

**НОВАЯ МЕТОДИКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХЛОРАМФЕНИКОЛА В КАЗЕИНЕ
Т.А.Позняк¹, И.И. Вашкевич², О.В. Свиридов²**

¹*Белорусский государственный ветеринарный центр, Республика Беларусь*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь*
sylver_lio@mail.ru

Казеин является важным продовольственным и техническим продуктом и в больших масштабах производится предприятиями Минсельхозпрода РБ, в том числе и для поставок на экспорт. Максимально допустимые уровни остаточных количеств вредных веществ, в частности хлорамфеникола, в казеине, предназначенном для пищевых целей, регламентируются нормативными актами Таможенного Союза и Республики Беларусь. Хлорамфеникол – сильный и недорогой антибиотик широкого спектра действия, имеющий хорошие параметры фармакокинетики. Однако из-за разнообразных побочных эффектов (апластическая анемия, аллергические реакции, аплазия костного мозга, синдром синего младенца, галлюцинации) его остаточное содержание контролируется в продуктах питания практически во всех странах мира. При этом для количественного определения хлорамфеникола наиболее приемлемым методом для испытательных лабораторий является иммуноферментный анализ (ИФА). Необходимо отметить, что методики подготовки проб казеина для иммуноанализа токсичных веществ и проведения ИФА не отражены в научной литературе, технических нормативных правовых актах или метрологической документации. Поэтому целью данной работы была разработка методики подготовки проб казеина для анализа на наличие остаточных количеств хлорамфеникола с использованием первого отечественного набора реагентов «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ» [1, 2] и обработкой результатов с помощью программного обеспечения «ИФА-тест ХЛОРАМФЕНИКОЛ».

В принципе, определение малых (следовых) количеств хлорамфеникола в казеине подразумевает использование в качестве проб в ИФА очень концентрированных водных растворов этого белка или их экстрактов органическими растворителями, в которые способен переходить солюбилизированный хлорамфеникол. Однако казеин практически не растворяется в воде и поэтому мы стали развивать два подхода к пробоподготовке: растворение в щелочной среде (в присутствии или без денатурирующего агента) и протеолиз. Стояла задача получить не просто раствор казеина, а сделать его пригодным для обнаружения и количественного определения хлорамфеникола методом ИФА. Ведь матрикс приготовленных проб, особенно водных растворов казеина с солюбилизаторами, может оказывать ингибирующий эффект на иммунохимическую реакцию с участием хлорамфеникола, меченого ферментом, и отрицательно влиять на параметры качества ИФА, такие как предел обнаружения и открытие (извлечение).

Образцы. Для разработки методики были взяты образцы казеина, представленные в государственное учреждение «Белорусский государственный ветеринарный центр» для испытания на наличие остаточных количеств хлорамфеникола и по данным выполненного анализа не содержащие антибиотика. Подготовка казеина заключалась в гомогенизации лабораторного образца путем перемешивания и сильного измельчения на лабораторной мельнице. На основе полученного порошка готовили обогащенные хлорамфениколом образцы. Для этого раствор хлорамфеникола с концентрацией 10 нг/мл вносили в пробирку с навеской казеина перед его растворением. Концентрация обогащения (0,3 мкг/кг) была выбрана исходя из максимально допустимого уровня антибиотика в казеине, принятого в Республике Беларусь и таможенном Союзе.

Растворение в щелочи. Навеску казеина 1 г растворяли в 5 мл теплого 0,2 М NaOH, тщательно перемешивали на вортексе, оставляли на водяной бане в течение 1 ч с периодическим перемешиванием. После полного растворения казеина постепенно доводили

pH раствора до 7,5-7,8 прибавлением порций 0,5 н H_2SO_4 . Использовали этот раствор напрямую для ИФА, включающего стадию иммуoadсорбции в лунках планшета.

Растворение в присутствии денатурирующего агента и экстракция. Растворитель готовили путем смешивания равных объемов 4 М гуанидингидрохлорида и 0,4 М Na_2HPO_4 . В градуированной пробирке вместимостью 5 мл взвешивали 0,3 г казеина, добавляли растворитель до 2 мл и аккуратно перемешивали стеклянной палочкой. Полное растворение казеина достигалось за 3 ч. При этом не требовалось воздействия ультразвука, повышенной температуры, встряхивания или других физических воздействий. Весь объем раствора количественно переносили в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл. Исходную пробирку обмывали двумя порциями по 1,5 мл этилацетата, которые переносили в ту же центрифужную пробирку, помещали ее на 20 минут на шейкер с частотой вращений 180-230 об/мин, а затем центрифугировали при 10-15 °С и 4000 об/мин. Весь объем прозрачного слоя органического растворителя переносили в другую центрифужную пробирку. Добавляли 1,5 мл воды для промывки, интенсивно встряхивали на вортексе, центрифугировали, весь верхний этилацетатный слой переносили в пробирку для выпаривания. Испаряли досуха в токе азота при температуре 45 °С, не допуская пересушивания (испарение прекращали сразу после исчезновения запаха этилацетата). Сухой остаток растворяли в 0,3 мл раствора для разведения исследуемых проб из набора «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ», тщательно перемешивали на вортексе и использовали для ИФА.

