

УДК 543.63; 545.9; 681.518.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНТАМИЦИНА И НЕОМИЦИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

¹Фарафонова О.В., ¹Ермолаева Т.Н., ²Еремин С.А.

¹ФГБОУ ВПО Липецкий государственный технический университет, Липецк,
e-mail: farafonova.ov@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Предложены методики определения гентамицина и неомицина в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Синтезированы трейсеры, рассчитаны константы трейсеров (K_T) и аффинности поликлональных антител (K_{Ab}), выбраны оптимальные пары иммунореагентов для определения антибиотиков. Рассчитаны коэффициенты перекрестного реагирования (ПР%), значения которых указывают на возможность селективного определения гентамицина и неомицина в присутствии соединений родственной структуры. Градуировочный график линеен в диапазоне 40-5100 нг/мл для гентамицина и 70-2800 нг/мл для неомицина, предел обнаружения гентамицина и неомицина – 9 и 61 нг/мл соответственно. Исследованы экстракционные системы на основе ацетонитрила, гексана, дихлорэтана, ацетона, метанола и фосфатного буферного раствора для выделения неомицина и гентамицина из мяса и яиц. Разработанные методики апробированы для анализа куриного мяса, яиц, молока.

Ключевые слова: пищевой анализ, гентамицин, неомицин, антибиотики

GENTAMICIN AND NEOMYCIN DETERMINATION IN FOOD BY POLARIZED FLUORESCENCE IMMUNOASSAY

¹Farafonova O.V., ¹Ermolaeva T.N., ²Eremin S.A.

¹FGBOU VPO Lipetsk State Technical University, Lipetsk, e-mail: farafonova.ov@mail.ru;

²FGBOU VO Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow

Developed the determination techniques of gentamicin and neomycin in food by fluorescence polarization immunoassay. Synthesized tracers, calculated tracers constants (K_T) and polyclonal antibodies affinity constants (K_{Ab}), selected the best immunoreagents pair for antibiotics determination. Calculated cross-response coefficients (PR%), which values indicate the possibility of selective determination of gentamicin and neomycin with the presence of related structure compounds. The calibration curve was linear in the 40-5100 ng/ml range for gentamicin and 70-2800 ng/mL range for neomycin, detection limits for gentamicin and neomycin are 9 and 61 ng/ml, respectively. Studied extraction systems based on acetonitrile, hexane, dichloroethane, acetone, methanol and a phosphate buffer solution for separation of neomycin and gentamycin from the meat and eggs. The developed method was tested for the analysis of chicken meat, eggs, milk.

Keywords: food analysis, gentamicin, neomycin, antibiotics

Неконтролируемое использование гентамицина и неомицина для лечения и профилактики инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, птицы и пчёл приводит к их накоплению в мышечных тканях животных, молоке, мёде, яйцах. У людей, потребляющих в пищу такие продукты, возможно возникновение аллергических реакций, появление устойчивых к антибиотикам микроорганизмов, что затрудняет проведение лечения. Регламентированная ВОЗ предельно допустимая концентрация гентамицина в мясе крупного рогатого скота и свиней составляет 100 мкг/кг, в молоке 200 мкг/л, неомицина во всех пищевых продуктах 500 мкг/кг [1 – 3]. В продуктах для детского питания неомицин и гентамицин должны отсутствовать.

Наиболее часто для определения аминогликозидных антибиотиков применяют микробиологические и физико-химические методы, имеющие ряд недостатков и ограни-

чений по продолжительности и чувствительности. Метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) позволяет выявлять токсиканты непосредственно в пробе без предварительного выделения и характеризуется относительно высокой чувствительностью, поэтому может быть рекомендован для анализа пищевых продуктов. ПФИА уже положительно зарекомендовал себя для определения антибиотиков в медицинской практике [4 – 6], в тоже время методики определения гентамицина и неомицина в пищевых продуктах до настоящего времени не опубликованы.

Цель настоящего исследования – разработка методик определения гентамицина и неомицина в курином мясе, яйцах и молоке методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

Материалы и методы исследования

Реактивы: азид, хлорид натрия, сульфат аммония, ацетонитрил, метанол, этанол, хлороформ, аце-

тон, N-гидроксисукцинимид (о.с.ч., «Sigma-Aldrich», США), триэтиламин, диметилформамид (х.ч. «Merck», Германия); гентамицин (GENT), неомицин (NEO).

Использовали следующие антитела к гентамицину: поликлональные -ПАГ-1 («Abscam», Англия); ПАГ-2 (Китай), ПАГ-3, ПАГ-4, ПАГ-KLN-5 -сконъюгированные с гемоцианином (Королевский колледж, Лондон, Великобритания); моноклональные МАГ (Голландия). Поликлональные антитела к неомицину: ПАН-1 (Китай), ПАН-2 (Королевский колледж, Лондон, Великобритания).

Синтез трейсеров. Для синтеза трейсеров гентамицина в качестве метки использовали – флуоресцеинизотиоционат (ФИТЦ) и 5-([4,6-дихлоротриазин-2-ил]амино)-флуоресцеин (ДТАФ) («Sigma», США). Трейсер неомицина синтезировали с помощью ФИТЦ. В водно-метанольную смесь для связывания только через одну NH_2 - группу препарата вводили избыток антибиотика (130 мкмоль). Выделение антибиотиков, меченных флуоресцентной меткой, осуществляли методом тонкослойной хроматографии.

Пробоподготовка мяса и молока. Для извлечения неомицина и гентамицина из куриного мяса и яиц 10 г пробы гомогенизировали, добавляли 100 мл экстрагента и перемешивали в течение 1 ч, (через 20 мин вводили 30 мл 18%-ого сульфата аммония). Экстракт отделяли фильтрацией и дополнительно очищали от денатурированных белков центрифугированием на настольной центрифуге ЦЛН-2 (КиргизИНТИ, Киргизстан) в течение 8 мин (7000 об/мин). Супернатант использовали для анализа.

Молоко, содержащее менее 2,5% жира, анализировали после 3-х кратного разбавления боратым буферным раствором. При содержании жира более 2,5% к 10 мл пробы (молоко, разбавленное в 3 раза) добавляли 5 мл метанола для гидролиза жиров и вводили 2 мл сульфата аммония. Осадок отделяли центрифугированием (3 мин, 7000 об/мин).

Проведение анализа методом ПФИА. К 50 мкл супернатанта добавляли 400 мкл трейсера фиксированной концентрации и 50 мкл антител с концентрацией соответствующей 50% связыванию. Смесь перемешивали и измеряли поляризацию флуоресценции (двухстадийный формат анализа).

При проведении анализа в одностадийном формате к супернатанту добавляли 450 мкл предварительно синтезированного комплекса антител с трейсером. Для получения комплекса к 500 мл раствора антител с известной концентрацией добавляли 500 мл раствора трейсера. Инкубировали при 25 °С в течение 2 ч и хранили в темном месте при 4 °С.

Результаты исследования и их обсуждение

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ основан на конкуренции определяемого антигена с антигеном, меченным флуоресцентной меткой (трейсер), за ограниченное число центров связывания специфических антител. Аналитическим сигналом в ПФИА служит поляризация флуоресценции, величина которой зависит от концентрации трейсера и антител, строения флуоресцентной метки, присоединяемой к молекуле определяемого соединения, степени очистки трейсера, а также значения

констант трейсера (K_T) и аффинности ($K_{Аф}$), указывающих на сродство антител к трейсеру и определяемому соединению [7 – 8].

Выбор концентрации трейсеров осуществляли с учетом величины интенсивности флуоресценции [9]. По максимуму на спектре поглощения при длине волны 492 нм установлены концентрации трейсеров GENT-ФИТЦ; GENT-ДТАФ (250 нг/мл и 40 нг/мл) и NEO-ФИТЦ (180 нг/мл) соответственно. Интенсивность флуоресценции при этом превышает сигнала фона (боратного буферного раствора) в 15 раз.

С помощью графической зависимости $mP = f(\lg V)$ с учетом значений mP_{max} (максимальное значение поляризации флуоресценции для линейного участка графика) и диапазона линейности, определена рабочая концентрация антител ($C_{антител}$), соответствующая 50%-ному связыванию в иммунокомплексе. Использование концентраций антител за пределами линейных зависимостей приводит к искажению сигнала из-за неспецифического связывания трейсера с посторонними компонентами сыворотки. Отмечено, что при применении трейсера с флуоресцентной меткой ДТАФ наблюдается более низкое значение mP_{max} по сравнению с трейсером на основе ФИТЦ. Несмотря на превышение предельного значения mP_{max} (100 ед) для всех реагентов, кроме ПАГ-KLN-5 и GENT-ДТАФ ($mP_{max}=89$), более низкий предел обнаружения и широкий диапазон определяемых содержаний гентамицина достигаются только при применении антител ПАГ-1, ПАГ-3, ПАГ-4 или антител ПАН-1 при детектировании неомицина (табл. 1).

