

УДК 57.083.3

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСЕСТРОЛА В МЯСЕ ЖИВОТНЫХ

© 2011 г. М. М. Вдовенко*, Чи-Фанг Пенг**, Чуан-Лай Шу**, Е. С. Вылегжанина***, А. А. Комаров***, И. Ю. Сахаров*

*Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

e-mail: sakharovivan@gmail.com

**Школа пищевой химии и технологии, Университет Южного Янцзы, 214122 Китай

***Всероссийский государственный центр качества и стандартизации ветеринарных лекарственных средств для животных и кормов, Москва, 123022 Россия

Поступила в редакцию 04.12.2009 г.

Разработан не прямой конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА) гексестрола (ГЕК), одного из запрещенных в животноводстве анаболиков. Варьируя концентрации наслаивающего конъюгата (ГЕК-овальбумина), антисыворотки против ГЕК, казеина и Твин-20, оптимизированы условия проведения ИФА. Показано, что значения предела обнаружения (IC_{10}), IC_{50} и рабочего диапазона (IC_{20} – IC_{80}) в отсутствие и присутствии 0.05% Твин-20 в реакционной смеси равны 0.01, 0.17, 0.03–0.86 нг/мл и 0.05, 2.9, 0.26–32.0 нг/мл соответственно. Среднеквадратичное отклонение результатов анализа не превышало 5.4%. При использовании бездетергентного формата ИФА при определении ГЕК в образцах говяжьего мяса с различным содержанием аналита величина открытия составила 74–147%.

В современном промышленном животноводстве при интенсивных технологиях выращивания животных в нарушение технологических регламентов иногда прибегают к незаконному использованию гормональных стимуляторов роста, т.к. применение этих препаратов позволяет добиваться значительного повышения производства продукции животного происхождения при минимизации вложенных затрат. Такая продукция крайне опасна для здоровья человека, т.к. гормональные стимуляторы роста обладают канцерогенной активностью, а также вызывают нарушение полового созревания и репродуктивной способности человека [1–4]. В настоящее время использование гормональных стимуляторов роста при выращивании животных запрещено в большинстве стран. В странах Европейского союза в соответствии с директивой 96/23/ЕС проводится мониторинг остаточного содержания в кормах и животноводческой продукции запрещенных анаболических стимуляторов роста (стильбены, стероиды, лактоны резорциновой кислоты, бета-адреномиметики). Все эти вещества отнесены к наиболее опасным лекарственным препаратам (группа А). При контроле препаратов данной группы основной целью является обнаружение незаконного использования их в любых концентрациях.

Качество пищевых продуктов на наличие в них гормональных стимуляторов роста наиболее часто оценивается с применением хроматографических методов анализа [5–7]. Данные методы, несмотря на

высокую чувствительность, воспроизводимость и достоверность результатов, обладают существенными недостатками, которые обусловлены высокой стоимостью оборудования, необходимостью привлечения высококвалифицированного персонала, а также значительными трудозатратами и длительностью анализа при характеристике серийных образцов. В связи с этим активно разрабатываются иммунохимические методы определения гормональных стимуляторов роста, которые лишены недостатков хроматографических методов [8].

Цель исследования – разработка непрямого конкурентного иммуноферментного метода определения гексестрола (ГЕК), одного из анаболических препаратов стильбенового ряда, и использование данного метода для определения ГЕК в мясе животных.

МЕТОДИКА

Материалы. Пероксидаза из корней хрена (RZ 3.0) – препарат фирмы “Sigma” (США). Данный фермент был использован в работе без дополнительной очистки.

Гексестрол, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и натриевая соль казеина – препараты фирмы “Sigma” (США), H_2O_2 (30%-ный) – “ХимМед” (Россия), Твин-20 – “Ferak” (Германия). Все используемые соли были аналитической или химической чистоты. Концентрация пероксида водорода оценивалась спектро-

фотометрически по измерению оптической плотности его растворов при 240 нм ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [9].