Растворение путем протеолиза, подготовка пробы и проведение ИФА. В стеклянной пробирке взвешивали 0,25 г порошка казеина. Добавляли 1 мл фосфатного буфера со щелочным значением pH и 0,1 мл раствора субтилизина с известной концентрацией фермента. Слегка перемешивали вручную и помещали пробирку в термостат на 1 ч при температуре 50 °С. Во время инкубации в термостате периодически перемешивали вручную. После инкубации пробирку помещали в кипящую водяную баню на 5 минут. Это необходимо для инактивации фермента, так как в предварительных экспериментах было доказано его повреждающее воздействие на антитела, иммобилизованные в лунках планшетного иммуносorbента. К окончанию реакции pH смеси был немного более 8. Эта смесь, доведенная до комнатной температуры, использовалась в дальнейшей пробоподготовке.

Альтернативно, сначала измельченный казеин солюбилизировали в буферах с pH 9-10 или NaOH различной молярности в соотношении 1:5 (вес/объем). Для повышения эффективности процесса использовали нагревание на водяной бане, обработку ультразвуком и перемешивание. Когда система становилась гомогенной, добавляли рассчитанное количество субтилизина. Взаимодействие с ферментом при температуре 50 °С в течение 1 ч приводило к значительному снижению вязкости раствора, который при необходимости нейтрализовали микрообъемами концентрированной HCl до pH 8. Фермент ингибировали выдерживанием в течение 5 минут на кипящей водяной бане.

Дальнейшая пробоподготовка с использованием ферментного гидролизата казеина включала иммуoadсорбцию хлорамфеникола или экстракцию антибиотика этилацетатом так же, как из раствора казеина, содержащего денатурирующий агент. В первом случае встряхивали 0,25 мл раствора гидролизата в покрытой антителами лунке планшета из набора ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ при 37 °С в течение 1 ч. Одновременно в тех же условиях в других лунках инкубировали по 0,05 мл градуировочных растворов хлорамфеникола. После этого во всех лунках оставляли по 0,05 мл жидкости, добавляли по 0,05 мл конъюгата хлорамфеникола с пероксидазой хрена и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее проводили обычные операции промывки лунок, добавления хромоген-субстратного раствора (3,3',5,5'-тетраметилбензидин/ H_2O_2), остановки пероксидазной реакции 0,5 М серной кислотой и спектрофотометрирования при длине волны 450 нм. В случае экстракции проводили отбор экстракта, высушивание органического растворителя и растворение остатка в специальном буфере, как описано в методике применения набора для

извлечения хлорамфеникола из образцов других продуктов [2]. В отдельных экспериментах остаток растворяли в воде. Далее проводили ИФА по описанной методике [2].

Таким образом, выполнено несколько линий экспериментов, основанных на получении полностью солюбилизованного казеина и различающихся подготовкой проб для последующего ИФА. Эти пробы казеина можно обозначить следующим образом: 1) нейтрализованный щелочной раствор и иммуноадсорбция; 2) денатурированный раствор и экстракция; 3) ферментный гидролизат и иммуноадсорбция; 4) ферментный гидролизат и экстракция. По данным ИФА для всех экспериментальных линий рассчитывали показатели матрикс-эффекта (неспецифическое ингибирование связывания меченого хлорамфеникола с антителами), извлечения (открытия) хлорамфеникола, добавленного в образец, и повторяемости результатов анализа. Для наиболее перспективной линии находили пределы обнаружения и количественного определения антибиотика.

На основании сравнения полученных четырех групп аналитических параметров, соответствующих четырем описанным линиям экспериментов, нашли, что методики пробоподготовки 1-3 могут использоваться только для обнаружения антибиотика, а методика 4 имеет метрологические характеристики, которые обеспечивают измерение содержания хлорамфеникола в казеине. Так, в случае использования ферментного гидролиза казеина и экстракции хлорамфеникола из истинного раствора матрикс-эффект был минимальным (ниже 0,05 нг/мл по градуировочной кривой), извлечение находилось в пределах 75-125%, повторяемость (коэффициент вариации) для «чистых» образцов был менее 10 %, а для обогащенных хлорамфениколом образцов не превышал 15 %, предел обнаружения и предел количественного определения составили соответственно 0,1 и 0,2 мкг/кг (фактор разведения – 2).

ЛИТЕРАТУРА

[1] Вашкевич И.И., Позняк И.И., Свиридов О.В. *Конструкция и технические характеристики тест-системы для иммуноферментного анализа хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения. Весці НАН Беларусі. Сер. аграрных навук. 2013, № 1. С. 93-98.*

[2] Позняк Т.А., Русинович А.А., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. *Аналитические параметры отечественного набора реагентов «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ» по результатам испытаний в ветеринарных лабораториях. Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. 2013, № 2, 60-70.*

A NEW PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN CASEIN BY AN ENZYME IMMUNOASSAY

T.A. Poznyak¹, I.I. Vashkevich², O.V. Sviridov²

¹ *Belorussian State Veterinary Centre, Republic of Belarus*

² *Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus*
sylver_liv@mail.ru

A procedure has been developed for obtaining highly concentrated (up to 20 %) solutions of casein suitable for an enzyme immunoassay of chloramphenicol in the product using the reagent kit EIA-CHLORAMPHENICOL (IBOC NASB, Minsk, Belarus). The technique includes dissolving casein powder in an alkaline buffer, subtilisin digestion of the protein, chloramphenicol extraction with ethylacetate and further standard steps recommended with the kit. Based on experimental data, the following assay performance parameters have been calculated: chloramphenicol recovery – 75 to 122 %, intra-assay coefficient of variation < 10 % (chloramphenicol free samples) or < 15 % (chloramphenicol spiked samples), limit of detection – 0,1 µg/kg, limit of quantitation – 0,2 µg/kg (LOD and LOQ are at a dilution factor 2). It has been concluded that the new procedure meets the requirements of a safety control of foodstuffs.

