of the color intensity of the analytical zone of the immunochromatographic test strip on the concentration of chloramphenicol: A – appearance of the test strips, B – calibration curve

Таблица 7

Количество связавшихся антител при синтезе конъюгатов МЧ-антитела

Table 7

Number of bound antibodies during the synthesis of MP-antibody conjugates

Конъюгат	Добавлено при синтезе, мкг/мл	Найдено в надосадке, мкг/мл	Количество связавшихся антител, %
МЧ@ТЭОС-антитела к ХФ	70	31	44
МЧ@ТЭОС-антитела к ТЦ	112	29	26

Иммунохроматография с использованием магнитных частиц в качестве маркера

Полученные препараты конъюгатов были использованы для проведения иммунохроматографического определения антибиотиков (хлорамфе-

никол и тетрациклин) и техногенных гормонально активных веществ (бисфенол А и дибутилфталат).

Вначале были получены концентрационные зависимости детекции хлорамфеникола и тетрациклина для ИХА с МЧ@ТЭОС в варианте, когда магнитные частицы просто добавляются к пробе перед контактом с тест-полоской, а их магнитные свойства не используются (рис. 3, 4). Визуальный предел обнаружения (PrO) хлорамфеникола составил 10 нг/мл. Инструментальный предел обнаружения 0.7 нг/мл, а рабочий диапазон — 1-50 нг/мл. Визуальный предел обнаружения тетрациклина составил 30 нг/мл. Инструментально установленный предел обнаружения составил 1.0 нг/мл, а рабочий диапазон — 1-10 нг/мл.

При проведении ИХА с использованием антител к бисфенолу А и дибутилфталату не наблюдалось достоверных изменений интенсивностей окрашивания аналитической зоны в зависимости от концентрации определяемых соединений. Эти результаты могут интерпретироваться как следствие низкой аффинности используемых антител, отмеченной и

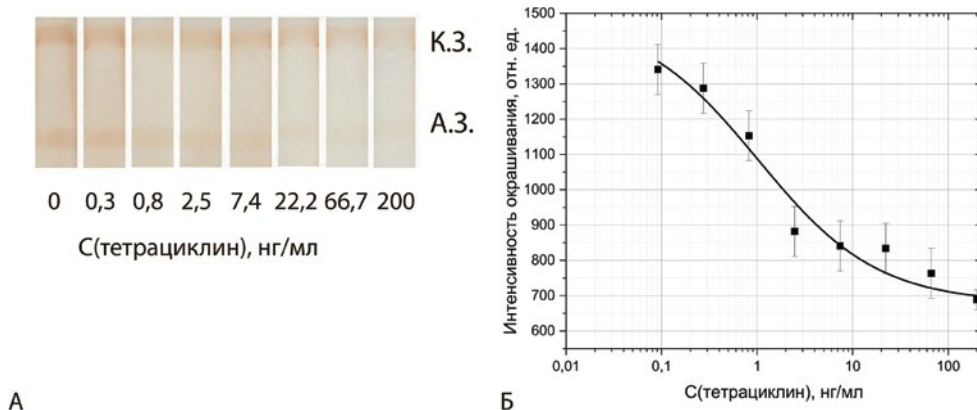


Рис. 4. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны иммунохроматографической тест-полоски от концентрации тетрациклина: А – внешний вид тест-полосок, Б – калибровочная кривая

Fig. 4. Dependence of the color intensity of the analytical zone of the immunochromatographic test strip on the concentration of tetracycline: A – appearance of the test strips, B – calibration curve

Таблица 8

Интенсивность окрашивания аналитических зон тест-полосок при проведении ИХА с иммуномагнитным концентрированием из разных объемов

Table 8

Intensity of coloring of analytical zones of test strips during ICA with immunomagnetic concentration from different volumes

Аналит	Без концентрирования, отн. ед.	Из 5 мл, отн. ед.	Из 10 мл, отн. ед.	Из 50 мл, отн. ед.
Хлорамфеникол	10740	5698	1538	3123
Тетрациклин	1319	126	147	38