Иммунореагенты. Гексестрол, конъюгированный с овальбумином (**ГЕК-ОВА**) был получен, как описано ранее [10]. Для этого, к 10 мг 3-карбокситрипропилгексестрилового эфира, растворенного в 0.4 мл смеси диоксана и диметилсульфоксида (1 : 1 об./об.), добавляли 5 мл триметиламина и 20 мл изобутилхлорформата и инкубировали в течение 1 ч при 48°C (**раствор А**). В то же время 20 мг овальбумина растворяли в 0.8 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 0.8 мл диметилсульфоксида. Данный раствор также инкубировали в течение 1 ч при 48°C (**раствор Б**). Затем раствор А медленно по каплям добавляли к раствору Б, после чего полученную смесь инкубировали в течение 4 ч при 48°C. Полученный конъюгат ГЕК-ОВА диализовали против 10 мМ К-фосфатного буфера, рН 7.4, содержащего 0.15 М NaCl (**ФБС**) и хранили при -20°C. Аналогичным образом синтезировали конъюгат ГЕК с бычьим сыворотным альбумином (**БСА**).

Поликлональная антисыворотка к ГЕК была получена при подкожной иммунизации кроликов весом 1.5–2.5 кг в течение 6 мес конъюгатом ГЕК-БСА, как описано ранее [11]. Титр антисывороток оценивали методом ИФА. Специфические антисыворотки хранили в 50%-ном (об./об.) растворе глицерина при -20°C.

Конъюгат поликлональных антител овцы против IgG кролика с пероксидазой хрена был синтезирован, как описано [12]. Для этого 5 мг пероксидазы хрена (**ПХ**) растворяли в 0.5 мл дистиллированной воды с последующим добавлением раствора перйодата натрия, конечная концентрация которого составляла 17 мМ. Окисление ПХ проводили при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте, после чего реакционную смесь диализовали против 1 мМ Na-ацетатного буфера, рН 4.9, в течение ночи при 4°C для удаления избыточного количества окислителя и продуктов его разложения. На следующие сутки в полученный раствор пероксидазы добавляли 0.5 мг очищенных поликлональных антител овцы против IgG кролика, растворенных в 75 мкл 50 мМ Na-карбонатного буфера, рН 9.6, и инкубировали при комнатной температуре 2 ч при постоянном перемешивании. Восстановление образовавшихся оснований Шиффа проводили, добавляя 10 мкл свежеприготовленного 10%-ного раствора NaBH₄. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Конъюгат диализовали против ФБС и хранили в 50%-ном (об./об.) растворе глицерина при -20°C.

Определение гексестрола методом ИФА. Предварительно в лунки 96-луночных микропланшетов с высокой сорбционной способностью ("Costar", США) вносили по 100 мкл раствора конъюгата ГЕК-ОВА (0.25–2.00 мкг/мл) в 50 мМ карбонатном буфе-

ре, рН 9.6, и инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления несорбированного конъюгата в лунки планшета вносили по 100 мкл 0.1%-ного раствора казеина в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl (**ФБС**), и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Избыток казеина удаляли четырехкратной отмывкой планшетов ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (**ФБСТ**). На следующем этапе в лунки планшета вносили по 50 мкл ГЕК (0.003 до 600 нг/мл) и антисыворотки против ГЕК. Антисыворотку разводили ФБС или ФБСТ, в то время как для ГЕК в качестве растворителя использовали ФБС или ФБСТ, содержащие 0.2% казеина и 20% метанола. Конкурентная иммунологическая реакция протекала в течение 1 ч при 37°C. После отмывания микропланшета от несвязавшихся антител во все лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата противовидовых антител с пероксидазой хрена (разведение 1 : 6000) в ФБСТ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Рабочее разведение используемого конъюгата было определено в отдельном эксперименте. Затем, после отмывания микропланшета, во все лунки добавляли по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора, содержащего 0.42 мМ ТМБ и 1.2 мМ H₂O₂, растворенных в 100 мМ ацетатном буфере, рН 4.3. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 М H₂SO₄, а затем в лунках определяли значения оптической плотности при 450 нм.

