

На правах рукописи

Латышев Олег Евгеньевич

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КЛЕНБУТЕРОЛА В КОРМАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

03.00.23 - биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ



диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в отделе безопасности кормов и пищевых продуктов Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Комаров Александр Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Еремец Владимир Иванович

(ГНУ ВНИИТИБП Россельхозакадемии)

доктор биологических наук, профессор

Тихонов Игорь Владимирович

(ФГОУП ВПО МГАВМиБ им.К.И.Скрябина)

Ведущая организация

Московский государственный университет
прикладной биотехнологии

Защита диссертации состоится «21» XII 2006 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 при ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

Адрес: Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, ФГУ «ВГНКИ»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ»

Автореферат разослан «15» XI 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Заслуженный ветеринарный врач РФ



Козырев Ю.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. β -адреностимуляторы (β -агонисты) – группа синтетических фармакологических препаратов, структурных аналогов катехоламинов, которые применяются в животноводстве в качестве стимуляторов роста продуктивных животных, так как обладают сильным антикатаболическим и жиросжигающим действием. Наиболее широко применяемым препаратом этой группы является кленбутерол (КБ).

Помимо фармакологического эффекта эти вещества обладают и токсическим действием, проявляющимся в таких симптомах, как нарушение сердечного ритма, мышечный тремор, гипокалиемия, тахифилаксия, головные боли, тошнота, повышение артериального давления. В разных странах зафиксированы случаи массового отравления людей при употреблении в пищу мяса и субпродуктов, содержащих остаточные количества кленбутерола и других β -адреностимуляторов (G. Boatto et al., 2000; Ruffolo, R.R., 1991; Kuiper H.A. et al., 1998; Neidert E. and Saschenbrecker P.W., 1996; Комаров А.А., 2002; 2003).

В России опубликованы результаты исследований, в которых рекомендуется применять КБ в качестве стимулятора при выращивании крупного рогатого скота. При этом риск воздействий остаточного содержания КБ в продукции животноводства на здоровье потребителей не оценивался (Еримбетов К.Т., 1997; Аитова М.Д. и др., 1993; 1994; Каленюк В.Ф. и др., 1992; Тагиров Н.С., 1993).

Негативные воздействия остаточного содержания β -адреностимуляторов в продукции животноводства на здоровье людей, особенно наиболее опасного препарата этой группы – кленбутерола, сделали актуальным проведение широкомасштабного мониторинга за их использованием. Такой мониторинг должен основываться на сочетании преимуществ использования экспрессных иммунохимических реакций с достоинствами современных арбитражных спектрометрических методов анализа (Комаров А.А., 2002; 2003; Панин А.Н., Комаров А.А., 2005).

Для обеспечения выполнения большого объема работ по мониторингу необходимо создание чувствительной и специфичной методики для оперативного определения остаточного содержания КБ и других β -адреностимуляторов в объектах ветеринарного надзора. Для решения этой задачи наиболее перспективным является использование иммуноферментного анализа (ИФА), поскольку этот метод обладает высокой чувствительностью и позволяет проводить экспресс-анализ большого количества проб в короткий промежуток времени.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы заключалась в создании тест-системы для контроля за применения КБ в качестве стимулятора роста при выращивании животных и определения его остаточного содержания в продукции животноводства экспресс-методом ИФА.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить иммунореагенты: конъюгаты КБ с белками-носителями и специфические антитела для определения КБ в биологических образцах иммунохимическим методом;
- на основе полученных иммунореагентов оптимизировать условия проведения непрямого твёрдофазного конкурентного варианта ИФА для определения КБ в биологическом материале. Определить чувствительность и специфичность метода;
- разработать простые и эффективные способы подготовки биологического материала для определения КБ методом ИФА;
- основываясь на данных по фармакокинетике КБ в организме лабораторных и сельскохозяйственных животных, обосновать выбор биосубстратов для контроля за применением КБ при выращивании животных, а также определения его остаточного содержания в продукции животного происхождения;
- провести комиссионные испытания тест-системы;
- разработать нормативную документацию и зарегистрировать в РФ тест-систему для определения КБ в кормах и биологических субстратах методом ИФА.

Научная новизна. Впервые в Российской Федерации синтезированы иммунореагенты – конъюгаты КБ с белками-носителями и специфические поликлональные антитела.

На основе полученных иммунореагентов создана чувствительная и специфичная тест-система для обнаружения КБ в биологических субстратах на основе непрямого твёрдофазного конкурентного ИФА (НТК ИФА).

Разработаны простые и эффективные способы экстракции КБ из кормов, биологических жидкостей, органов и тканей животных, обеспечивающие высокую чувствительность определения КБ методом ИФА.

Основываясь на данных по фармакокинетике КБ в организме лабораторных и сельскохозяйственных животных, обоснован выбор органов и тканей для эффективного контроля за применением КБ в животноводстве.

