

## **Метрология, стандартизация, контроль**

УДК 573.6.086.83:57.083.3; 577.182.46; 637.07

М.Д. ФЕДОРОВА<sup>1</sup>, И.П. АНДРЕЕВА<sup>2,\*</sup>, Е.С. ВЫЛЕГЖАНИНА<sup>3</sup>, А.А. КОМАРОВ<sup>3</sup>, М.Ю. РУБЦОВА<sup>1</sup>,  
Ж.В. САМСОНОВА<sup>1</sup>, А.М. ЕГОРОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва, 119991

<sup>2</sup> ЗАО “НВО Иммунотех”, Москва, 119991

<sup>3</sup> Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ “ВГНКИ”), Москва, 123022

e-mail: imtek@newmail.ru

### **Иммуноферментный анализ хлорамфеникола в продуктах питания**

Разработана иммуноферментная тест-система для определения остаточных количеств хлорамфеникола (ХАФ) в продуктах питания. Чувствительность метода составила 0,05 мкг/л. Оптимизирована методика подготовки проб молока различной степени жирности и куриного мяса. Для анализа молоко развели буферным раствором в 5 раз. Предел обнаружения ХАФ в молоке составил 0,3 мкг/л, степень извлечения колебалась от 74 до 118%. Для образцов куриного мяса было предложено две методики подготовки проб: экстракция буферным раствором (экспресс-метод) и экстракция ацетонитрилом. Предел обнаружения ХАФ в образцах куриного мяса составил 0,5 и 0,3 мкг/кг, соответственно; степень извлечения составила 71—107 % и 95—115 %, соответственно. Определение остаточных количеств ХАФ в продуктах питания методами ИФА и ВЭЖХ-МС показало хорошую сходимость данных.

*Ключевые слова:* иммуноферментный анализ, продукты питания животного происхождения, хлорамфеникол.

Хлорамфеникол, или левомецетин, является относительно дешевым, высокоэффективным антибиотиком широкого спектра действия. Ранее ХАФ часто использовали в ветеринарной практике благодаря хорошим антибактериальным и фармакокинетическим свойствам. Для человека ХАФ является гемотоксичным веществом, способным вызывать аплазию костного мозга (потерю способ-

ности к кроветворению) и, вследствие этого, апластическую анемию. Поскольку дозы ХАФ, способные вызывать эти патологии, до сих пор не определены, использование хлорамфеникола для лечения продуктивных животных в ряде стран было запрещено (страны ЕС, США, Канада и др.). Однако в связи с высокой эффективностью, широким спектром действия и относительно низкой стои-

Федорова Марина Дмитриевна, Андреева Ирина Петровна, Вылегжанина Екатерина Сергеевна, Комаров Александр Анатольевич, Рубцова Майя Юрьевна, Самсонова Жанна Васильевна, Егоров Алексей Михайлович.

*Список сокращений:* ББ — 0,01 М боратный буфер, pH 8,6; БСА — бычий сывороточный альбумин; ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией; ДМФА — диметилформамид; ИФА — иммуноферментный анализ; КБ — 0,01 М Na-карбонатный буферный раствор; ОП — оптическая плотность; ПХ — пероксидаза хрена; ФБС — 0,01 М К-фосфатный буферный раствор с 0,15 М NaCl; ФБСТ — ФБС, содержащий 0,1% твин 20; ХАФ — хлорамфеникол; KLH (keyhole limpet hemocyanin) — гемоцианин лимфы улитки; MRPL (minimum required performance limit) — минимальная концентрация, определенная и подтвержденная арбитражным методом.

\* Автор для переписки.

мостью ХАФ до сих пор применяют (часто незаконно) для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний животных, птиц, пчел, ракообразных. В частности, остаточные количества ХАФ были найдены в креветках и меде, импортируемых из стран азиатского региона в Европу. Все это обуславливает необходимость разработки высокочувствительных, надежных и доступных методов анализа антибиотика для целей контроля качества пищевых продуктов.

В странах ЕС к методам определения остаточных количеств запрещенных к использованию веществ, для которых не установлен допустимый уровень, таких как ХАФ, предъявляют высокие требования. В частности, был установлен критерий “minimum required performance limit” (MRPL), соответствующий “минимальной концентрации аналита в образце, которая должна быть определена и подтверждена” арбитражным аналитическим методом. Для методов определения остаточных количеств ХАФ в продуктах питания MRPL установлен равным 0,3 мкг/кг [1]. В Российской Федерации, как и в странах Евросоюза, наличие остаточных количеств ХАФ в продуктах питания животного происхождения не допускается [2, 3]. Критерий, подобный MRPL, в России не введен и ориентиром служат методы, рекомендованные для определения остаточных количеств ХАФ в продуктах питания [2, 4]. Предел обнаружения антибиотика методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) составляет 10 мкг/кг, методом ИФА (набор ИФА-ХАФ производства ЗАО НВО “Иммунотех”, Россия) — 8 мкг/кг, методом ИФА (набор Ридаскрин Хлорамфеникол (RIDASCREEN Chloramphenicol производства “R-Biopharm GmbH”, Германия) — от 0,012 до 0,05 мкг/кг.