Подготовка образцов говядины. Измельчали до состояния фарша 5 г говяжьего мяса, не содержащего жира и соединительной ткани, смешивали с 5 мл 0.067 М фосфатного буфера, рН 7.2, и гомогенизировали в течение 2 мин в ножевом гомогенизаторе. Затем 1 г полученного гомогената смешивали с 3 мл метанола и подвергали ультразвуковой обработке ("Elmasonic S", Германия, мощность 80 Вт) в течение 20 мин, после чего смесь центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g. Используя полученный осадок, процесс экстракции метанолом проводили повторно. Осадок после вторичной экстракции смешивали с 3 мл водно-метанольной смеси (1 : 3) и подвергали ультразвуковой обработке в течение 20 мин. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g. Экстракцию водно-метанольной смесью проводили дважды. После проведения четырехэтапной экстракции полученные супернатанты образца мяса объединяли и смешивали при интенсивном встряхивании с 2 мл гексана. Образовавшийся верхний слой гексана удаляли, и экстракцию гексаном повторяли вновь. Для удаления метанола из водно-спиртового (нижнего) слоя полученный раствор подвергали выпариванию при 50°C. Водный раствор смешивали с 5.0 мл трет-бутилметилового эфира, и экстракцию проводили в течение 20 мин, встряхивая вручную каждые 5 мин. Используя нижний слой, экстракцию с трет-бутил-

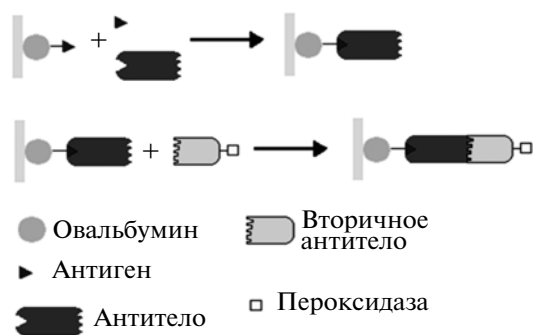


Рис. 1. Схема непрямого конкурентного твердофазного иммуоферментного анализа гексестрола.

метиловым эфиром проводили повторно. Затем полученные органические фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе (45°C). Перед анализом высушенный образец растворяли в 0.5 мл рабочего буфера (ФСБ или ФСБТ) и центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g. На последнем этапе пробоподготовки супернатант разводили в 10 раз рабочим буфером. Растворы ГЕК с концентрациями, соответствующими значениям IC₂₅, IC₅₀ и IC₇₅, в образце мясного экстракта получали смешиванием этанольного раствора ГЕК (1 мг/мл) и экстракта говяжьего мяса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя качество проведения иммуоферментного анализа во многом определяется характеристиками используемых иммуореагентов (специфических антител, наslaивающих и ферментных конъюгатов), условия анализа также значительно влияют на параметры данного аналитического метода. Учитывая вышесказанное, на первом этапе разработки непрямого конкурентного ИФА (рис. 1), предназначенного для определения ГЕК (химическая формула представлена на рис. 2) в мясе животных, нами оптимизировалась концентрация антител против ГЕК в реакционной среде. Как видно на рис. 3, использование слабо разбавленного раствора специфической антисыворотки (разведение 1 : 800) приводит к формированию градуировочной кривой с высоким фоновым значением оптической плотности (рис. 3, 1). С другой стороны, при применении сильно разбавленной антисыворотки (разведение 1 : 6400) величина регистрируемой оптической плотности не зависела от концентрации добавляемого в реакционную среду ГЕК, т.е. при этом разведении антисыворотки градуировочная кривая не позволяла измерять концентрацию ГЕК (рис. 3, 4). И только антисыворотка к ГЕК в разведениях 1 : 1600 и 1 : 3200 позволила нам получить качественные градуировочные кривые для определения ГЕК (рис. 3, 2 и 3).