Практическая значимость работы. Создана тест-система для определения КБ в кормах, биологических жидкостях, органах и тканях животных методом НТК ИФА.

Тест-система позволяет определять не только КБ, но и β -адреностимуляторы фенольного (сальбутамол (СБ)) и резорцинового (тербутила (ТБЛ)) типа.

На тест-систему утверждена нормативная документация. Тест-система зарегистрирована в РФ и налажено серийное производство наборов для выявления КБ в биологических образцах методом ИФА.

Тест-система может быть использована для мониторинга за применением КБ в качестве стимулятора роста при выращивании животных и определения его остаточного содержания в продукции животного происхождения.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на 11-ом Московском международном ветеринарном конгрессе (Москва, 2003), 11-ом съезде «Общества биотехнологов России» (Москва, 2004), 3-ей

Международной конференции «Экстракция органических соединений» (Воронеж, 2005), XIV Всероссийского ветеринарного конгресса (Москва, 2006), Международном конгрессе по аналитической химии ICAS-2006 (Москва, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- получение специфических иммунореагентов и отработка, на их основе, оптимальных условий постановки НТК ИФА для определения КБ;
- разработка простых и эффективных способов подготовки биологического материала для определения КБ методом ИФА;
- результаты комиссионных испытаний разработанной тест-системы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 24 таблицами. Список литературы содержит 116 источников, в том числе 106 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Конъюгацию КБ с высокомолекулярными белками (БСА, КСА, ЯА и Ж) проводили без предварительной модификации молекулы методом диазотирования (Tsui P.T. et al., 1974). Концентрацию белка в конъюгатах определяли методом Лоури.

Специфические поликлональные антитела получали путем иммунизации кроликов массой 2-3 кг конъюгатом КБ-БСА (0,1 мл с концентрацией белка 1 мг/мл), эмульгированного в 1,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Раствор конъюгата вводили подкожно в 30-40 точек в область спины. Через каждые 4 недели животных реиммунизировали раствором конъюгата без ПАФ с концентрацией 20-100 мкг/мл. Определение активности и специфичности полученных сывороток осуществляли с помощью непрямого твердофазного ИФА (НТ ИФА) и НТК ИФА.

Отработку условий постановки НТК ИФА проводили, используя конъюгаты КБ с белками в качестве твердофазных антигенов (ТФА) и специфические поликлональные сыворотки.

Иммунологический планшет сенсibilизировали раствором ТФА. Каждый образец анализировали в дублях. В лунки планшета вносили калибровочные и исследуемые растворы, и растворы специфических антител (АТ). Количество связавшихся с твердой фазой АТ, которое обратно пропорционально содержанию КБ в калибровочных или исследуемых растворах, определяли с помощью антивидовых (антикроличьих) АТ меченых пероксидазой хрена. После чего добавляли раствор хромогенного субстрата (ТМБ) и останавливали реакцию 0,5 М серной кислотой. Значения оптической плотности (ОП₄₅₀) измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Рассчитывали процент связывания (ПС) АТ с АГ как отношение средних значений ОП₄₅₀ калибровочной или исследуемой пробы (опыт) к среднему значению ОП₄₅₀ сыворотки (контроль):

$$ПС = ОП_{оп} * 100 / ОП_k$$

Строили градуировочный график зависимости ПС от концентрации КБ в калибровочных растворах. С помощью градуировочного графика по значениям ПС исследуемых проб определяли в них концентрацию КБ.

Содержание КБ в исследуемой пробе биологического материала определяли по следующей формуле:

$$C = c * K,$$

где: c – концентрация КБ в исследуемой пробе, найденная по градуировочному графику, нг/мл;

K – коэффициент пересчета в мкг/кг (л) исследуемых проб корма, мочи, мышечной и печёночной ткани, шерсти, сетчатой оболочки глаза, учитывающий разведение экстракта и степень извлечения КБ из образца.

Для определения специфичности тест-системы вычисляли показатель относительного процента перекрестного связывания. Для подсчета относительных процентов связывания перекрестно реагирующих веществ, по сравнению с КБ, по градуировочным графикам определяли количество каждого вещества в точке, обеспечивающее 50 % связывания АТ. Количество КБ в этой точке принимали за 100% и вычисляли процент для перекрестно реагирующих соединений по формуле:

$$\% \text{ перекрестного связывания} = C_{KB} / C_x * 100,$$

где: C_{KB} – концентрация КБ, обеспечивающая 50% связывание АТ, нг/мл;

C_x – концентрация сравниваемого вещества, обеспечивающая 50% связывание АТ, нг/мл.

