

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

О. В. Воронежцева¹, С. А. Еремин², Т. Н. Ермолаева¹

¹ Липецкий государственный технический университет

² 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 Na_3N .

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

Поляризацию флуоресценции замеряли 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-

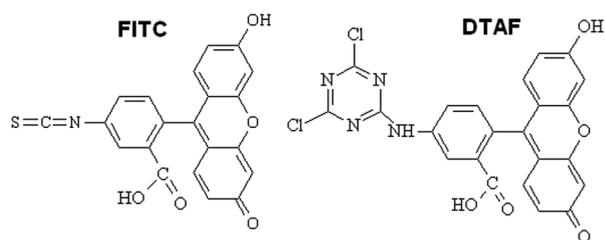


Рис. 1. Структурные формулы флуоресцентных меток

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

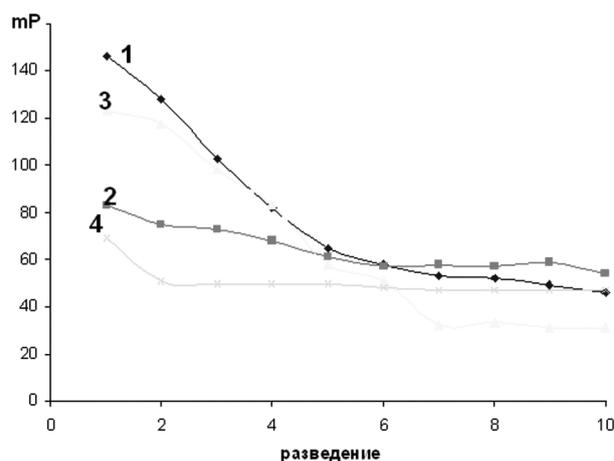


Рис. 2. Кривые титрования антител: GENT-FITC (1); STR-cc-EDF (2); KANA-FITC (3); GENT-DTAF (4)

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

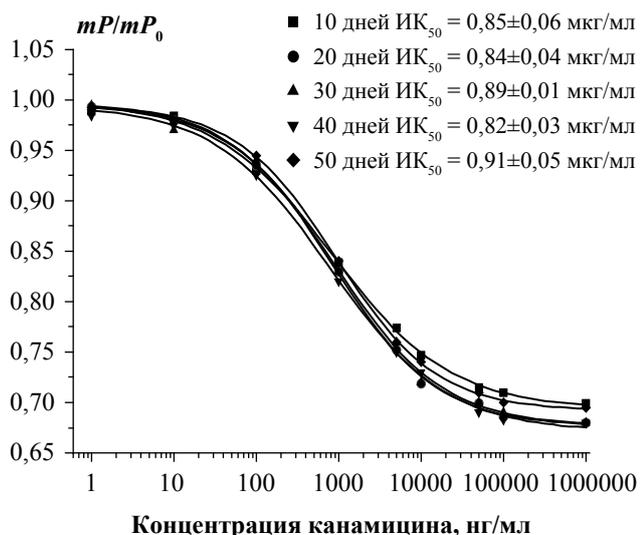


Рис. 3. Влияние времени хранения комплекса антитело-трейсер (KANA-FITC + An-KANA) на зависимость аналитического сигнала от концентрации канамицина, соответствующей 50 % ингибированию связывания ($ИК_{50}$)

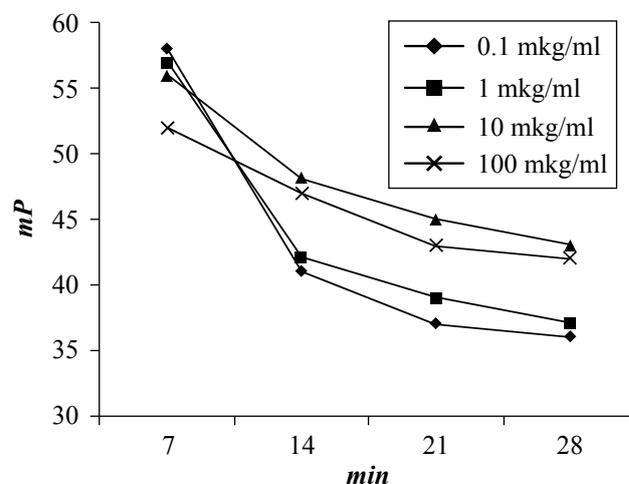


Рис. 4. Кинетические зависимости поляризации флуоресценции при взаимодействии стрептомицина с иммунокомплексом (STR-cc-EDF + An-STP)

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 $(NH_4)_2SO_4$ достигается практически полное извлечение препаратов (93 % и выше). В остальных случаях степень извлечения составляет 60—80 %.

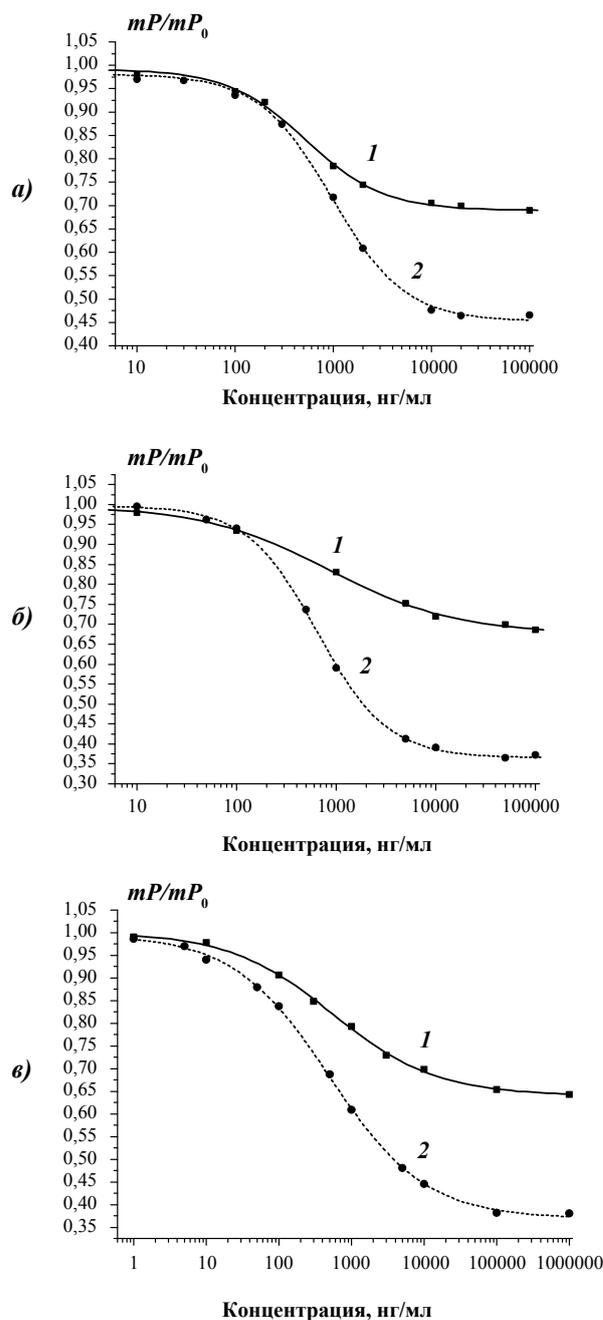


Рис. 5. Градуировочные графики для определения гентамицина (а), канамицина (б), стрептомицина (в) полученные в одностадийном (1) и двухстадийном форматах (2)

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 повышенное 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 Han¹, 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 убоя, 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