К настоящему времени разработаны разнообразные методы определения ХАФ в продуктах питания, при этом ИФА широко используют для массовых анализов. Разработаны традиционные методы ИФА [5—7], позволяющие проводить определение ХАФ в концентрациях ниже MRPL, а также методы ИФА с хемилюминесцентной детекцией, использование которой повышает чувствительность анализа в 10 раз [8, 9]. Методы на основе ИФА являются более дешевыми, относительно простыми и быстрыми по сравнению с инструментальными физико-химическими методами анализа, давно используемыми для определения ХАФ [10, 11]. Методы на основе ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) и другими модификациями, безусловно, незаменимы для целей идентификации вещества. Однако они непригодны для массовых анализов, так как предусматрива-

ют использование дорогостоящего оборудования, нуждающегося в высококвалифицированном обслуживании, и являются трудоемкими. Методы на основе ИФА часто используют в сочетании с хроматографическими для окончательного подтверждения наличия антибиотика в образце [5—7]. Относительно недавно был разработан и успешно применен для анализа ХАФ в различных объектах метод на основе оптического биосенсора (Biacore®, Швеция) с использованием иммунохимических реагентов [12]. Данная биосенсорная система позволяет надежно, быстро и с высокой чувствительностью определять разнообразные загрязняющие вещества [13], но ее широкое распространение сдерживается высокой ценой как самого прибора, так и соответствующего набора реагентов.

Требования к чувствительности определения остаточных количеств ХАФ стимулируют разработку все более чувствительных методов анализа. Сообщается о разработке сверхчувствительного метода на основе поверхностного плазмонного резонанса [14], позволяющего проводить определение ХАФ на уровне фемтограмм в миллилитре. Однако до сих пор самыми удобными и распространенными остаются методы на основе ИФА, характеризующиеся высокой чувствительностью, специфичностью и точностью. Выпускаются импортные иммуноферментные тест-системы для анализа ХАФ. Высокая стоимость таких тест-систем (около 500 евро) диктует необходимость разработки более дешевых отечественных аналогов.

Ранее нами была разработана иммуноферментная тест-система для определения хлорамфеникола в продуктах питания животного происхождения [4, 15, 16]. Предел обнаружения составил 8 мкг/л (8 мкг/кг) хлорамфеникола в молоке, курином мясе, яйцах.

Целью настоящей работы являлась разработка более чувствительного и быстрого метода определения остаточных количеств ХАФ в продуктах питания, отвечающего высоким международным требованиям.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использованы пероксидаза хрена (ПХ), гемоцианин лимфы улитки, биохимические и химические реагенты фирм Sigma (США) и Merck (Германия), кислоты и неорганические соли марки ос.ч. (“Химмед”, Россия), а также субстратный раствор для ИФА, содержащий 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин и перекись водорода (ЗАО

"НВО Иммунотех", Россия). Использовали следующие буферные растворы: 0,01 М К-фосфатный с 0,15 М NaCl, pH 7,4 (ФБС); ФБС, содержащий 0,1% твин-20, pH 7,4 (ФБСТ); 0,01 М Na-карбонатный, pH 9,5 (КБ); 0,01 М боратный, pH 8,6 (ББ). Все растворы готовили на деионизованной воде (Milli-Q, Millipore, Франция).

Стандартные растворы ХАФ для ИФА с концентрацией 0 мкг/л; 0,05; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 и 10,0 мкг/л готовили в ФБС или буферном растворе со стабилизирующими добавками из исходного раствора антибиотика в метаноле (1 мг/мл).

Образцы молока и мяса были предоставлены ФГУ "ВГНКИ".

В работе использовали полистироловые 96-луночные планшеты фирмы Costar (США). Измерение ОП продукта ферментативной реакции проводили на многоканальном спектрофотометре для 96-луночных планшетов (Molecular Devices, Palo Alto, США). Для подготовки проб и проведения ВЭЖХ-МС были использованы: масс-спектрометрическая система "Quattro Micro" с программным обеспечением MassLynx 4.1 (Waters, США), термостатируемый нагревательный модуль с системой отдувки растворителей инертным газом Reacti-Therm 3 (Pierce, США), колонка хроматографическая Pursuit (C<sub>18</sub>; 3,5 мкм, 2,0×150 мм), колонка Metaguard 2,0 мм Pursuit 3u C18 3001-MG2 (Varian, США), стандартные образцы хлорамфеникола (чистота 99,1%), (Sigma, США), хлорамфеникола (C<sup>137</sup>)<sub>2</sub>\*, чистота 99,3% (Sigma) и ультразвуковая баня Elmasonic S 30 H (Elma, Германия).