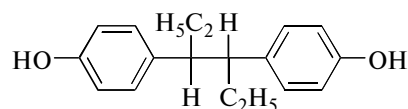


Рис. 2. Химическая структура гексестрола.

Традиционно в ИФА для предотвращения неспецифической сорбции на поверхности полистироловых планшетов в реакционную среду добавляют ПАВ. Более того, часто в схему анализа также вводят стадию сорбирования блокирующего белка. На первом этапе нашей работы оба указанных методологических приема использовались нами при определении ГЕК, используя Твин-20 как ПАВ и казеин как блокирующий белок. Однако, как видно на рис. 4, 1, и в этом варианте анализа значение оптической плотности, соответствующей неспецифической реакции, было достаточно велико. Поэтому казеин был применен не только как блокирующий белок, но и как один из компонентов реакционной смеси на стадии конкуренции. Добавление 0.1% казеина в реакционную смесь позволило эффективно подавить неспецифическую адсорбцию антител в лунках микропланшета (рис. 4, 2). Надо также отметить, что введение казеина в реакционную смесь приводило и к понижению эффективности специфической иммунологической реакции.

В дальнейшем исследовали влияние концентрации конъюгата ГЕК-ОВА, используемого как наslaивающий антиген, на аналитические характеристики ИФА. Как видно на рис. 5, 1 при низких концентрациях наslaивающего антигена градуировочная кривая не формируется. Повышение концентрации ГЕК-ОВА позволило получить качественные градуировочные кривые для определения ГЕК (рис. 5, 2 и 3). Однако, дальнейшее повышение концентрации ГЕК-ОВА (до 2 мкг/мл) приводило к негативному результату, что выражалось в резком ухудшении аналитических характеристик ИФА, а именно в повышении величины предела обнаружения и резком сужении рабочего диапазона измеряемого ГЕК (рис. 5, 4). По-видимому, обнаруженный эффект связан с формированием неактивных агрегатов ГЕК-ОВА, образующихся за счет гидрофобного взаимодействия фрагментов ГЕК различных молекул наslaивающего конъюгата. Сравнение таких аналитических величин, как IC₁₀, IC₅₀ и интервала рабочего диапазона (IC₂₀–IC₈₀) для 4 градуировочных кривых с использованием различных концентраций ГЕК-ОВА, показало, что наилучшие результаты были получены при использовании наslaивающего конъюгата с концентрацией 0.5 мкг/мл (табл. 1).

В работе [13], посвященной разработке ИФА для определения азинфосфометила в образцах воды, было показано, что удаление Твин-20 из реакционной

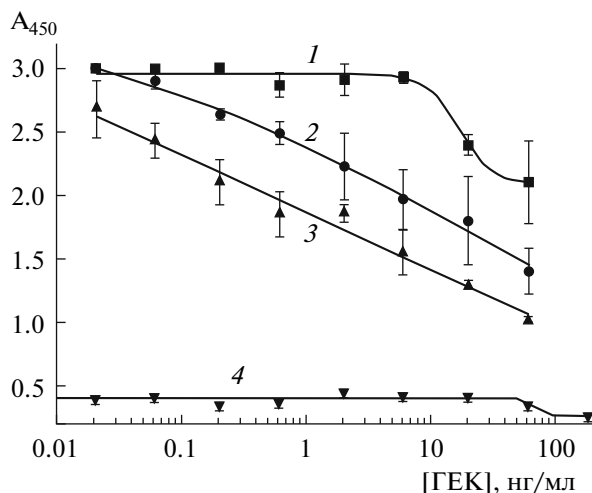


Рис. 3. Подбор оптимального разведения антисыворотки против ГЕК в ИФА гексестрола. При оптимизации использовались разведения: 1 – 1 : 800, 2 – 1 : 1600, 3 – 1 : 3200, 4 – 1 : 6400.

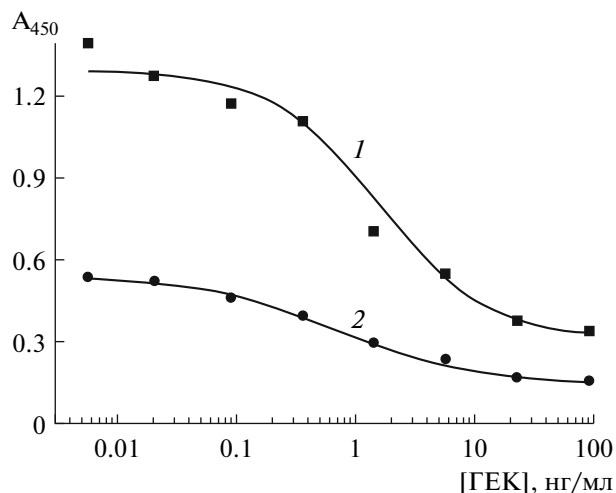


Рис. 4. Градуировочные кривые для определения ГЕК с помощью ИФА, используя в качестве рабочего буфера ФСБТ с 10% метанола без добавления (1) или с добавлением 0.1% казеина (2).

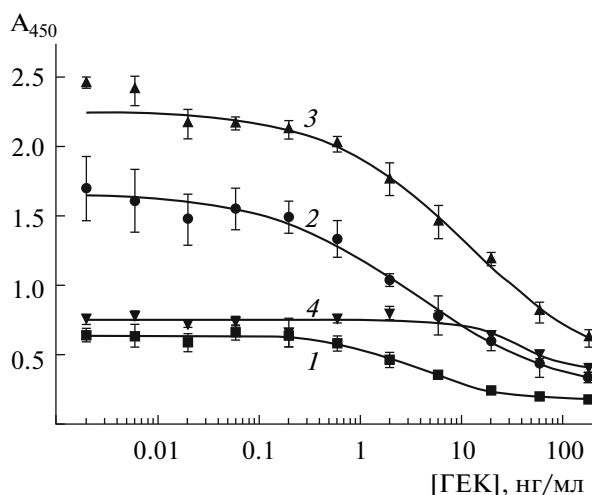


Рис. 5. Подбор оптимальной концентрации ГЕК-ОВА, использованного как наслаивающий конъюгат, в ИФА гексестрола. При оптимизации использовались концентрации (мкг/мл): 1 – 0.25, 2 – 0.5, 3 – 1.0 и 4 – 2.0.

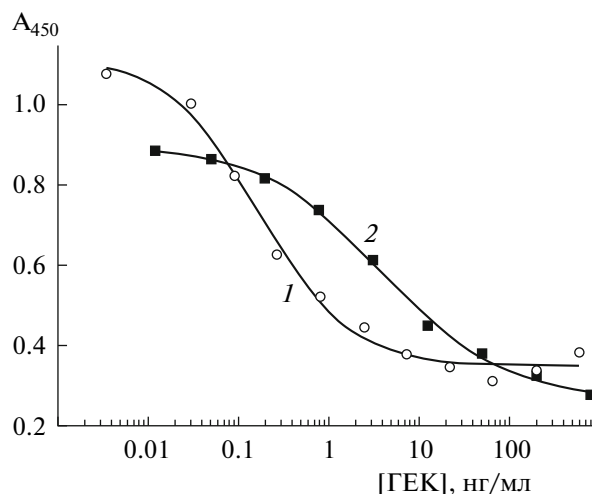


Рис. 6. Градуировочные кривые для определения ГЕК с помощью ИФА, используя в качестве рабочего буфера ФСБТ с 0.1% казеина и 10% метанола без добавления (1) или с добавлением 0.05% Твин-20 (2).