в предыдущих работах с этими препаратами [16, 18]. Вследствие этого лишь небольшая часть антител на поверхности магнитных частиц блокируется антигеном и степень связывания функционализированных частиц с конъюгатом гаптен-белок практически не меняется. Возможные способы преодоления этого ограничения, представляющие интерес для дальнейших работ с этими препаратами, состоят в снижении числа антител, связанных с одной магнитной частицей, либо в использовании сочетания биотинилированных антител в растворе и конъюгата магнитных частиц со стрептавидином [14].

Имунохроматография с использованием магнитных частиц в качестве маркера и средства концентрирования аналита

Для снижения предела обнаружения было решено использовать магнитные свойства МЧ@ТЭОС и сконцентрировать антиген при помощи конъюгата магнитных частиц. Для оценки возможностей данного подхода были выбраны концентрации хлорамфеникола и тетрациклина, равные 0.3 нг/мл, так как для них в обычной иммунохроматографии регистрируемое окрашивание аналитических зон такое же, как и для отрицательных проб.

Опыты проводили для объемов проб 5, 10 и 50 мл, из которых антигены ресуспендировали в 200 мкл пробы, что соответствует концентрированию в 25, 50 и 250 раз. Данные по интенсивности окрашивания аналитических зон представлены в табл. 8.

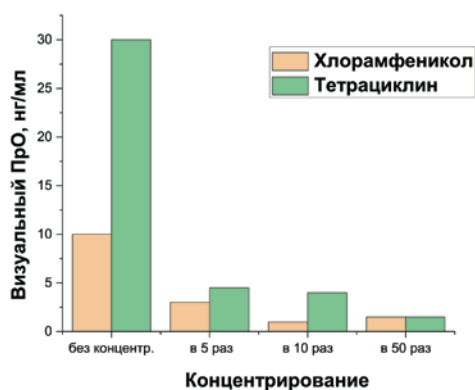


Рис. 5. Влияние объема пробы на снижение ПрО при проведении ИХА с концентрированием

Fig. 5. Effect of sample volume on the reduction of LOD during ICA with concentrating

Из представленных в таблице значений сигналов следует, что при увеличении объема пробы с одинаковой концентрацией аналита его концентрирование с дальнейшим анализом приводит к снижению интенсивности окрашивания аналитической зоны, что свидетельствует об обнаружении большего количества антигена. Так, при концентрировании образцов, не содержащих антиген, интенсивность окрашивания аналитической зоны составила 9550 ± 106 отн. ед. и 1340 ± 71 отн. ед. для хлорамфеникола и тетрациклина, соответственно.

На рис. 5 представлено влияние объема пробы на визуальный ПрО при иммунохроматографической детекции антибиотиков с концентрированием. Так, ПрО хлорамфеникола снизился с 10 нг/мл до 1 нг/мл при концентрировании из 10 мл пробы. ПрО тетрациклина снизился с 30 нг/мл до 1.5 нг/мл при концентрировании из 50 мл пробы.

На полноту выявления антигена в пробе влияет несколько факторов: аффинность специфических антител, растворимость антигена в водных растворах, степень осаждения МЧ под действием магнитного поля. В идеальных условиях снижение ПрО в нашем случае достигало бы максимально возможной величины в 250 раз. Однако, чем больше объем анализируемой пробы, тем сложнее достичь полноты выявления / экстракции антигена. Этим обусловлено снижение ПрО лишь в 20 раз.

На примере хлорамфеникола и тетрациклина показана возможность повышения чувствительности ИХА благодаря свойствам МЧ. Концентрирование проб позволило снизить ПрО в 3-12 раз в случае хлорамфеникола и в 9-20 раз в случае тетрациклина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало значимость поверхностной модификации магнитных частиц для эффективного и воспроизводимого аналитического применения. Показано, что оптимальным вариантом является применение ТЕОС в концентрации 271 мМ. Полученные препараты характеризовались средним диаметром 110 ± 10 нм по данным ПЭМ, полнотой осаждения в магнитном поле и последующего ресуспендирования. Применение конъюгатов магнитных частиц с антителами в качестве оптически детектируемых маркеров позволило реализовать конкурентное иммунохроматографическое выявление антибиотиков хлорамфеникола и тетрациклина с пределами обнаружения 10 нг/мл и 30 нг/мл, соответ-

ственно. Рассмотрено магнитное концентрирование с сокращением конечных объемов тестируемых проб до 250 раз. Показано, что в выбранных оптимальных условиях предел обнаружения может быть снижен до 20 раз, составляя в случае тетрациклина 1.5 нг/мл. Рассмотренный подход, объединяющий иммуномагнитное концентрирование и иммунохроматографию, характеризуется экспрессностью и простотой реализации, что определяет перспективность его применения для высокочувствительного обнаружения разнообразных соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 24-23-00523).

The study was carried out with financial support from the Russian Science Foundation (grant 24-23-00523).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sensing food contaminants: advances in analytical methods and techniques / R. S. Rodriguez [et al.] // *Anal. Chem.* 2020. V. 93. P. 23-40.
2. Methods of detection of food-borne pathogens: a review / Saravanan A. [et al.] // *Environmental Chem. Lett.* 2021. V. 19. P. 189-207.
3. Domínguez I., Frenich A. G., Romero-González R. Mass spectrometry approaches to ensure food safety // *Anal. Methods.* 2020. V. 12. P. 1148-1162.
4. Comprehensive strategy for sample preparation for the analysis of food contaminants and residues by GC-MS/MS: A review of recent research trends / Xu M.-L. [et al.] // *Foods.* 2021. V. 10. Article 2473.
5. Biological applications of magnetic nanoparticles / Colombo M. [et al.] // *Chem. Society Reviews.* 2012. V. 41. P. 4306-4334.
6. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: past, present, and future trends / Stueber D. D. [et al.] // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. Article 943.
7. Rocha-Santos T. A. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014. V. 62. P. 28-36.
8. Urusov A., Petrakova A., Zherdev A., Dzantiev B. Application of magnetic nanoparticles in immunoassay // *Nanotechnologies in Russia.* 2017. V. 12. P. 471-479.
9. Cicek S., Kaba I. Unravelling the potential of magnetic nanoparticles: a comprehensive review of design and applications in analytical chemistry // *Anal. Methods.* 2024. V. 16, P. 3620-3640.
10. Review on recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, and diverse applications / Ali A. [et al.] // *Frontiers Chem.* 2021. V. 9. Article 629054.
11. Ahangaran F., Navarchian A. H. Recent advances in chemical surface modification of metal oxide nanoparticles with silane coupling agents: A review // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020. V. 286. Article 102298.
12. Effects of Fe₃O₄ nanoparticle fabrication and surface modification on *Chlorella* sp. harvesting efficiency / Liu P. [et al.] // *Sci. Total Environment.* 2020. V. 704. Article 135286.
13. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles / Razo S. C. [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1007. P. 50-60.