Разработку способов подготовки биологического материала проводили с использованием образцов с искусственной добавкой КБ для определения степени извлечения, и контрольных образцов, не содержащих КБ. Для подтверждения эффективности выбранного способа подготовки анализировали аттестованные стандартные образцы мочи и печени с известным содержанием КБ и образцы мочи, шерсти, сетчатки, мышечной и печёночной ткани бычков и кроликов, получавших КБ с кормом в дозах, соответственно, 1 мг и 0,08 мг в день в течение 7 дней. Содержание КБ в органах и тканях животных определяли методами НТК ИФА и ГХ-МС.

Условия проведения арбитражного метода ГХ-МС

Измерение содержания КБ выполняли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором типа ионная ловушка на хромато-масс-спектрометре SATURN 2000 (Varian, США). Идентификацию КБ в исследуемой пробе проводили с использованием стандартов КБ с учетом критериев идентификации. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта по площади пика идентифицированного соединения относительно градуировочного графика, полученного при анализе в аналогичных условиях стандартных растворов КБ. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированное производное КБ.

При подготовке мышечной и печёночной ткани образцы предварительно гомогенизировали в 0,2М ацетатном буфере, pH 5,2. Для экстракции КБ гомогенат ткани обрабатывали неорганическими кислотами с различной нормально-

стью (0,01н HCl, 0,01н HClO₄, 0,1н HClO₄) в течение 15 мин на УЗ-бане. После центрифугирования осадок отмывали дистиллированной водой. Надосадочную жидкость объединяли и анализировали в ИФА, или доводили pH надосадочной жидкости выше 9 и экстрагировали КБ смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об). После упаривания органического слоя, сухой остаток растворяли в дистиллированной воде и анализировали методом ИФА.

Из кормов КБ экстрагировали, используя различные объёмы дистиллированной воды (5, 15, 25 мл), неорганические кислоты (0,01н HCl, 0,01н HClO₄), а также сочетание экстракции дистиллированной водой, 0,01н HClO₄ и смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об).

Навеску шерсти (0,1 или 0,5 г) предварительно подвергали щелочному гидролизу при 95°C в течение 10 или 30 мин с 2,5 или 5,0 мл 5н NaOH. Экстракцию смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об) или трет-бутилметилловым эфиром (ТБМЭ) проводили дважды после охлаждения гидролизатов.

При подготовке глазного яблока гомогенат сетчатой оболочки и внутриглазной жидкости прогревали 10 мин при 80°C и центрифугировали. Для осаждения балластных белков надосадочную жидкость обрабатывали 0,1н HClO₄. Центрифугировали. КБ экстрагировали смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об) или ТБМЭ после доведения pH надосадочной жидкости до 9,8 щелочью. Органический слой упаривали. Сухой остаток растворяли в дистиллированной воде и анализировали методом ИФА.

Образцы мочи смешивали с 0,1М трис-буфером (pH 9,5) и экстрагировали КБ смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об) или дихлорметан/изопропанол (7:3, об/об). Органический слой упаривали. Сухой остаток растворяли в дистиллированной воде и анализировали методом ИФА.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Получение специфических иммунореагентов для определения кленбутерола иммунохимическим методом

Важным этапом разработки иммунохимического метода НТК ИФА является получение специфических иммунореагентов и отработка условий проведения реакции, от чего зависят его чувствительность и специфичность. Поскольку КБ является низкомолекулярным соединением, которое не обладает иммуногенностью, нами были синтезированы высокомолекулярные конъюгаты КБ с белками (БСА, ЯА, КСА, Ж), использованные как для получения специфических поликлональных кроличьих сывороток, так и непосредственно в качестве ТФА.

Для получения конъюгатов использовали КБ без предварительной модификации молекулы. Раствор белка обрабатывали диазосоединением, полученным путём диазотирования исходного ароматического амина в молекуле КБ соляной кислотой и нитритом натрия. Содержание белка в конъюгате доводили до 2 мг/мл и разводили раствор глицерином в 2 раза до конечной концентрации белка 1мг/мл.

На введение конъюгата КБ с БСА было получено 33 специфические поликлональные сыворотки путём иммунизации кроликов по схеме, описанной в п. 2.1.

2.2.2. Отработка условий проведения НТК ИФА для определения КБ

Определение активности полученных сывороток проводили методом НТ ИФА. Определяли рабочее разведение сывороток, при котором $ОП_{450} = 1,0 \pm 0,2$. Наиболее активные сыворотки были получены в течение первого года иммунизации.

Специфичность сывороток определяли в НТК ИФА. Основным показателем специфичности является процент связывания (ПС) АТ с АГ. Этот показатель обратно пропорционален содержанию КБ в исследуемом образце, который конкурирует за участки связывания АТ с ТФА. Мы сравнили ПС и рабочее разведение полученных сывороток. В таблице 1 приведены данные НТК ИФА наиболее активных сывороток, при добавлении раствора КБ с концентрацией 1,0 нг/мл.