смеси на стадии конкуренции приводит к повышению чувствительности анализа. Аналогичный подход был апробирован нами и в случае определения ГЕК. Как видно на рис. 6, удаление ПАВ из реакционной смеси приводило к смещению градуировочной кривой в область более низких концентраций ГЕК, т.е. к понижению предела обнаружения анализа исследуемого анаболического гормона. Следует также с удовлетворением отметить, что такое удаление ПАВ из реакционной среды не привело к значительному увеличению значения фоновой оптической плотности (рис. 6). В отсутствие Твин-20 в реак-

ционной смеси величины IC_{10} и IC_{50} составили 0.01 и 0.17 нг/мл соответственно, при этом рабочий диапазон анализа ГЕК лежал в интервале от 0.03 до 0.86 нг/мл (табл. 2). Среднеквадратичное отклонение результатов анализа находилось в интервале 0.3–5.4%.

Сопоставление полученных аналитических параметров при определении ГЕК с помощью ИФА без применения ПАВ и жидкостной хроматографии с масс-спектроскопической регистрацией, для которой предел обнаружения равнялся 0.8 нг/мл, показало [14], что разработанный ИФА имеет более

Таблица 1. Влияние концентрации наслаивающего конъюгата (ГЕК-ОВА) на величины аналитических параметров ИФА гексестрола

ГЕК-ОВА, мкг/мл	IC ₁₀ , нг/мл	IC ₅₀ , нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл
0.25	0.4	3.6	0.7–16
0.5	0.1	3.4	0.4–30
1.0	0.7	11.5	1.5–98
2.0	8.0	34.6	16–92

Таблица 2. Влияние присутствия Твин-20 в реакционной среде стадии конкуренции на величины аналитических параметров ИФА гексестрола

Состав реакционной среды	IC ₁₀ , нг/мл	IC ₅₀ , нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл
ФБС с 0.1% казеина, 10% метанола и 0.05% Твин-20	0.05	2.9	0.26–32.0
ФБС с 0.1% казеина и 10% метанола	0.01	0.17	0.03–0.86

низкий предел обнаружения ГЕК по сравнению с хроматографическим методом. Сравнение разработанного метода с другими опубликованными иммунохимическими методами анализа показало, что аналитические параметры ИФА без применения ПАВ значительно лучше параметров для непрямого ИФА (рабочий диапазон от 0.1 до 8.1 нг/мл, IC₅₀ – 0.671 нг/мл) [15] и сопоставимы с аналитическими

характеристиками для прямого ИФА (рабочий диапазон от 0.01 до 8.1 нг/мл, IC₅₀ – 0.23 нг/мл) [11].

Разработанный метод анализа был использован для определения ГЕК, добавленного в образцы экстракта говяжьего мяса. Концентрация ГЕК в приготовленных образцах равнялась 0.04, 0.17 и 0.55 нг/мл. При проведении реакции конкуренции между ГЕК-ОВА и ГЕК за места связывания специфических антител в ФБС, т.е. в отсутствие ПАВ, величины открытия для определения ГЕК в образцах мяса варьировались в пределе 74–147% (табл. 3). Здесь следует подчеркнуть, что когда определение ГЕК проводилось с помощью ИФА с добавлением Твин-20, матричный эффект мяса был столь значителен, что, в отличие от ИФА без применения ПАВ, не позволил корректно измерять концентрацию ГЕК в образцах мяса (0.43, 2.9 и 18.5 нг/мл). Величины открытия в этом случае лежали в интервале 545–1355% (табл. 3).

Таким образом, разработан не прямой конкурентный иммуноферментный анализ гексестрола. При этом было показано, что удаление ПАВ из реакционной смеси на стадии конкуренции позволило не только значительно понизить предел обнаружения данного анаболического гормона, но и минимизировать матричный эффект мяса при определении ГЕК с помощью ИФА.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-03-92201 ГФЕН_а и 09-04-01639-а), Национальным фондом естественных наук Китая (20675035) и Перспективной программой развития науки и технологии Китая (2006ВАК02А09 и 2006ВАК02А19).

Таблица 3. Определение гексестрола в образцах говяжьего мяса с помощью непрямого конкурентного иммуноферментного анализа

Образец мяса	ИФА без использования Твин-20			ИФА с использованием Твин-20		
	концентрация ГЕК		открытие, %	концентрация ГЕК		открытие, %
	добавленного, нг/мл	определенного, нг/мл (n = 3)		добавленного, нг/мл	определенного, нг/мл (n = 3)	
№ 1	0.04	0.06	140	0.4	5.0	1163
	0.17	0.20	118	2.9	18.5	638
	0.55	0.57	104	18.5	100.9	545
№ 2	0.04	0.06	140	0.4	5.0	1163
	0.17	0.25	147	2.9	27.0	931
	0.55	0.70	127	18.5	177.4	959
№ 3	0.04	0.03	74	0.4	5.0	1163
	0.17	0.14	82	2.9	39.3	1355
	0.55	0.57	104	18.5	214.2	1158

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Metzler M. // Food Cosmetics Toxicol. 1981. V. 19. P. 611–615.
2. Hart J.E. // Food Chem. Toxicol. 1988. V. 26. № 3. P. 227–232.
3. Byford J.R., Shawa L.E., Drewb M.G.B., Pope G.S., Sauer M.J., Darbre P.D. // J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 2002. V. 80. № 1. P. 49–60.
4. Dobrydneva Y., Williams R.L., Katzenellenbogen J.A., Ratz P.H., Blackmore P.F. // Thrombosis Res. 2003. V. 110. № 1. P. 23–31.
5. Marcos V., Perogordo E., Espinosa P., Pozuelo M., Hooghuis H. // Analyt. Chim. Acta. 2004. V. 507. № 2. P. 219–227.
6. Inmaculada G., Sarabia L.A., Orti C.M., Aldama J.M. // Analyt. Chim. Acta. 2005. V. 544. № 1. P. 26–35.
7. Xu C.L., Peng C.F., Liu L., Wang L.Y., Jin Z.Y., Chu X.G. // J. Pharmac. Biomed. Analysis. 2006. V. 41. № 3. P. 1029–1036.
8. Magliulo M., Michelini E., Simoni P., Guardigli M., Roda A. // Analyt. Bioanalyt. Chem. 2005. V. 384. № 1. P. 27–30.
9. Kulmacz R.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 249. № 2. P. 273–285.
10. Xu C.L., Peng C.F., Wang L.Y., Hao K., Jin Z.Y. // Food Agric. Immunol. 2006. V. 17. № 1. P. 21–27.
11. Wang L.Y., Peng C.F., Chen W., Xu C.L. // Food Agric. Immunol. 2008. V. 19. № 1. P. 61–75.
12. Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б., Сахаров И.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 614–620.
13. Mercader J.V., Montoya A. // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. № 3. P. 1285–1293.

Enzyme Immunoassay for the Determination of Hexestrol in Meat

M. M. Vdovenko^a, C.-F. Peng^b, C.-L. Xu^b, E. S. Vylegzhanina^c,
A. A. Komarov^c, and I. Yu. Sakharov^a

^a Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^b School of Food Chemistry and Technology, South Yangtze University, 214122 China

^c All-Russia State Center for Quality Control and Standardization of Veterinary Therapeutics and Animal Feeds,
Moscow, 123022 Russia

e-mail: sakharovivan@gmail.com

Received December 4, 2009

Abstract—An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of hexestrol (HES), an antibiotic forbidden for use in livestock farming, has been developed. Conditions of ELISA have been optimized by varying the concentrations of the coating conjugate (HES-ovalbumin), anti-HES antiserum, casein, and Tween 20. In the absence of Tween 20 in the reaction mixture, the detection limit (IC₁₀) equaled 0.01 ng/ml, IC₅₀ equaled 0.17 ng/ml, and the working range (IC₂₀–IC₈₀) equaled 0.03–0.86 ng/ml, while, in the presence of 0.05% Tween 20, these values equaled 0.05 ng/ml, 2.9 ng/ml, and 0.26–32.0 ng/ml, respectively. Standard deviation of the analysis results did not exceed 5.4%. If ELISA was performed in the absence of detergents, the recovery value upon HES determination in spiked beef samples ranged from 74 to 147%.