**Синтез конъюгатов ХАФ с белками из сукцината ХАФ.** Для получения иммуногена ХАФ с гемоцианином и конъюгата ХАФ с пероксидазой хрена (ХАФ-ПХ) из сукцината ХАФ использовали метод активированных эфиров [17]. 25 мкмоль сукцината ХАФ растворяли в 200 мкл диметилформамида (ДМФА). При перемешивании добавляли 50 мкмоль дициклогексилкарбодиимида, растворенного в 150 мкл ДМФА, и раствор 50 мкмоль N-гидроксисукцинимиды в 150 мкл ДМФА. Реакционную смесь инкубировали при перемешивании 2 ч при комнатной температуре и центрифугировали (10 мин, 11400 g). Полученный супернатант при перемешивании и охлаждении добавляли либо к раствору 10 мг ПХ в 4,5 мл КБ (0,22 мкмоль), либо к раствору 150 мг КЛН в 30 мл ББ (0,03 мкмоль). Далее полученные смеси инкубировали при перемешивании 2 ч при комнатной температуре и в течение ночи при 4°. Растворы центрифугировали (10 мин, 11400 g) и диализовали против ФБС.

**Получение поликлональных антисывороток.** Поликлональные антисыворотки получали иммунизацией взрослых кроликов (породы Шиншилла массой 2—3 кг) конъюгатом сукцината ХАФ с гемоцианином по методу [15]. Иммуноглобулиновую фракцию антисывороток (IgG) выделяли двукратным осаждением сульфатом натрия [18].

**Проведение ИФА хлорамфеникола.** Полистироловые планшеты покрывали раствором поликлональных антител в выбранной концентрации (150 мкл/лунку) в КБ в течение ночи при 4°. Планшеты промывали раствором ФБСТ (3×250 мкл/лунку), выдерживали 1 ч при комнатной температуре со стабилизирующим раствором (0,1 М КБ, содержащий 1% сахарозы и 0,5% БСА), высушивали и хранили при 4°.

В лунки планшета с сорбированными антителами вносили по 50 мкл стандартных растворов ХАФ или анализируемых образцов и по 50 мкл раствора конъюгата ХАФ-ПХ в выбранной концентрации в ФБСТ. После инкубации (1 ч, 37°) лунки промывали ФБСТ (3×250 мкл) и в каждую лунку добавляли 100 мкл субстратного раствора. Через 10—15 мин реакцию останавливали, внося в лунки планшета по 100 мкл 0,5 М серной кислоты и регистрировали ОП при λ 450 нм.

Предел обнаружения ХАФ данным методом рассчитывали как среднее значение ОП раствора, не содержащего ХАФ, минус 3 значения стандартного отклонения (n = 20).

**Экспериментальную контаминацию образцов молока и мяса** проводили путем внесения различных аликвот метанольного раствора ХАФ известной концентрации в образцы молока или гомогенизированной мышечной ткани и тщательного перемешивания.

**Подготовка образцов молока.** Для определения ХАФ методом ИФА молоко разбавляли ФБСТ в 5 и 10 раз и тщательно перемешивали.

Для определения ХАФ методом ВЭЖХ-МС молоко центрифугировали (10 мин, 7000 g, 5°) и верхний жирный слой удаляли. К 2 мл обезжиренного молока добавляли 4 мл смеси ацетонитрил—вода (7:3, об/об), перемешивали 1 мин, экстрагировали 20 мин на ультразвуковой бане и затем центрифугировали (20 мин, 2100 g, 4°). К 4 мл супернатанта добавляли 6,4 мл гексана и 1,6 мл дихлорметана. Смесь взбалтывали и центрифугировали (5 мин, 2100 g). Отбирали 1 мл средней фазы и упаривали досуха при 45°. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл смеси метанол—вода (1:1, об/об) и содержание ХАФ определяли методом ВЭЖХ-МС.

### Подготовка образцов мяса

*Метод 1.* К 2 г гомогенизированного образца добавляли 8 мл ФБС и гомогенизировали 1 мин, затем еще 10 мин перемешивали и центрифугировали (15 мин, 2100 g). Супернатант разбавляли буфером ФБСТ в соотношении 1:1.

*Метод 2.* К 2 г гомогенизированного образца добавляли 8 мл смеси ацетонитрил—вода (84:16, об/об), перемешивали 10 мин и центрифугировали (10 мин, 2100 g, 20°). К 2 мл супернатанта добавляли 2 мл дистиллированной воды и 3 мл этилацетата. Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали (10 мин, 2100 g). Затем отбирали 1,5 мл верхнего слоя и упаривали досуха при 45°. Остаток растворяли в 0,5 мл ФБСТ для ИФА или в 0,5 мл воды для ВЭЖХ-МС, добавляли 1 мл н-гексана, тщательно перемешивали 10 мин и удаляли верхний гексановый слой. Для ИФА использовали 50 мкл нижнего водного слоя. Для ВЭЖХ-МС к нижнему слою добавляли 0,5 мл метанола и пробу анализировали.

*Метод 3.* К 2 г гомогенизированного образца добавляли 10 мл смеси ацетонитрил—вода (7:3, об/об), перемешивали 1 мин, экстрагировали 20 мин на ультразвуковой бане и затем центрифугировали (20 мин, 2100 g, 4°). К 2,5 мл супернатанта добавляли 4 мл гексана и 1 мл дихлорметана. Смесь взбалтывали и центрифугировали (5 мин, 2100 g). Далее 1 мл средней фазы упаривали досуха при 45°. Для ИФА сухой остаток растворяли в 0,5 мл ФБСТ, для ВЭЖХ-МС — в 0,5 мл смеси метанол—вода (1:1, об/об).

**Анализ образцов продуктов питания методом ВЭЖХ-МС** проводили на хромато-масс-спектрометре Quattro Micro с двухстадийным квадрупольным анализатором. Детекцию аналитов проводили в режиме мониторинга нескольких реакций. Количественное определение осуществляли

методом внутреннего стандарта по площади пика идентифицированных соединений относительно калибровочной кривой, полученной при анализе в аналогичных условиях градуировочных растворов.

ВЭЖХ проводили при скорости потока элюента 0,3 мл/мин и температуре колонки 40°. Режим градиентного элюирования выбирали в соответствии с данными табл. 1.

Условия МС были следующими: режим отрицательной ионизации; температура источника 120°; температура газа десольвации 450°; поток газа десольвации 650 л/ч; поток газа поддувки 80 л/ч. Воздействие на ионы в условиях электроспрея с регистрацией отрицательных ионов проводили при напряжении на конусе 25/15 эВ и времени удерживания 3,1 мин.

Предел обнаружения ХАФ методом ВЭЖХ-МС составил 0,2 мкг/кг, предел количественного определения — 0,5 мкг/кг.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе была выбрана прямая схема конкурентного ИФА, так как она является более простой и быстрой по сравнению с непрямой (анализ 40 образцов занимает около 2 ч). Ранее при ИФА хлорамфеникола и ампициллина в непрямом методе ИФА нами было показано, что компоненты молока оказывают значительное влияние на результаты анализа [15, 16, 19]. Кроме того, при ИФА стрептомицина было обнаружено, что описанный эффект для молока в прямом анализе не столь выражен, как в непрямом [20].

Для получения поликлональных антисывороток, специфичных к ХАФ, в качестве иммуногена нами был использован конъюгат сукцината ХАФ с гемоцианином. Полученные антисыворотки были протестированы методом непрямого ИФА с использованием конъюгата ХАФ с овальбу-

Таблица 1

### Характеристика использованных способов элюции при ВЭЖХ-МС ХАФ-содержащих образцов

| t, мин                                                                          | 0  | 2   | 6   | 17  | 17,1 | 17,1 по 22 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|-----|-----|-----|------|------------|
| Смесь водных растворов муравьиной кислоты (0,05%) и формиата аммония (0,05%), % | 50 | 100 | 100 | 0   | 50   | 50         |
| Смесь метанол—ацетонитрил (50:50, об/об), %                                     | 50 | 0   | 0   | 100 | 50   | 50         |

мином, иммобилизованного на твердой фазе. Из антисывороток с наиболее высоким титром были выделены IgG-фракции антител и изучена их специфичность. Перекрестная реактивность к тиамфениколу, флорфениколу и антибиотикам других групп не превышала 0,1%. Для соединений, родственных ХАФ по структуре, перекрестная реактивность наблюдалась в случае сукцината ХАФ (251 %). В ходе дальнейшей работы были подобраны оптимальные соотношения концентраций конъюгата ХАФ-ПХ и иммобилизованных на твердой фазе антител. Типичный градуировочный график, полученный с помощью разработанной тест-системы, представлен на рисунке (кривая 1).

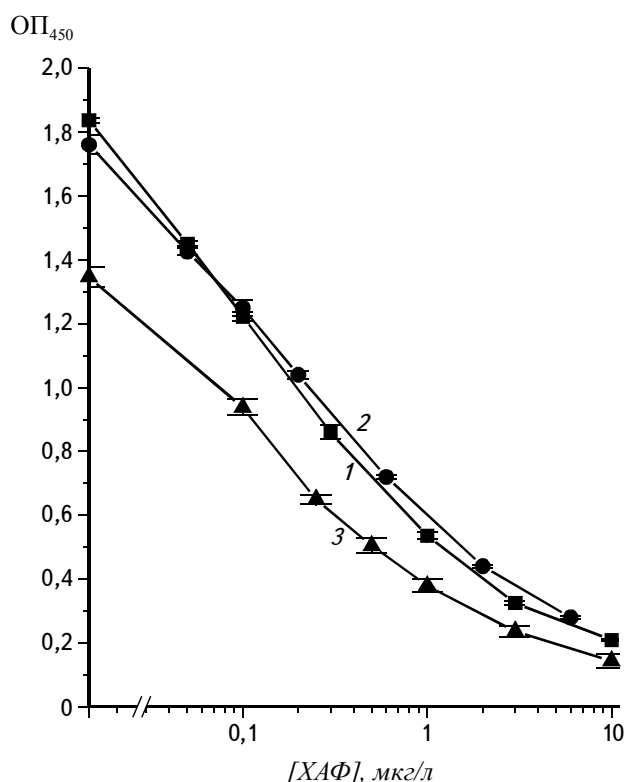
Предел обнаружения ХАФ в буферном растворе составил 0,05 мкг/л. Линейный диапазон концентраций ХАФ, определенный как область 20—80%-ного связывания конъюгата, составил 0,05—3 мкг/л. Разработанный метод характеризовался хорошей точностью и воспроизводимостью результатов анализа. Коэффициенты вариации для буферных растворов, содержащих 0,1 мкг/л, 0,5 и 3,0 мкг/л ХАФ, составили 6,7; 5,7 и 3,4% в течение одного дня ( $n=10$ ,  $P=0,95$ ) и 8,5; 7,6 и 6,9% для трех различных дней ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ), соответ-

ственно. Была также изучена стабильность разработанной тест-системы и показано, что все компоненты, входящие в состав тест-системы, стабильны при хранении в течение 6 мес при 4° (данные не приведены).

### Оптимизация определения ХАФ методом ИФА в молоке

Одной из основных проблем при разработке методов определения остаточных количеств загрязняющих веществ в продуктах питания является влияние сложного и разнообразного по составу матрикса образцов на аналитические параметры системы. Существенное влияние компонентов, входящих в состав молока, на результаты анализа наблюдалось и в разрабатываемом методе. Градуировочные графики, полученные на основе стандартных растворов ХАФ в буферном растворе и в цельном молоке 3,5%-ной жирности, заметно расходятся (см. рисунок, кривые 1 и 3). Поэтому в ходе дальнейшей работы были исследованы несколько методов подготовки проб образцов молока. Для уменьшения влияния жирности молока образец перед анализом обезжиривали. В нашем случае обезжиривание молока не помогло снизить влияние состава образца на результаты анализа. Графики, полученные с использованием стандартных растворов ХАФ в обезжиренном молоке, были идентичны градуировочным графикам в цельном молоке (данные не приведены).

Одним из наиболее простых и доступных способов уменьшения влияния матрицы является простое разбавление образца. Использование в разработанном методе высокоаффинных антител обеспечило достижение высокой чувствительности анализа, что позволило разводить образцы молока в 5, 10 и более раз буферным раствором (ФБСТ) без дополнительной подготовки проб. При этом для устранения матричного эффекта достаточным оказалось разведение молока в 5 раз. Определение содержания ХАФ в разведенных образцах молока дало результаты, близкие к данным, полученным с использованием стандартного градуировочного графика в буферном растворе (см. рисунок, кривые 1 и 2, табл. 2). Большее разбавление образцов молока приводило к уменьшению чувствительности метода. На основе полученных результатов в качестве оптимального было выбрано разбавление образцов молока буферным раствором в 5 раз. Определенное данным методом количество ХАФ (степень извлечения) составило 74—118 %, а предел обнаружения ХАФ данным методом — 0,3 мкг/л молока.



Градуировочные кривые определения ХАФ в молоке 3,5%-ной жирности при использовании различных методов подготовки проб: 1 — стандартные растворы ХАФ в ФБСТ; 2 — растворы ХАФ в молоке, разведенном в 5 раз ФБСТ; 3 — растворы ХАФ в цельном молоке

Таблица 2

**Результаты определения ХАФ методом ИФА в молоке различной степени жирности при разбавлении в 5 раз (n = 5)**

| Образец                                 | Концентрация ХАФ ( $C \pm \sigma$ ), мкг/л |                 | Степень извлечения, % | Коэффициент вариации, % |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|
|                                         | Введено                                    | Найдено         |                       |                         |
| Стерилизованное молоко, 3,5% жирности   | 0,5                                        | $0,47 \pm 0,04$ | 94                    | 8,5                     |
|                                         | 3                                          | $3,11 \pm 0,12$ | 104                   | 3,9                     |
|                                         | 10                                         | $9,55 \pm 0,21$ | 96                    | 2,2                     |
| Стерилизованное молоко, 1,5% жирности   | 0,5                                        | $0,40 \pm 0,03$ | 80                    | 7,5                     |
|                                         | 3                                          | $2,85 \pm 0,16$ | 94                    | 5,6                     |
|                                         | 10                                         | $7,85 \pm 0,18$ | 79                    | 2,3                     |
| Пастеризованное молоко, 3,4—6% жирности | 0,5                                        | $0,59 \pm 0,05$ | 118                   | 8,5                     |
|                                         | 3                                          | $2,52 \pm 0,10$ | 84                    | 4,0                     |
|                                         | 10                                         | $7,40 \pm 0,21$ | 74                    | 2,8                     |

С помощью разработанной тест-системы было проанализировано 37 образцов молока различного состава и жирности. Во всех образцах остаточные количества ХАФ не были обнаружены.