Для оценки сродства и специфичности определяемых соединений и антител по методике Скэтчарда установлены константы аффинности моноклональных антител. Поскольку поликлональные антитела представляют собой смесь высоко и низко аффинных фракций для них рассчитаны средневесовые значения $K_{Аф}$ [6].

Возможность использования иммунореагентов для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа оценивали путем сопоставления констант трейсера и констант аффинности (табл. 2).

Установлено, что во всех случаях константа аффинности превышает константу трейсера на 2 порядка (кроме пары ПАГ-1 и GENT-ДТАФ, для которой это отличие незначительно), что указывает на большее сродство антител к определяемым соединениям, чем к соединениям, связанным флуоресцентной меткой и возможность вытеснения трейсера аналитом из комплекса с антителами. Максимальные значения $K_{Аф}$ и различие между K_T и $K_{Аф}$ наблюдаются

при применении трейсеров GENT-ФИТЦ, НЕОМ-ФИТЦ и антисывороток ПАГ-3, ПАН-1. Эти пары иммунореагентов были использованы для разработки методик определения гентамицина и неомицина.

Оценку специфичности поликлональных антител осуществляли по значениям коэффициентов перекрестного реагирования (ПР%). Как видно из табл. 3 антитела ПАГ-1 и ПАН-1 показывают 100% связывание с гентамицином и неомицином и небольшие значения ПР% с другими соединениями родственного строения, которые могут присутствовать в пищевых продуктах. Это в первую очередь стрептомицин, входящий в состав комбинированных ветеринарных препаратов наряду с гентамицином (ПР% менее 0,1) и бацитрацин, применяемый как кормовой антибиотик, следовательно, при применении этих антител возможно селективное определение гентамицина и неомицина методом ПФИА.

Изучены условия определения антибиотиков с использованием антител предварительно связанных с трейсером в иммунокомплекс. Сопоставлены метрологические характеристики определения неомицина и гентамицина методом ПФИА с применением комплексов антител с трейсером (односта-

дийный формат анализа) и свободных (двухстадийный формат анализа) антител (табл. 4). Отмечено, что применение комплексов антител с трейсером не приводит к изменению диапазона определяемых содержаний и снижению предела обнаружения. В тоже время повышается стабильность раствора антител, так при повторном анализе не наблюдается отклонения от градуировочного графика (срок хранения возрастает с 7 до 50 дней), однако продолжительность получения аналитического сигнала увеличивается с 7 до 20 мин).

Для выделения неомицина и гентамицина из куриного мяса и яиц применяли экстракционные системы на основе ацетонитрила, гексана, дихлорэтана, ацетона, метанола и фосфатного буферного раствора (рН 7,2). Сопоставление значений R% антибиотиков показало, что только фосфатный буферный раствор, содержащий сульфат аммония, и ацетонитрил обеспечивают практически полное извлечение лекарственных препаратов из мяса и яиц (R 96%). Применение в качестве экстрагентов гексана, ацетона, дихлорэтана менее эффективно.

Разработанные методики апробированы при анализе куриного мяса, яиц и молока (табл. 5).

Таблица 1

Выбор рабочей концентрации антител для определения гентамицина и неомицина

Антитела	Трейсер	mP_{max}	Диапазон линейности (lg V)	$C_{антител}, мг/мл$
ПАГ-1	ДТАФ	215	2-4	0,20
	ФИТЦ	245	2-5	0,17
ПАГ-3	ДТАФ	189	3-5	0,18
	ФИТЦ	202	3-5	0,15
ПАГ-4	ДТАФ	148	2-4	0,35
	ФИТЦ	165	2-5	0,27
ПАГ-КЛН-5	ДТАФ	89	2-3	0,09
	ФИТЦ	112	2-3	0,08
ПАГ-2	ФИТЦ	152	2-4	0,41
МАГ	ФИТЦ	178	2-3	0,26
ПАН-1	ФИТЦ	164	2-4	0,15
ПАН-2	ФИТЦ	153	2-3	0,28

Таблица 2

Константы аффинности и константы трейсера

Пара иммунореагентов	$K_{Аф} \cdot 10^{-8}$	$K_T \cdot 10^{-6}$
GENT-ФИТЦ + ПАГ-1	3,6	4,1
GENT-ДТАФ + ПАГ-1	0,2	9,8
GENT-ФИТЦ + ПАГ-3	18,2	6,4
GENT-ДТАФ + ПАГ-3	5,6	0,2
GENT-ФИТЦ + ПАГ-4	4,5	4,7
GENT-ФИТЦ + ПАГ-2	5,6	1,2
GENT-ФИТЦ + МАГ	2,3	0,7
НЕОМ-ФИТЦ + ПАН-1	32,5	1,9

Таблица 3

Коэффициенты перекрестного реагирования (ПР%) поликлональных антител

Структурные аналоги	ПР % для гентамицина	ПР % для неомицина
Гентамицин	100,0	1,0
Канамицин	< 0,1	3,2
Стрептомицин	< 0,1	1,2
Дигидрострептомицин	< 0,1	1,0
Амикацин	5,0	0,8
Неомицин	< 0,1	100,0
Тобрамицин	3,0	4,3
Бацитрацин	2,5	5,7

Таблица 4

Метрологические характеристики определения гентамицина и неомицина методом ПФИА

Иммунореагенты	Двухстадийный		Одностадийный	
	C_{min} , нг/мл	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл	C_{min} , нг/мл	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл
GENT-ФИТЦ + ПАГ-1	11	50–4500	9	40–5100
НЕОМ-ФИТЦ + ПАН-1	50	70–2500	61	70–2800

Таблица 5

Результаты определения гентамицина и неомицина в экстракте из пищевых продуктов ($P = 0,95$, $n = 3$)

Объекты исследования		Найдено гентамицина, нг/мл	Найдено неомицина, нг/мл
Грудки куриные	Канада	78 ± 1	55 ± 4
	Москва, Россия	105 ± 1	0,15 ± 0,1
	Липецк, Россия	57 ± 2	60 ± 6
Яйца «Золотой петушок»	Липецк, Россия	62 ± 3	не обнаружено

Методики характеризуются высокой воспроизводимостью и селективностью. Не выявлено превышения регламентируемого содержания неомицина в курином мясе, яйцах и молоке, концентрация гентамицина в мясе превышает нормативы, установленные для стран ЕС (100 мкг/кг).

Заключение

Предложены методики определения гентамицина и неомицина на уровне ПДК и ниже в пищевых продуктах методом ПФИА. Градуировочный график линеен в диапазоне 40–5100 нг/мл для гентамицина и 70–2800 нг/мл для неомицина, предел обнаружения гентамицина и неомицина 9 и 61 нг/мл соответственно. Методики апробированы при определении антибиотиков в курином мясе, яйцах и молоке.

Список литературы

1. 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.
2. Кальницкая О.И. Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах убоя, полученных из отечественного и им-

портного сырья / О.И. Кальницкая, А.Н. Туник, Б.В. Уша // Ветеринария. – 2007. – № 4. – С. 48–53.

3. Jin Y. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin / Jin Y., Jang J.K., Han C.H., Lee M. H. J. // Vet Sci. – 2006. – No 7. – P. 111–117.

4. Zhang S. Fluorescence Polarization Immunoassay based on a Monoclonal Antibody for the Detection of Sulfamethazine in chicken muscle / Zhang S., Wang Z., Nesterenko I.S., Eremin S.A., Shen J. // Int. J. Food Sci. Tech. – 2007. – V. 42. – P. 36–44.

5. Tsuruoka M. Rapid Hybridization at High Salt Concentration and Detection of Bacterial DNA Using Fluorescence Polarization / Tsuruoka M., Karube I. // Comb. Chem. High T. SCR. – 2003. – V. 3. – P. 225–234.

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

7. Воронежцева О.В. Определение аминогликозидных антибиотиков в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / Воронежцева О.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. // Вестник ВГУ: серия химия, биология, фармация, Воронеж. – 2009. – № 2 (июль-декабрь). – С. 11–18.

8. Воронежцева О.В. Иммунохимические методы определения аминогликозидных и тетрациклиновых антибиотиков, трициклических антидепрессантов.: Автореф. дис. канд. хим. наук. – Воронеж, 2011. – 18 с.

9. Farafonova O.V. Determination of aminoglycosides in food by fluorescence polarization immunoassay / Farafonova O.V., Vasiliev S.V., Eremin S.A., Ermolaeva T.N. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 7–2 (38). – P. 65–69.