14. Panferov V. G., Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. P. 1-8.
15. Application of magnetite nanoparticles for the development of highly sensitive immunochromatographic test systems for mycotoxin detection / Petrakova A.V. [et al.] // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. P. 470-475.
16. Development of lateral flow test-system for the immunoassay of dibutyl phthalate in natural waters / Berlina A. N. [et al.] // *Biosensors.* 2022. V. 12. Article 1002.
17. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol / Zvereva E. A. [et al.] // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. P. 6378-6384.
18. Comparison of Conjugates Obtained Using DMSO and DMF as Solvents in the Production of Polyclonal Antibodies and ELISA Development: A Case Study on Bisphenol A / Berlina A. N. [et al.] // *Antibodies.* 2024. V. 13. Article 89.
19. Rapid immunoenzyme assay of aflatoxin B1 using magnetic nanoparticles / Urusov A. E. [et al.] // *Sensors.* 2014. V. 14. P. 21843-21857.
20. Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles // *Chem. Commun.* 2003. P. 927-934. doi: 10.1039/B207789B
21. Comparative study of strategies for antibody immobilization onto the surface of magnetic particles in pseudo-homogeneous enzyme immunoassay of aflatoxin B1 / Petrakova A.V. [et al.] // *Moscow Univer. Chem. Bulletin.* 2016. V. 71. P. 48-53.
22. Kodama R. Magnetic nanoparticles // *J. Magn. Magn. Mater.* 1999. V. 200. P. 359-372.
23. Magnetic nanoparticles for biomedical applications: from the soul of the earth to the deep history of ourselves / Martins P. M. [et al.] // *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. V. 4. P. 5839-5870.
24. Spicar-Mihalic P. Old But Good: Advances and Strategies in Developing Nitrocellulose-based Flow-through immunoassay. University of Washington, 2010. 20 p.
25. Kalska-Szostko B., Wykowska U., Piekut K., Satuła D. Stability of Fe₃O₄ nanoparticles in various model solutions // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2014. V. 450. P. 15-24.
26. Doane T. L., Chuang C.-H., Hill R. J., Burda C. Nanoparticle ζ-potentials // *Accounts Chem. Res.* 2012. V. 45. P. 317-326.

REFERENCES

1. Rodriguez R. S., O'Keefe T. L., Froehlich C., Lewis R. E., Sheldon T. R., Haynes C. L. Sensing food contaminants: advances in analytical methods and techniques. *Anal. Chem.*, 2020, vol. 93, no. 1, pp. 23-40. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04357.
2. Saravanan A., Kumar P. S., Hemavathy R., Jeevanantham S., Kamalesh R., Sneha S., Yaashikaa P. Methods of detection of food-borne pathogens: a review. *Environmental Chem. Lett.*, 2021, vol. 19, pp. 189-207. doi: 10.1007/s10311-020-01072-z.
3. Domínguez I., Frenich A. G., Romero-González R. Mass spectrometry approaches to ensure food safety. *Anal. Methods*, 2020, vol. 12, no. 9, pp. 1148-1162. doi: 10.1039/C9AY02681A.
4. Xu M.-L., Gao Y., Wang X., Han X. X., Zhao B. Comprehensive strategy for sample preparation for the analysis of food contaminants and residues by GC-MS/MS: A review of recent research trend. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 10, article 2473.
5. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M. F., Gutiérrez L., Morales M. P., Böhm I. B., Heverhagen J. T., Prosperi D., Parak W. J. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Society Reviews*, 2012, vol. 41, no. 11, pp. 4306-4334. doi: 10.3390/foods10102473.

6. Stueber D. D., Villanova J., Aponte I., Xiao Z., Colvin V. L. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: past, present, and future trends. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, no. 7, article 943. doi: 10.3390/pharmaceutics13070943.
7. Rocha-Santos T. A. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticle. *TRAC Trends Anal. Chem.*, 2014, vol. 62, pp. 28-36. doi: 10.1016/j.trac.2014.06.016.
8. Urusov A., Petrakova A., Zherdev A., Dzantiev B. Application of magnetic nanoparticles in immunoassay. *Nanotechnologies in Russia*, 2017, vol. 12, pp. 471-479. doi: 10.1134/S1995078017050135.
9. Cicek S., Kaba I. Unravelling the potential of magnetic nanoparticles: a comprehensive review of design and applications in analytical chemistr. *Anal. Methods*, 2024, vol. 16, pp. 3620-3640. doi:10.1039/D4AY00206G.
10. Ali A., Shah T., Ullah R., Zhou P., Guo M., Ovais M., Tan Z., Rui Y. Review on recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, and diverse applications. *Frontiers chem.*, 2021, vol. 9, article 629054. doi: 10.3389/fchem.2021.629054.
11. Ahangaran F., Navarchian A. H. Recent advances in chemical surface modification of metal oxide nanoparticles with silane coupling agents: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2020, vol. 286, article 102298. doi: 10.1016/j.cis.2020.102298.
12. Liu P., Wang T., Yang Z., Hong Y., Xie X., Hou Y. Effects of Fe₃O₄ nanoparticle fabrication and surface modification on *Chlorella sp.* harvesting efficiency, *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 704, article 135286. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135286.
13. Razo S. C., Panferov V. G., Safenkova I. V., Varitsev Y. A., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, 2018, vol. 1007, pp. 50-60. doi: 10.1016/j.aca.2017.12.023.
14. Panferov V. G., Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X. *Microchim. Acta*, 2018, vol. 185, pp. 1-8. doi: 10.1007/s00604-018-3052-7.
15. Petrakova A., Urusov A., Zherdev A., Liu L., Xu C., Dzantiev B. Application of magnetite nanoparticles for the development of highly sensitive immunochromatographic test systems for mycotoxin detection. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2017, vol. 53, pp. 470-475. doi: 10.1134/S0003683817040111.
16. Berlina A. N., Ragozina M. Y., Komova N. S., Serebrennikova K. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Development of lateral flow test-system for the immunoassay of dibutyl phthalate in natural waters. *Biosensors*, 2022, vol. 12, no. 11, article 1002. doi: 10.3390/bios12111002.
17. Zvereva E. A., Byzova N. A., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods*, 2015, vol. 7, no. 15, pp. 6378-6384. doi: 10.1039/C5AY00835B.
18. Berlina A. N., Komova N. S., Serebrennikova K. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Comparison of Conjugates Obtained Using DMSO and DMF as Solvents in the Production of Polyclonal Antibodies and ELISA Development: A Case Study on Bisphenol A. *Antibodies*, 2024, vol. 13, no. 4, article 89. doi: 10.3390/antib13040089.
19. Urusov A. E., Petrakova A. V., Vozniak M. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Rapid immunoenzyme assay of aflatoxin B1 using magnetic nanoparticles. *Sensors*, 2014, vol. 14, no. 11, pp. 21843-21857. doi: 10.3390/s141121843.
20. Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chem. Commun.*, 2003, no. 8, pp. 927-934. doi: 10.1039/B207789B.
21. Petrakova A., Urusov A., Zherdev A., Dzantiev B. Comparative study of strategies for antibody immobilization onto the surface of magnetic particles in pseudo-homogeneous enzyme immunoassay of aflatoxin B1. *Moscow Univer. Chem. Bulletin*, 2016, vol. 71, pp. 48-53. doi: 10.3103/S0027131416010119.
22. Kodama R. Magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 1999, vol. 200, no. 1-3, pp. 359-372. doi: 10.1016/S0304-8853(99)00347-9.
23. Martins P. M., Lima A. C., Ribeiro S., Lanceros-Mendez S., Martins P. Magnetic nanoparticles for biomedical applications: from the soul of the earth to the deep history of ourselves. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2021, vol. 4, no. 8, pp. 5839-5870. doi: 10.1021/acsabm.1c00440.
24. Spicar-Mihalic P. *Old But Good: Advances and Strategies in Developing Nitrocellulose-based Flow-through immunoassay*. University of Washington, 2010.
25. Kalska-Szostko B., Wykowska U., Piekut K., Satuła D. Stability of Fe₃O₄ nanoparticles in various model solutions. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014, vol. 450, pp. 15-24. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.03.002.
26. Doane T. L., Chuang C.-H., Hill R. J., Burda C. Nanoparticle ζ -potentials. *Accounts Chem. Res.*, 2012, vol. 45, no. 3, pp. 317-326. doi: 10.1021/ar200113c.