**Оптимизация определения ХАФ методом ИФА в мясе**

Подготовку проб для определения ХАФ в курином мясе (5 образцов) проводили тремя методами. Для экспресс-определения мясо гомогенизировали в буферном растворе (ФБС), центрифугировали и супернатант анализировали в ИФА (*метод 1*). Предел обнаружения ХАФ этим методом в образцах мяса (от нескольких производителей) составил 0,5 мкг/кг. Степень извлечения варьировала от 71 до 107% (табл. 3).

Для более точного количественного определения ХАФ в мясе использовали двухстадийную экстракцию ацетонитрилом и этилацетатом (*метод 2*) или экстракцию ацетонитрилом с последующей очисткой гексаном и дихлорметаном (*метод 3*). Полученные результаты показали, что при использовании *метода 2* степень экстракции ХАФ из образцов мяса является недостаточной: степень извлечения составила 58—74%. Лучшие ре-

зультаты были получены при экстракции ХАФ *методом 3*. Степень извлечения изменялась от 95 до 115%; предел обнаружения составил 0,3 мкг/кг куриного мяса (см. табл. 3).

Были проведены предварительные исследования по определению остаточных количеств ХАФ в образцах свиного мяса. Проанализировали 4 образца свинины без добавления и с добавлением в пробы ХАФ в концентрации 3 мкг/кг. В данном случае использовали два способа подготовки проб — по *методу 1* и *3*. Концентрация ХАФ, определенная в контрольных образцах с помощью обоих методов, не превышала установленных для куриного мяса пределов обнаружения — 0,5 и 0,3 мкг/кг, соответственно. Степень извлечения составила 63—77% для *метода 1* и 107—112% для *метода 3* (данные не приведены). Предварительные результаты показали, что для определения остаточных количеств ХАФ в образцах другого вида мяса, а также в яйцах необходима дальнейшая оптимизация тест-системы (данные не приведены).

В результате проведенной работы были разработаны две методики предварительной подготовки образцов куриного мяса. Быстрый и простой экспресс-метод (*метод 1*), который обеспечивает возможность первичного анализа большого

Таблица 3

**Результаты определения ХАФ методом ИФА в экстрактах куриного мяса (n = 5)**

| Метод подготовки проб                                                           | Концентрация ХАФ ( $C \pm \sigma$ ), мкг/кг |                 | Степень извлечения, % | Коэффициент вариации, % |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|
|                                                                                 | Введено                                     | Найдено         |                       |                         |
| Экспресс-метод ( <i>метод 1</i> , см. "Условия эксперимента")                   | 1                                           | $1,01 \pm 0,08$ | 101                   | 7,9                     |
|                                                                                 | 3                                           | $3,21 \pm 0,10$ | 107                   | 3,1                     |
|                                                                                 | 10                                          | $7,10 \pm 0,20$ | 71                    | 2,8                     |
| Экстракция ацетонитрилом и этилацетатом ( <i>метод 2</i> )                      | 1                                           | $0,58 \pm 0,04$ | 58                    | 6,7                     |
|                                                                                 | 3                                           | $1,95 \pm 0,10$ | 65                    | 5,1                     |
|                                                                                 | 5                                           | $3,67 \pm 0,20$ | 74                    | 5,4                     |
| Экстракция ацетонитрилом с очисткой гексаном и дихлорметаном ( <i>метод 3</i> ) | 1                                           | $1,15 \pm 0,08$ | 115                   | 7,0                     |
|                                                                                 | 3                                           | $3,40 \pm 0,10$ | 113                   | 2,9                     |
|                                                                                 | 10                                          | $9,46 \pm 0,30$ | 95                    | 3,2                     |

количества образцов. Для более точного анализа был выбран метод экстракции ацетонитрилом с последующей очисткой гексаном и дихлорметаном (*метод 3*).

Таким образом, тест-система, разработанная на основе метода ИФА для определения остаточных количеств ХАФ в продуктах питания, характеризовалась высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов при определении ХАФ в молоке и курином мясе. Предел обнаружения ХАФ в молоке различной степени жирности составил 0,3 мкг/л; степень извлечения ХАФ в этих же образцах колебалась от 74 до 118%. Предел обнаружения ХАФ в образцах куриного мяса экспресс-методом составил 0,5 мкг/кг, а с использованием экстракции образцов — 0,3 мкг/кг; степень извлечения варьировала от 71 до 107% и от 95 до 115%, соответственно.

#### **Корреляция результатов определения ХАФ в продуктах питания методами ИФА и ВЭЖХ-МС**

Для определения надежности разработанного метода было проведено сравнительное опреде-

ление ХАФ в образцах продуктов питания одновременно методом ИФА и ВЭЖХ-МС (табл. 4). Были проанализированы экстракты образцов куриного мяса, различающиеся по способу обработки, и образец молока с различным количеством внесенного ХАФ. Каждый образец анализировали в 5 повторностях. Для подготовки проб использовали двухстадийную экстракцию ацетонитрилом и этилацетатом (*метод 2*) или экстракцию ацетонитрилом (*метод 3*). Полученные данные (степень извлечения, %) подтвердили вывод, сделанный в процессе разработки иммуноферментной тест-системы, о том, что использование *метода 3* для подготовки проб куриного мяса позволяет проводить более точное определение ХАФ (см. табл. 4).

Сравнение результатов определения ХАФ показало в большинстве случаев хорошую сходимость данных (см. табл. 4), полученных обоими методами. При анализе образцов методом ИФА не было выявлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Разработанный метод ИФА дает возможность определять ХАФ в продуктах питания с высокой точностью, сравнимой с таковой ВЭЖХ-МС, и чувствительностью, превышающей чувствительность арбитражного метода

Таблица 4

## Результаты определения ХАФ в молоке и мясе методами ИФА и ВЭЖХ-МС (n = 5)

| Образец                                                                | Концентрация ХАФ ( $C \pm \sigma$ ), мкг/л (мкг/кг) |              |               | Степень извлечения , % |         |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|---------------|------------------------|---------|
|                                                                        | Введено                                             | Найдено      |               |                        |         |
|                                                                        |                                                     | ИФА          | ВЭЖХ-МС       | ИФА                    | ВЭЖХ-МС |
| Молоко, 3,2% жирности*                                                 | 0                                                   | Менее 0,3    | Не обнаружено | –                      | –       |
|                                                                        | 0,5                                                 | 0,64 ± 0,05  | 0,95 ± 0,19   | 128                    | 190     |
|                                                                        | 3                                                   | 2,21 ± 0,08  | 3,52 ± 0,07   | 74                     | 117     |
|                                                                        | 10                                                  | 10,40 ± 0,20 | 9,03 ± 0,26   | 104                    | 90      |
| Экстракция ацетонитрилом и этилацетатом (метод 2)                      |                                                     |              |               |                        |         |
| Цыпленок-бройлер                                                       | 0                                                   | Менее 0,3    | 0,35 ± 0,04   | –                      | –       |
|                                                                        | 1                                                   | 0,56 ± 0,03  | 2,00 ± 0,52   | 56                     | 200     |
|                                                                        | 3                                                   | 1,86 ± 0,08  | 5,81 ± 0,02   | 62                     | 194     |
|                                                                        | 10                                                  | 6,70 ± 0,30  | 12,44 ± 0,04  | 67                     | 124     |
| Экстракция ацетонитрилом с очисткой гексаном и дихлорметаном (метод 3) |                                                     |              |               |                        |         |
| Цыпленок-бройлер                                                       | 0                                                   | Менее 0,3    | 0,18 ± 0,04   | –                      | –       |
|                                                                        | 1                                                   | 1,19 ± 0,07  | 2,05 ± 0,39   | 119                    | 205     |
|                                                                        | 3                                                   | 3,18 ± 0,08  | 5,11 ± 0,27   | 106                    | 170     |
|                                                                        | 10                                                  | 10,20 ± 0,25 | 10,81 ± 0,34  | 102                    | 108     |

\* При ИФА использовали разбавление буфером (метод 1); при ВЭЖХ-МС — экстракцию водным ацетонитрилом.

(0,3—0,5 мкг/кг против 10 мкг/кг). Кроме того, для него не требуется проведение сложной подготовки проб, что делает метод ИФА более простым, быстрым и дешевым по сравнению с инструментальными методами.

Получено 16.12.08

## ЛИТЕРАТУРА

1. 2003/181/EC: Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regard the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin // Official J. Eur. Commun. — 2003. — L71(17).
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01. — М.: Минздрав России, 2002.
3. European Commission Regulations 1430/94 // Official J. Eur. Commun. — 1994. — L156(6).
4. Методические указания МУК 4.1.1912-04. Определение остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола, хлормецитина) в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004.
5. Posyniak, A. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography / A. Posyniak, J. Zmudzki, J. Niedzielska // Anal. Chim. Acta. — 2003. — V. 483. — P. 307—311.
6. Scortichini, G. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria / G. Scortichini, L. Annunziata, M.N. Haouet, F. Benedetti // Anal. Chim. Acta. — 2005. — V. 535. — P. 43—48.



7. *Impens, S.* Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS<sup>2</sup> and LC-MS<sup>2</sup> / S. Impens, W. Reybroeck, J. Vercammen // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — V. 483. — P. 153—163.
8. *Zhang, S.* Development of a Chemiluminescent ELISA for Determining Chloramphenicol in Chicken Muscle / S. Zhang, Z. Zhang, W. Shi, A. Eremin, J. Shen // *J. Agric. Food Chem.* — 2006. — V. 54. — P. 5718—5722.
9. *Chuanlai, Xu.* Chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the determination of chloramphenicol residues in aquatic tissues / Xu Chuanlai, P. Cifang, Hao Kai, J. Zhen-gyu // *Luminescence.* — 2006. — V. 21. — P. 126—128.
10. *Rodziewicz, L.* Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / L. Rodziewicz, I. Zawadzka // *Talanta.* — 2008. — V. 75. — P. 846—850.
11. *Shen, H.-Yu.* Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UV, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods / H.-Yu Shen, H.-Liang. Jiang // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 535. — P. 33—41.
12. *Ferguson, J.* Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex kit chloramphenicol / J. Ferguson, A. Baxter, P. Young, G. Kennedy, C. Elliott, S. Weigel, R. Gattermann, H. Ashwin, S. Stead, M. Sharman // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 529. — P. 109—113.
13. *Haughey, S.A.* Biosensor screening for veterinary drug residues in foodstuffs / S.A. Haughey, G.A. Baxter // *J. AOAC Int.* — 2006. — V. 89. — P. 862—867.
14. *Yuan, J.* Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol / J. Yuan, R. Oliver, M.I. Aguilar, Y. Wu // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80. — P. 8329—8333.
15. *Колосова А.Ю.* Оптимизация метода твердофазного иммуноферментного анализа для определения хлорамфеникола в молоке / А.Ю. Колосова, Ж.В. Самсонова, А.М. Егоров, С.А. Шевелева, Н.Г. Орлова, Т.В. Киселева, С.А. Хотимченко, В.А. Тутельян // *Вопросы питания.* — 1999. — Т. 68. — С. 23—27.
16. *Kolosova, A.Yu.* Competitive ELISA of chloramphenicol: influence of immunoreagent structure and application of the method for the inspection of food of animal origin / A.Yu. Kolosova, J.V. Samsonova, A.M. Egorov. // *Food Agric. Immunol.* — 2000. — V. 12. — P. 115—125.
17. *Hermanson, G.T.* Bioconjugate Techniques. — California: Academic Press, 1996.
18. *Ishikawa, E.* Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining / E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno // *J. Immunoassay.* — 1983. — V. 4. — P. 209—227.
19. *Самсонова Ж.В.* Иммуноферментный анализ ампициллина в молоке / Ж.В. Самсонова, О.С. Щелокова, Н.Л. Иванова, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41. — С. 668—675.
20. *Samsonova, J.V.* ELISA of streptomycin in buffer and milk: effect of reagents' structure and analysis format on assay performance / J.V. Samsonova, M.L. Bashkurov, N.L. Ivanova, M.Yu. Rubtsova, A.M. Egorov // *Food Agric. Immunol.* — 2005. — V. 16. — P. 47—57.

M.D. FEDOROVA<sup>1</sup>, I.P. ANDREEVA<sup>2,\*</sup>,  
E.S. VYLEGZHANINA<sup>3</sup>, A.A. KOMAROV<sup>3</sup>,  
M.Yu. RUBTSOVA<sup>1</sup>, Zh.V. SAMSONOVA<sup>1</sup>,  
and A.M. EGOROV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty, Dept. of Chemical Enzymology, 119991, Moscow Russia

<sup>2</sup> NVO Immunotek Co., 119991, Moscow Russia

<sup>3</sup> The All-Russian State Centre for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, 123022, Moscow Russia

e-mail: imtek@newmail.ru

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Chloramphenicol in Foodstuff

A test-system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative detection of chloramphenicol (CAP) in foodstuff has been developed. The detection limit of the method was 0,05 µg/l. The procedures for milk samples preparation of various fat content and chicken muscles were optimized. Before the analysis, milk was 5-fold diluted with a buffer. The detection limit for milk was 0,3 µg/l; recoveries varied from 74 to 118%. Two protocols for chicken muscles preparation were elaborated, extraction with buffer (express method) and extraction with acetonitrile. The detection limits of CAP in chicken muscles were 0,5 µg/kg and 0,3 µg/kg, respectively; recovery values were 71—107% and 95—115%, respectively. The results of the CAP residues detection in foodstuff by ELISA and HPLC-MS were in good correlation.

*Key words:* chloramphenicol, enzyme-linked immunosorbent assay, food of animal origin.

\* Author for correspondence.