Специфичность сывороток нарастала в процессе иммунизации. В результате была выбрана сыворотка от кролика № 12 на 9-15 месяце после начала иммунизации с рабочим разведением 1:4000, специфичность которой составила около $35 \pm 3\%$.

Таблица 1

Активность и специфичность сывороток, полученных при иммунизации кроликов конъюгатом БСА-КБ

№ сыворотки*	Разведение	$ОП_{450}$	ПС, %
11/3, 4	200	0,986	75
11/5, 6	8000	1,025	71
11/7, 8	8000	1,036	66
11/9	8000	1,124	71
12/5, 6	4000	1,008	52
12/7, 8	8000	1,226	43
12/9-11	4000	0,896	38
12/12-14	4000	1,155	35
12/15	4000	1,065	37

* числитель дроби - № кролика, знаменатель - № количество введений антигена.

Выбор твёрдофазного антигена и условий его иммобилизации на полистироле

Иммобилизация ТФА на поверхности лунок иммунологического планшета определяет количественные характеристики метода и возможности его практического применения, и зависит от степени стабильности и активности иммобилизованного АГ. Основными факторами, влияющими на иммобилизацию, являются структура ТФА, его концентрация, время и температура инкубации, а также, качество полистирола.

Нами были синтезированы конъюгаты КБ с высокомолекулярными белками: Ж, КСА, БСА, ЯА, которые мы использовали в качестве ТФА при сенсibilизации лунок планшета. Было установлено (таблица 2), что наилучшие показатели в НТК ИФА ($ОП_{450} \geq 1,0$, ПС=30-40%) достигались при использовании Ж-КБ и БСА-КБ в концентрации 0,05 мкг/мл и выбранной сыворотки в рабочем разведении.

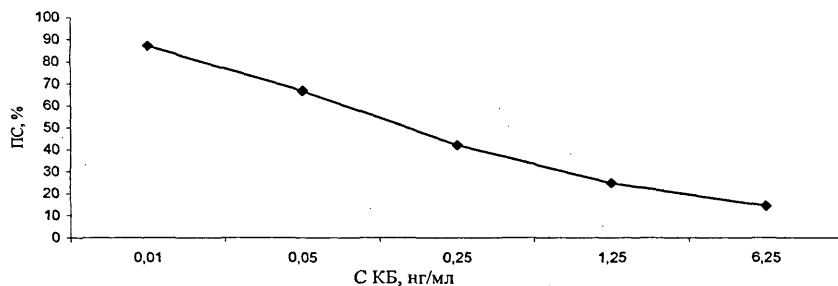


Рис.2. Стандартный градуировочный график для определения КБ в ИФА

Специфичность тест-системы была определена в НТК ИФА с использованием ряда веществ, входящих в группу β -адреностимуляторов. Для этого проводили реакцию, как описано выше. В качестве конкурирующих использовали растворы КБ, СБ, ТБЛ и адреналина (АД). Специфичность выражали как относительный процент перекрёстного связывания АТ с веществом, по сравнению с КБ в точке, обеспечивающей 50% связывания антител (таблица 4).

В результате определили, что разработанная нами тест-система обладала высокой специфичностью в отношении группы β -адреностимуляторов, и не давала перекрёстной реакции с природным катехоламином – адреналином.

Наряду с КБ, с помощью предлагаемой тест-системы возможно определение СБ (перекрёстная реактивность 20%) и ТБЛ (перекрёстная реактивность 15%). Эти данные превосходят аналогичные показатели для тест-системы, производимой фирмой Ридаскрин (Германия) (таблица 4).

Таблица 4

Перекрёстная реактивность

Вещество	Перекрёстное связывание, %	
	Разработанная тест-система	r-Biopharm, Германия
КБ	100	100
СБ	20	10
ТБЛ	15	10

Чувствительность определения СБ и ТБЛ с помощью предлагаемой нами тест-системы, составила 0,1 нг/мл (Рис.3,4).

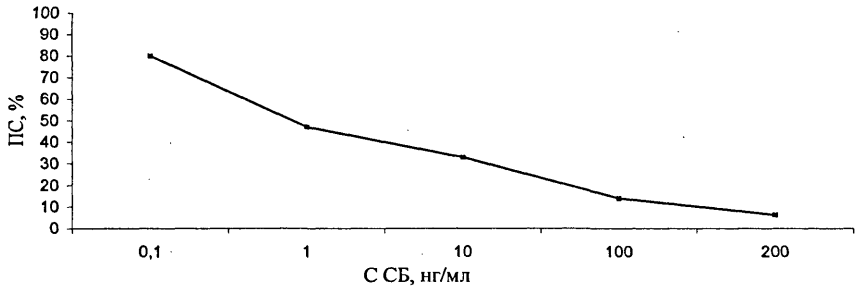


Рис.3. Градуировочный график для определения СБ в НТК ИФА

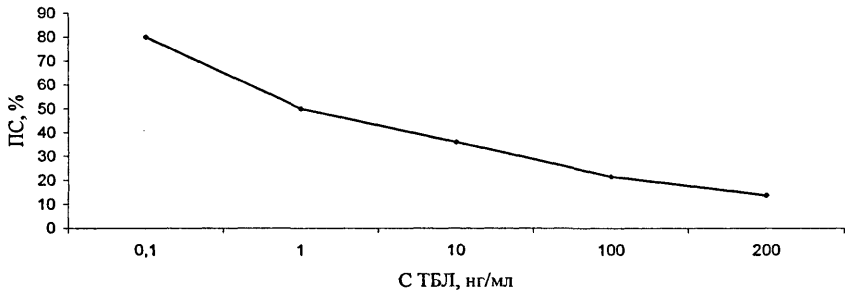


Рис.4. Градуировочный график для определения ТБЛ в НТК ИФА

2.2.3. Разработка способов подготовки биологического материала для определения КБ методом ИФА

Подготовка образцов мышечной ткани и печени

Исследовали разные способы обработки ткани с целью максимального извлечения КБ.

Гомогенизированные образцы мышечной ткани и печени обрабатывали соляной или хлорной кислотами с различной нормальностью (для осаждения белков) в сочетании с дополнительной экстракцией КБ дистиллированной водой. С целью депротоинизации аминогрупп в молекулах КБ pH экстракта доводили щелочью до 9,8. Применили также дополнительную экстракцию КБ смесью органических растворителей (этилацетат/изопропанол). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Сравнение эффективности извлечения КБ из мышечной ткани и печени
различными способами

№п/п	Способ экстракции	ПС контроля, %	извлечение, %
1	0,01н HCl	107,45±0,9	11±3,01
2	0,01н HClO ₄ , отмывка осадка H ₂ O, объединение супернатантов	110,2±2,9	23,6±8,2
3	0,1н HClO ₄ , отмывка осадка H ₂ O, объединение супернатантов	100,8±1,3	37,7±9,1
4	0,1н HClO ₄ , экстракция КБ из супернатанта (рН 9,0) смесью этилацетат/изопропанол, упаривание растворителей, растворение сухого остатка в воде	88,7±4,5	57,9±17,9
5	0,1н HClO ₄ , отмывка осадка H ₂ O, экстракция КБ из объединенных супернатантов смесью этилацетат/изопропанол, упаривание растворителей, растворение сухого остатка в воде	93,5±1,8	68,1±9,8

Установили, что при обработке ткани 0,1н хлорной кислотой извлечение КБ проходило эффективнее, чем 0,01н хлорной или 0,01н соляной кислотами при сходных показателях уровня фона в контрольных образцах (ПС).

Для повышения эффективности извлечения КБ из тканей применили методику, сочетающую в себе обработку гомогената 0,1н хлорной кислотой с последующей экстракцией смесью органических растворителей (этилацетат/изопропанол). При этом исследовали влияние промежуточного этапа отмывки осадка дистиллированной водой на извлечение КБ. Экстракция смесью этилацетат/изопропанол давала существенное увеличение степени извлечения КБ. Дополнительная экстракция осадка дистиллированной водой также несколько увеличивала степень извлечение КБ, при этом уровень фона в контроле был несколько ниже (ПС контроля >90%), чем в способе №4.

Полученные экстракты исследовали двумя независимыми методами: НТК ИФА и арбитражным методом ГХ-МС. Часть образцов дополнительно подвергали очистке методом ТФЭ. Применение предложенного способа пробоподготовки тканей позволило достичь высокой степени извлечения КБ и приемлемой чистоты экстракта для определения скрининг методом НТК ИФА без применения ТФЭ. При этом наблюдалась хорошая сопоставимость результатов в ИФА и ГХ-МС.

Эффективность предложенного способа экстракции КБ была подтверждена на стандартном образце лиофильно высушенной бычьей печени, содержащей аттестованное количество КБ. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6

Определение КБ в аттестованном стандартном образце

Стандартный образец	Содержание КБ, мкг/кг (при P=95%)	Найдено методом ИФА, мкг/кг
печень	1,2±0,4	0,8±0,3

Было определено содержание КБ в образцах печени бычков, получавших препарат КБ с кормом. Данные определения КБ методами НТК ИФА и ГХ-МС были сопоставимы между собой (таблица 7).

Таблица 7

Экстракция КБ из бычьей печени

Способ экстракции	Содержание КБ, мкг/кг	
	ИФА	ГХ-МС
№ 5	4,8±0,5	5,1±0,5

Таким образом, был предложен эффективный способ экстракции КБ из мышечной ткани и печени, заключающийся в обработке гомогената ткани 0,1н хлорной кислотой и дистиллированной водой с последующей экстракцией КБ из жидкой фазы смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об). Предложенный способ пробоподготовки обеспечивал извлечение КБ из тканей на уровне 80-90%, и позволял не использовать дополнительную очистку экстракта методом ТФЭ.

Подготовка образцов шерсти

Шерсть является оптимальным объектом для эффективного контроля за применением КБ в качестве стимулятора роста на стадии выращивания, поскольку КБ взаимодействует с меланином, накапливается, и длительное время сохраняется в шерсти животных.

Для выбора оптимального способа извлечения КБ использовали образцы шерсти КРС с искусственной добавкой КБ, а также шерсть бычков и кроликов, получавших КБ в эксперименте.

Шерсть предварительно подвергали щелочному гидролизу в течение 10 и 30 мин при температуре 95°C. Далее проводили экстракцию КБ из гидролизата смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об) или трет-бутилметилловым эфиром (ТБМЭ). Изучали влияние величины навески шерсти и объема использованной щелочи на эффективность гидролиза конъюгатов КБ с меланином. Установили, что щелочной гидролиз 0,1 г шерсти в течение 10 мин обеспечивал максимальное извлечение КБ при приемлемых показателях фона в контроле. Экстракция КБ смесью этилацетат/изопропанол проходила более полно, чем ТБМЭ. Увеличение навески шерсти и количества щелочи приводило к возрастанию фона в контроле при постановке ИФА (таблица 8).

Учитывая то, что КБ хорошо растворяется в воде, мы применили экстракцию КБ дистиллированной водой. КБ экстрагировали из корма различными объемами дистиллированной воды как отдельно, так и в сочетании с экстракцией смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об). Экстракция водой в сочетании с отмывкой осадка хлорной кислотой и последующей экстракцией смесью этилацетат/изопропанол давала низкие показатели извлечения КБ. При проведении двукратной экстракции небольшими объемами воды удалось добиться приемлемых значений уровня фона в контрольных образцах и хороших показателей извлечения КБ из комбикорма (таблица 12).

Таблица 12

Извлечение КБ из комбикорма разными способами

Способ экстракции	ПС контроля, %	Извлечение КБ, %
25 мл 0,01н HCl	97,8±4,9	137,5±12,5
25 мл 0,01н HClO ₄	85,6±3,7	131,9±30,9
25мл H ₂ O	84,2±0,6	127,5±17,5
5мл H ₂ O, 1мл 0,01н HClO ₄ , экстракция осадка H ₂ O, экстракция смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об)	96,7±3,8	9,3±0,5
15 мл H ₂ O + 5 мл H ₂ O	96,8±6,2	73,7±19,8

В результате был выбран способ двукратной экстракции КБ из корма дистиллированной водой, который обеспечивал извлечение аналита на уровне 80% и приемлемые показатели уровня фона в контроле при проведении НТК ИФА.

Подготовка образцов мочи

Известно, что вероятность образования конъюгатов КБ с белками в организме животного относительно низка, поэтому определение КБ в моче проводили без предварительного гидролиза образцов.

Были использованы образцы мочи КРС с искусственной добавкой КБ и контрольные образцы без добавления КБ. Исследовали эффективность экстракции КБ смесями органических растворителей: этилацетат/изопропанол (3:2, об/об) и дихлорметан/изопропанол (7:3, об/об). Для увеличения извлечения КБ был использован подход, примененный нами ранее – с помощью 0,1н трис-буфера (pH 9,5) увеличение pH образца (>9) для депротонизации аминогруппы КБ.

Установили, что экстракция КБ из мочи смесью дихлорметан/изопропанол приводила к существенному росту неспецифического фона (ПС контроля <90%), что искажало результаты определения содержания КБ в ИФА. Наиболее приемлемые значения фона и содержания КБ в образце получали при использовании смеси этилацетат/изопропанол (таблица 13).

Таблица 13

Эффективность экстракции КБ из мочи КРС

Способ экстракции	ПС контроля, %	Извлечение, %
смесью дихлорметан/изопропанол (7:3, об/об)	78,8±6,3	202,3±9,2
смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об)	95,5±5,0	73±7,5

Эффективность экстракции КБ смесью этилацетат/изопропанол была подтверждена в ИФА на стандартном образце мочи КРС с аттестованным содержанием КБ (таблица 14).

Таблица 14

Определение КБ в аттестованном стандартном образце

Стандартный образец	Содержание КБ мкг/л	Нижний 90% предел, мкг/л	Верхний 90% предел, мкг/л
	6,01	5,50	6,63
Определено методом ИФА	5,7±0,5		

С помощью разработанной тест-системы ИФА и применения данного способа экстракции исследовали мочу бычков, получавших препарат КБ в эксперименте (таблица 15).

Таблица 15

Эффективность экстракции КБ из бычьей мочи

Способ экстракции	Содержание КБ, мкг/л	
	ИФА	ГХ-МС
смесью этилацетат/изопропанол	3,0±1,1	2,6±0,7

В результате, для определения КБ в моче животных методом ИФА был предложен способ извлечения КБ смесью этилацетат/изопропанол (3:2, об/об), который обеспечивал высокие показатели степени извлечения КБ и приемлемые значения фона, что позволило не использовать метод твердофазной экстракции (ТФЭ) для дополнительной очистки экстрактов.

Определение предела обнаружения

Основным показателем качества предлагаемой тест-системы является предел обнаружения аналита. Это минимальная концентрация КБ в исследуемом образце, которая может быть обнаружена данным методом с заданной довери-

тельной вероятностью. Предел обнаружения КБ в мышечной ткани, печени, сетчатке и моче составил 0,09 мкг/л; в шерсти – 0,8 мкг/кг; в кормах – 1,0 мкг/кг.

Комиссионные испытания разработанной тест-системы

Комиссионные испытания разработанной тест-системы, предназначенной для количественного определения КБ методом ИФА были проведены на базе ФГУ «ВГНКИ» и ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (ФГУ «ЦНМВЛ»).

В процессе проведения испытаний были выполнены исследования 6 образцов печени, 6 образцов корма и 8 образцов мочи. Оценивали работоспособность методики, рабочий диапазон определения аналита, сходимость результатов, а также степень извлечения КБ из различных биосубстратов.

Таблица 16

Эффективность определения КБ в биосубстратах методом ИФА

Образец	Добавлено КБ, мкг/кг	Найдено КБ, мкг/кг	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
моча	0	не обнаружено		6,8
моча	0,1	0,08	80	6,6
моча	1,0	1,08	108	5,2
моча*	3,3 ± 0,3	2,8	85	3,4
печень	0	не обнаружено		6,6
печень	0,4	0,32	80	6,3
печень	1,0	0,98	98	5,1
корм	0	не обнаружено		6,4
корм	150	180,4	120	3,3
корм	300	328	109	2,2

* - аттестованный стандартный образец мочи КРС с содержанием КБ 3,30±0,3 мкг/л.

В результате проведённых испытаний была подтверждена эффективность разработанной тест-системы на всех объектах исследования.

ВЫВОДЫ

1. Получены высокоспецифичные иммунореагенты, обеспечивающие высокую чувствительность определения кленбутерола (0,01 нг/мл) в биосубстратах методом НТК ИФА. Чувствительность определения кленбутерола с помощью разработанной тест-системы существенно превышает показатели зарубежных аналогов. Тест-система позволяет, наряду с β-адреностимуляторами анилинового типа (КБ), определять препараты фенольного (СБ) и резорцинового (ТБЛ) типа.

2. Оптимизированы условия проведения НТК ИФА для определения КБ в биосубстратах: структура и концентрация ТФА (0,05 мкг/мл), время и

температура сорбции его на полистироле (18 часов при 4°C) и инкубации анти-тел (1 час при 37°C).

3. Разработаны эффективные и экономичные способы извлечения кленбутерола из биосубстратов на основе жидкостной экстракции водой, неорганическими кислотами и органическим растворителями, без использования метода твёрдофазной экстракции для дополнительной очистки проб. Эффективность разработанных способов экстракции кленбутерола подтверждена путём анализа международных аттестованных стандартных образцов, а так же биологических жидкостей, органов и тканей экспериментальных животных, получавших кленбутерол.

4. Определены пределы обнаружения кленбутерола методом НТК ИФА в мышечной ткани, печени, сетчатке, моче (0,09 мкг/кг(л)), шерсти (0,8 мкг/кг) и кормах (1,0 мкг/кг).

5. Исходя из полученных данных по фармакокинетике кленбутерола в организме сельскохозяйственных и лабораторных животных, обоснован выбор органов и тканей для эффективного контроля за его применением на стадии выращивания животных (шерсть, моча), и в продукции животноводства (глазное яблоко, печень).

6. Высокая эффективность разработанной тест-системы для определения кленбутерола в биосубстратах, кормах и продукции животноводства методом иммуноферментного анализа подтверждена в условиях комиссионных испытаний.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предложена тест-система для экспрессного определения кленбутерола в кормах и биосубстратах методом иммуноферментного анализа. Тест-система успешно прошла комиссионные испытания, и организовано её серийное производство в РФ. Разработана и утверждена в установленном порядке нормативная документация:

1. Технические условия на опытную партию на тест-систему «КЛЕНБУТЕРОЛ-ИФА» (ТУ 9398-001-00494189-2004).

2. Временное наставление по применению тест – системы «КЛЕНБУТЕРОЛ-ИФА» для количественного определения кленбутерола методом иммуноферментного анализа, утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 07.05.2004г., № 13-5-02/1060.

3. Технические условия на тест-систему «КЛЕНБУТЕРОЛ-ИФА» (ТУ 9398-030-11361534-2005).

4. Инструкция по применению тест – системы «КЛЕНБУТЕРОЛ-ИФА», утверждена Россельхознадзором 30.11.2005 г., рег. № ПВР-1-1.5/01471).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оработка условий ИФА для определения остаточных количеств β_2 -агонистов в кормах и животноводческой продукции / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Крайнюченко Т.В., Латышев О.Е. // Материалы 11-го Московского международного ветеринарного конгресса. – М. – 2003. – С. 317-318.
2. Тест-система ИФА для определения кленбутерола / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е., Крапивкин Б.А. // Ветеринария. - 2004. - № 12 - С. 49-51.
3. Применение иммуноферментного анализа для обнаружения остаточных количеств кленбутерола в кормах / Панин А.Н., Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е. // Материалы Второго съезда Общества биотехнологов России» / Под ред. Р.Г. Василовой. – М.: МАКС Пресс. – 2004. – С. 118-119.
4. Комаров, А.А. Скрининг-метод ИФА для обнаружения кленбутерола и диэтилстильбэстрола в кормах / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е. // Сб. науч. тр. ФГУ «ВГНКИ» /Под ред. Академика РАСХН Панина А.Н.. – М.: ФГУ «ВГНКИ». – 2005. – Т.65. – С. 225-232.
5. Комаров, А.А. Экстракция анаболических синтетических стероидов из органов и тканей животных для определения методом ИФА / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е. // III международная конф.: «Экстракция органических соединений». Каталог докладов. – Воронеж. – 2005. – С. 207.
6. Комаров, А.А. Экстракция кленбутерола и диэтилстильбэстрола из кормов для определения методом ИФА / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е. // III международная конф.: «Экстракция органических соединений». Каталог докладов. – Воронеж. – 2005. – С. 345.
7. Комаров, А.А. Обнаружение остаточных количеств кленбутерола в шерсти и сетчатке животных скрининг-методом ИФА / Комаров А.А., Латышев О.Е. // Тезисы докладов Всероссийской конф.: «Лекарственные средства для животных и корма. Современное состояние и перспективы». – М.: ФГУ «ВГНКИ». – 2005. – С. 131 – 132.
8. Обнаружение кленбутерола и диэтилстильбэстрола в кормах с помощью скрининг-метода ИФА / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е., Панин А.Н. // Доклады РАСХН. – 2005. - № 2. - С. 45-46.
9. Комаров, А.А. Скрининг-определение кленбутерола в сетчатке животных методом иммуноферментного анализа / Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Латышев О.Е. // Материалы Всероссийского ветеринарного конгресса и XIV Международного Московского конгресса по болезням мелких домашних животных. – М. – 2006. – С. 181-182.
10. Комаров, А.А. Скрининг-метод ИФА для обнаружения кленбутерола в шерсти и сетчатке глаза животных / Комаров А.А., Латышев О.Е. // Сб. науч. тр. ФГУ «ВГНКИ» /Под ред. Академика РАСХН Панина А.Н.. – М.: ВГНКИ. – 2006. – Т.67. – С. 141-149.
11. Komarov A. Obtaining of the immunogens for developing ELISA to determine some anabolic residues in livestock products / Komarov A., Vylegzhanina E., Panin A., Latyshev O., Vylegzhanina A. // 5th International Symposium On Hormone And

Veterinary Drug Residue Analysis held at the Province of Antwerp House Antwerp, Belgium May 16-19, 2006. Abstract Book. – Universiteit Gent. – 2006. – P. – 138.

12. Komarov A.A. Determination of clenbuterol in animal hair by ELISA / Komarov A.A., Vylegzanina E.S., Latyshev O.E., Krapivkin B.A. // Book of Abstracts International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006. Moscow, Russia 25-30 June, 2006. – V.1, P. – 134.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	- антиген
АД	- адреналин
АТ	- антитело
БСА	- бычий сывороточный альбумин.
ГХ-МС	- газовая хроматография с масс-спектрометрией
Ж	- желатина
ИФА	- иммуноферментный анализ
КБ	- кленбутерол
КРС	- крупный рогатый скот
КСА	- кроличий сывороточный альбумин
НТ ИФА	- непрямой твёрдофазный иммуноферментный анализ
НТК ИФА	- непрямой твёрдофазный конкурентный иммуноферментный анализ
ПАФ	- полный адъювант Фрейнда
ПС	- процент связывания
СБ	- сальбутамол
ТБЛ	- тербуталин
ТБМЭ	- трет-бутилметиловый эфир
ТФА	- твёрдофазный антиген
ТФЭ	- твёрдофазная экстракция
ЯА	- яичный альбумин

Заказ № 282/10/06 Подписано в печать 25.10.2006 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,25



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru