

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

О. В. Воронежцева<sup>1</sup>, С. А. Еремин<sup>2</sup>, Т. Н. Ермолаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Липецкий государственный технический университет

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию 02.08.2009 г.

**Аннотация.** Разработана методика определения аминогликозидных антибиотиков (гентамицин, канамицин, стрептомицин) в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА). Изучено влияние размера и структуры флуоресцентной молекулы на степень поляризации флуоресценции. Установлены константы аффинности антител к определяемым соединениям и трейсерам (гаптен, меченный флуоресцентной меткой), оптимизированы рабочие концентрации трейсеров и антител, обеспечивающих максимальное значение аналитического сигнала (*mP*). Сопоставлены результаты определения аминогликозидных антибиотиков способами двухстадийного и одностадийного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Предел обнаружения гентамицина, канамицина, стрептомицина в двухстадийном и одностадийном форматах составляет: 110, 80, 15 и 90, 70, 18 нг/мл, соответственно. Методики апробированы при определении антибиотиков в молоке и курином мясе.

**Ключевые слова:** поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, антибиотик, гентамицин, канамицин, стрептомицин, анализ пищевых продуктов.

**Abstract.** The methodic for determination of aminoglycoside antibiotics (gentamicin, kanamycin, streptomycin) in food by polarization fluorescent immunoassay (PFIA) is developed. The size and structure influence of a fluorescent molecule on a fluorescence polarization degree is analyzed. Affinity constants of antibodies to compounds and tracers were estimated, optimized working concentration of tracers and antibodies that provide the maximum value of analytical signal (*mP*). Results of aminoglycoside antibiotics determination by means of two-stage and single-stage polarization fluorescent immunoassay were compared. Detection limits of gentamicin, kanamycin, streptomycin in two-stage and a single-stage format are: 110, 80, 15 and 90, 70, 18 ng/ml, respectively. Methods were tested in the antibiotics identification in milk and chicken.

**Keywords:** polarization fluorescence immunoassay, antibiotic; gentamicin; kanamycin; streptomycin; food testing.

### ВВЕДЕНИЕ

Неотъемлемым условием интенсивного развития животноводства является использование лекарственных средств для борьбы с инфекционными заболеваниями и повышения продуктивности, что делает возможным присутствие остаточных количеств этих препаратов в сельскохозяйственной продукции.

В настоящее время на практике для обнаружения и количественного определения антибиотиков применяют следующие методы:

- микробиологические, основанные на способности антибиотиков к ингибированию микроорганизмов, позволяют определять лекарственные препараты только на полуколичественном уровне, длительны и неточны [1—2];

- физико-химические — могут быть рекомендованы для скрининга и чувствительного определения ветеринарных препаратов, однако включают достаточно сложную процедуру пробоподготовки и требуют дорогостоящего оборудования [3—6];

- экспрессные методы анализа. К таким методам может быть отнесен поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА), позволяющий осуществлять контроль за содержанием токсикантов, практически без пробоподготовки [7].

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ основан на конкурентном связывании определяемого соединения и трейсера (аналита, меченого флуоресцентной меткой) с антителами и уже положительно зарекомендовал себя при анализе пищевых продуктов [8—10]. Проведение определения непосредственно в растворе объясняет его экспрессность, а использование высокоспе-

цифических иммунореагентов позволяет достичь высокой степени селективности.

Аминогликозидные антибиотики продолжают оставаться наиболее широко распространенными препаратами для лечения птиц и животных вследствие их эффективности и невысокой стоимости. Так, гентамицин, канамицин и стрептомицин применяют для лечения телят, подсвинков и цыплят. Уровень аминогликозидных антибиотиков в продукции животноводства строго нормируется. Например, содержание стрептомицина согласно нормативам Европейского союза составляет — 500 мкг/кг в мясе и печени, 1000 мкг/кг в почках, 200 мкг/л в молоке. В Германии ограничено 20 мкг/кг содержание стрептомицина в меде. ПДК гентамицина и канамицина в различных продовольственных продуктах 100 мкг/кг. Еще более низкие значения ПДК установлены для детского питания [11].

Поэтому необходима разработка новых методов определения остаточных количеств антибиотиков, позволяющих повысить уровень безопасности пищевой продукции.

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

**Реактивы:** азид, хлорид натрия, ацетон (х.ч., Россия); этиловый спирт (ч.д.а., Россия); стрептомицин; гентамицин; канамицин; поликлональные антитела к стрептомицину (An-STP), гентамицину (An-GENT), канамицину (An-KANA), любезно предоставлены профессором Р. Абулкнешей (Королевский колледж, Великобритания); трейсеры — к гентамицину с флуоресцентной меткой флуоресцеинизотиоционат (GENT-FITC), 5-([4,6-дихлоротриазин-2-ил]амино)-флуоресцеин (GENT-DTAF), к канамицину с флуоресцентной меткой флуоресцеинизотиоционат (KANA-FITC), к стрептомицину с флуоресцентной меткой этилендиаминфлуоресцеин (STR-cc-EDF) («Sigma», США).

Для приготовления 1 л боратного буферного раствора, pH=8,0 растворяли 0.95 г  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 1.00 г  $\text{Na}_3\text{N}$ .

Денатурированные белки отделяли на настольной центрифуге ЦЛН-2 (КиргизИНТИ, Киргистан).

Поляризацию флуоресценции измеряли на ТДх-анализаторе («Abbott», США) и поляризационном флуориметре «Beacon 2000» («Panvera», США).

Для получения кривых титрования антител проводили серийное разведение растворов тестируемых антител: в 10 кюветках последовательно разбавляли антитела 500 мкл боратного буферного

раствора, начиная с разведения 1 : 20. Затем во все кюветы добавляли по 500 мкл рабочего раствора трейсера и измеряли поляризацию флуоресценции ( $mP$ ). По результатам измерений строили график зависимости разведения антител от величины поляризации флуоресценции ( $mP$ ), и по этому графику определяли разведение антител, вызывающее 70%-ное связывание трейсера.

При построении градуировочного графика, к 50 мкл раствора антибиотика с концентрацией 0.001—100.0 мкг/мл добавляли 500 мкл рабочего раствора трейсера и 500 мкл антител с разведением, соответствующем 70%-ному связыванию. Смесь перемешивали и измеряли поляризацию флуоресценции.

Измерение на приборе ТДх в полуавтоматическом режиме с ручным дозированием осуществляли по программе «Photo Check».

Подготовку проб куриного мяса осуществляли по следующей методике: мясо предварительно гомогенизировали, а затем экстрагировали антибиотик. К 10,0 г пробы добавляли 50 мл бидистиллированной воды и 10 мл насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , для отделения белковых компонентов, перемешивали, охлаждали и центрифугировали 8 мин (7000 об/мин). Надосадочную жидкость использовали для анализа.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На степень поляризации флуоресценции влияют различные факторы: размер (или масса) флуоресцентной молекулы, температура и вязкость раствора. При поддержании постоянными температуры и вязкости раствора поляризация флуоресценции будет зависеть только от размера молекулы флуоресцеина. Чувствительность и селективность анализа определяется концентрацией и природой трейсера, природой антител, поэтому было необходимо определить рабочие концентрации, установить аффинность и кросс-реактивность применяемых иммунореагентов.

Концентрацию трейсеров в ПФИА выбирали исходя из возможностей прибора: ее значение должно обеспечивать интенсивность флуоресценции, превышающую фон (интенсивность боратного буферного физиологического раствора) в 10 и более раз. С другой стороны, чувствительность анализа будет тем ниже, чем меньшие концентрации иммунореагентов используются. В качестве рабочих были выбраны концентрации трейсеров STR-cc-EDF, GENT-FITC и KANA-FITC, соответствующие 15-кратному превышению сигнала фона (табл. 1).

Таблица 1  
Оптимальные значения разведения трейсеров

Антибиотик	Трейсер	Разведение
Стрептомицин	STR-cc-EDF	1/20000
Гентамицин	GENT-FITC	1/4000
Гентамицин	GENT-DTAF	1/25000
Канамицин	KANA-FITC	1/30000

Рабочие концентрации трейсеров установлены спектрофотометрически (при длине волны 492 нм) и составили 1—3 нМ.

Было оценено влияние структуры трейсера на аналитические характеристики ПФИА, на примере гентамицина. Рассмотрены две структуры флуоресцентных меток: FITC и DTAF (рис. 1).

Максимальное связывание со специфическими антителами обеспечивает трейсер GENT-FITC, поскольку, в отличие от GENT-DTAF, не вызывает стерических затруднений при взаимодействии.

Оптимальную пару иммунореагентов выбирали с учетом максимального значения поляризации флуоресценции, возможно более широкого линейного диапазона зависимости  $mP$  от степени разведения антител и величины аналитического сигнала. В некоторых исследованиях в области иммуноанализа рекомендуется использовать разведение соответствующее 50%-ному связыванию (т.е. разведение, равное титру антител), однако для ПФИА при таком разведении перепад сигнала градуировочного графика (разница между максимальным и минимальным значением сигнала) оказывается недостаточным для обеспечения высокой чувствительности. Поэтому в ПФИА чаще используют разведение антител при 70%-ном связывании (рис. 2).

Важным условием проведения поляризационного флуоресцентного иммуноанализа является возможность образования прочных иммунных комплексов между аналитом и антителами и трей-

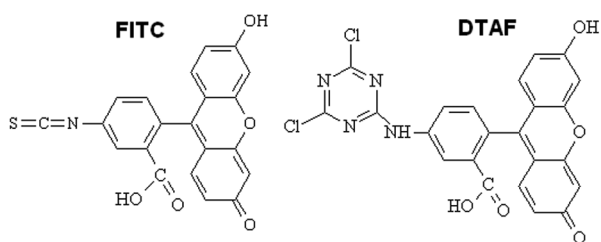


Рис. 1. Структурные формулы флуоресцентных меток

Таблица 2  
Константы аффинности и константы трейсера применяемых пар иммунореагентов

Соединение	Применяемые иммунореагенты	$K_{Аф} \cdot 10^{-8}$	$K_T \cdot 10^{-7}$
GENT	GENT-FITC + An-GENT	3,6	4,1
KANA	KANA-FITC + An-KANA	8,4	5,2
STP	STR-cc-EDF + An-STP	2,3	1,4

сером и антителами. Необходимо, чтобы между константой аффинности ( $K_{Аф}$ ) и константой трейсера ( $K_T$ ) выполнялось следующее соотношение:  $K_{Аф} > K_T$  на 1—2 порядка, так как только в этом случае возможно вытеснение трейсера из предварительно организованного комплекса. Было установлено, что константы связывания трейсер-антитело и антитело-антиген всех применяемых пар иммунореагентов различаются на порядок (табл. 2), поэтому все исследуемые иммунореагенты можно использовать в ПФИА. Высокие значения  $K_{Аф}$  порядка  $10^8$  свидетельствуют о высокой специфичности иммунореагентов и стабильности иммунокомплекса.

Для оценки кросс-реактивности поликлональных антител, полученных на антибиотики, рассчитаны коэффициенты перекрестного реагирования (ПР, %) (табл. 3) на соединения родственной структуры.

Значения ПР % для структурных аналогов, составляющие 0,01—5,00 %, и ПР %, для антибиотиков, на которые получены соответствующие

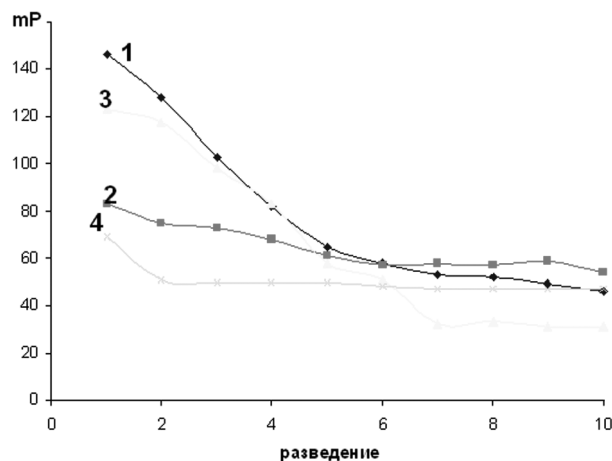


Рис. 2. Кривые титрования антител: GENT-FITC (1); STR-cc-EDF (2); KANA-FITC (3); GENT-DTAF (4)

Коэффициенты перекрестного реагирования (ПР %)

Структурные аналоги	Антибиотик		
	Гентамицин	Канамицин	Стрептомицин
Гентамицин	100,00	< 0,01	< 0,01
Канамицин	< 0,01	100,00	< 0,01
Стрептомицин	< 0,01	< 0,01	100,00
Дигидрострептомицин	< 0,01	< 0,01	50,00
Амикацин	0,50	1,00	< 0,01
Неомицин	< 0,01	< 0,01	0,50
Тобрамицин	3,00	5,00	< 0,01

антитела, равные 100 %, свидетельствует о высоко-специфичном связывании индивидуальных соединений при совместном присутствии в пробе. Исключение составляет антитела к стрептомицину, которые проявляют высокую кросс-реактивность и к его дигидропроизводному (50 %).

Для повышения устойчивости иммунореагентов и увеличения продолжительности их хранения предложено изменить формат анализа. Применение одностадийного варианта, в котором предварительно смешивают растворы антител и трейсера с образованием раствора иммунокомплекса, позволяет увеличить срок хранения иммунореа-

гентов до 50 дней, что подтверждено зависимостями аналитического сигнала от концентрации антибиотика, соответствующей 50 % ингибированию связывания ( $ИК_{50}$ ). Как видно из рис. 3 изменение активности реагентов в течение этого времени незначительно.

Изменение массы и объема реагентов может оказывать влияние на время достижения равновесия, которое было оценено по кинетическим кривым вытеснения трейсера антигеном (рис. 4). Было отмечено, что в одностадийном формате наблюдается увеличение времени по сравнению с двухстадийным с 7 мин до 30 мин.

На рис. 5 представлены градуировочные графики зависимости величины поляризации флуоресценции ( $mP/mP_0$ ) от концентрации стандартных

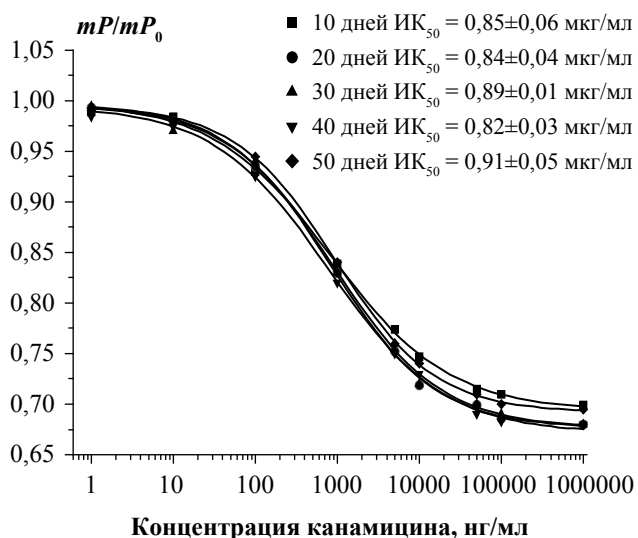


Рис. 3. Влияние времени хранения комплекса антитело-трейсер (KANA-FITC + An-KANA) на зависимость аналитического сигнала от концентрации канамицина, соответствующей 50 % ингибированию связывания ( $ИК_{50}$ )

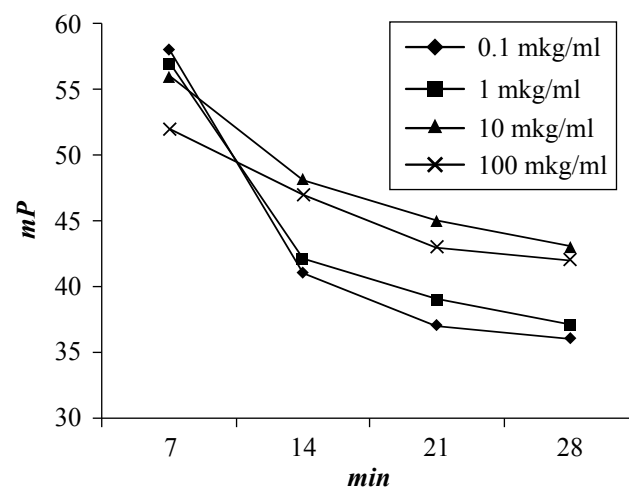


Рис. 4. Кинетические зависимости поляризации флуоресценции при взаимодействии стрептомицина с иммунокомплексом (STR-cc-EDF + An-STP)

Сравнение метрологических характеристик одностадийного и двухстадийного определения антибиотиков методом ПФИА

Антибиотик	Двухстадийный		Одностадийный	
	$C_{\min}$ , мкг/мл	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл	$C_{\min}$ , мкг/мл	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл
GENT	0,11	0,15—4,50	0,09	0,10—5,10
KANA	0,08	0,10—5,00	0,07	0,08—6,00
STP	0,02	0,02—10,00	0,02	0,02—10,00

растворов антибиотиков в одностадийном и двухстадийном форматах.

Разработанные методики определения антибиотиков применяли для анализа модельных растворов. Метрологические характеристики определения гентамицина, канамицина, стрептомицина одностадийным и двухстадийным форматами приведены в табл. 4.

В случае определения антибиотиков по одностадийным методикам наблюдается снижение предела обнаружения и расширение диапазона определяемых содержаний при определении гентамицина и канамицина.

Практическое применение ПФИА при анализе пищевых продуктов

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРЕПТОМИЦИНА В МОЛОКЕ

Наибольшее мешающее влияние при определении стрептомицина в молоке оказывают жиры. Было установлено, что молоко, содержащее 3—6 % жира (частное подворье), требует пятидесятикратного разведения (до концентрации жира 0,06—0,12 %) (табл. 5). При анализе молока с более низким содержанием жира возможно меньшее разведение пробы.

Во всех проанализированных пробах выявлено отсутствие стрептомицина — введенное и найденное количество стрептомицина совпадает.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В КУРИНОМ МЯСЕ

Изучены способы извлечения антибиотиков из куриного мяса с использованием ацетонитрила [12], смеси ацетонитрила с гексаном и дихлорэтаном [13], водного раствора ацетона [13], а также раствора сульфата аммония (18 %). Показано, что только при извлечении антибиотиков водным раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  достигается практически полное извлечение препаратов (93 % и выше). В остальных случаях степень извлечения составляет 60—80 %.

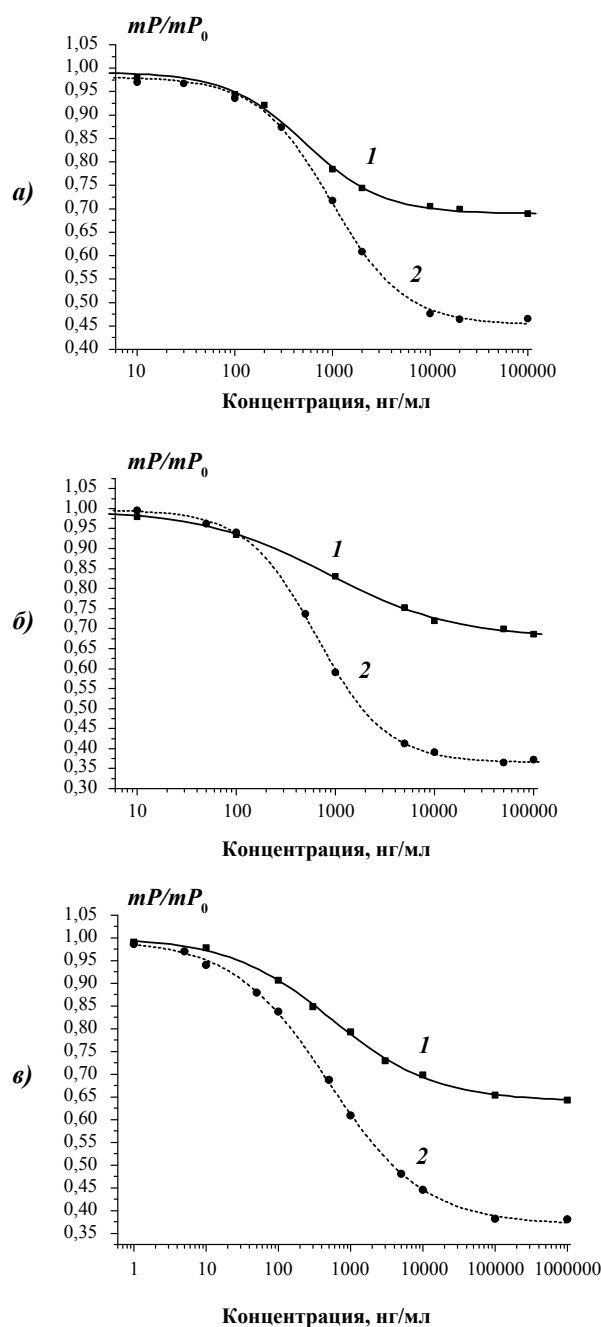


Рис. 5. Градуировочные графики для определения гентамицина (а), канамицина (б), стрептомицина (в) полученные в одностадийном (1) и двухстадийном форматах (2)

Результаты определения стрептомицина в молоке методом ПФИА

Введено	Молоко без разбавления		10-кратное разбавление		50-кратное разбавление	
	мкг/мл	найдено, мкг/мл	% открытия	найдено, мкг/мл	% открытия	найдено, мкг/мл
0,00	0,30±0,10	—	0	—	0	—
0,10	0,50±0,10	500±100	0,11±0,03	110±30	0,11±0,03	110±30
1,00	4,00±1,50	400±150	1,50±0,40	150±40	1,10±0,40	110±40
2,00	7,00±1,00	350±50	2,40±0,60	120±30	2,00±0,60	100±30
5,00	9,00±3,00	180±60	5,10±0,60	102±12	4,80±0,60	96±12

Таблица 6

Определение стрептомицина и гентамицина в курином мясе ( $P=0,95, n=3$ )

Объекты исследования	Найдено стрептомицина		$s_r$	Найдено гентамицина		$s_r$
	нг/мл	мг/кг		нг/мл	мг/кг	
Грудки куриные (Канада)	42,0±0,1	0,02±0,01	0,03	78,0±0,1	0,15±0,01	0,02
Грудки куриные (Москва, Россия)	47,6±0,1	0,02±0,01	0,02	105,0±0,1	0,21±0,01	0,04
Грудки куриные (Липецк, Россия)	27,7±0,1	0,02±0,01	0,03	57,3±0,2	0,11±0,01	0,02

Разработанные методики апробированы при анализе куриного мяса (табл. 6). Содержание антибиотика в исследуемых образцах пересчитано на 1 кг продукта. Во всех случаях не превышены значения ПДК для стрептомицина, но выявлено завышенное содержание гентамицина по сравнению с ПДК (0,10 мг/кг), введенными для стран Европейского союза (в России аналогичный показатель отсутствует). Наиболее высокие концентрации гентамицина обнаружены в куриных грудках произведенных на предприятиях Московского региона.

Проведенные исследования показали, что результаты определения антибиотиков в пищевых продуктах характеризуются высокой воспроизводимостью, селективностью и правильностью, поэтому методика может быть рекомендована для контроля безопасности пищевой продукции и выявления следовых концентраций аминогликозидных антибиотиков в мясе и молоке.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Липецкой области (грант № 09-03-97566\_p\_центр\_a).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haasnoot W. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney / W. Haasnoot, P. Stouten, G.

Cazemier, A. Lommen, Jacques F. M. Nouws, Henk J. Keukens // State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO), Bornsesteeg 45. — 1999.

2. Jin Y. Development of immunoassays for the detection of kanamycin in veterinary fields/ Y. Jin, Jin-Wook Jang, Chang-Hoon Han<sup>1</sup>, Mun-Han Lee J. // Vet Sci. — 2006. — № 7. — P. 111—117.

3. Bruijnsvoort M. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / M. Bruijnsvoort, S. J. M. Ottink, K. M. Jonker, E. Boer // J. Chromatogr. — 2004. — V. 1—2. — P. 137—142.

4. Zhen Y.F. Определение остатков линкозамидов и макролидов в тканях животных методом жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии (LC/MS/MS) / Y.F. Zhen, C.X. Xiao, X.Q. Li, J.N. Cai, H.H. Hong // Chin. J. Anal. Chem. — 2007. — V. 9. — P. 1290—1294.

5. Lima J. Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection / J. Lima, C. Delerue — Martos, C. Vaz // Analyst. — 2000. — V. 125. — P. 1281—1284.

6. Kaufmann A. Determination of 11 Aminoglycosides in Meat and liver by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / A. Kaufmann, K. Maden // Journal of AOAC International. — 2005. — V. 88. — P. 1118—1125.

7. Еремин С.А. Экспрессный иммунохимический метод определения гербицида метабензтиазурона / С.А.

Еремин, О.А. Мельниченко, С.Крейсиг, Б. Хок // Журн. аналит. хим. — 1995. — Т. 50. — №.9. — С. 971—978.

8. Zhang S. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of sulphamethazine in chicken muscle/ S. Zhang, Z. Wang, I.S. Nesterenko, S. A. Eremin, J. Shen // Int. J. Food Sci. Tech. — 2007. — V.42. — P. 36—44.

9. Goryacheva I. Yu. Rapid allinone three-step immunoassay for non-instrumental detection of ochratoxin A in high-coloured herbs and spices/ I. Yu. Goryacheva, S. De Saeger, I.S. Nesterenko, S. A. Eremin, C. Van. Peteghem // Talanta. — 2007. — V.72. — P. 1230—1234.

10. Wang Z. Monoclonal Antibody-Based Fluorescence Polarization Immunoassay for Sulfamethoxyipyridazine and

Sulfachloropyridazine / Z. Wang, S. Zhang, I.S. Nesterenko, S.A. Eremin, J. Shen // J. Agric. Food Chem. — 2007. — V. 55. — P. 6871—6878.

11. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

12. Crooks S. Detection of levamisole residues in bovine liver and milk by immunobiosensor / S. Crooks, B. Mc. Carney, I. Traynor, C. Thompson, S. Floyd, T. C. Elliott // Anal. Chimica Acta. — 2003. — V. 483. — P. 181—186.

13. Кальницкая О.И. Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах убоа, полученных из отечественного и импортного сырья / О. И. Кальницкая, А.Н. Туник, Б.В. Уша // Ветеринария. — 2007. — № 4. — С. 48—53.

---

*Воронежцева О. В.* — аспирант кафедры химии Липецкого государственного технического университета; тел.: (4742) 328-155, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

*Еремин С. А.* — профессор, вед. научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; тел.: (495) 939-4192, e-mail: eremin@enz.chem.msu.ru

*Ермолаева Т. Н.* — профессор, зав. кафедрой химии Липецкого государственного технического университета; тел.: (4742) 328155, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

*Voronezhstseva O. V.* — post-graduate, chair of Chemistry Department, Lipetsk State Technical University; tel.: (4742) 328155, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

*Eremin S. A.* — professor, leader scientist of the Group of Immunoassay (Chemical Enzymology Department), Moscow M. V. Lomonosov State University; tel.: (495) 939-4192, e-mail: eremin@enz.chem.msu.ru

*Ermolaeva T. N.* — professor, the head of the Chemistry Department, Lipetsk State Technical University; tel.: (4742)328155, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru