

УДК 535.518; 57.083.3

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИЛОЗИНА В МЁДЕ

© 2024 г. С. А. Еремин^{a,b}, Л. И. Мухаметова^a, Д. А. Арутюнян^a, А. Г. Терещенков^c, Н. В. Сумбатьян^a, А. Д. Прийма^d, И. С. Нестеренко^d, А. Н. Берлина^b, Д. В. Сотников^b

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991, Россия

^bИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук Ленинский проспект, 33, Москва, 119071, Россия

^cНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова 1 Ленинские горы, 1, стр. 40, Москва, 119234, Россия

^dВсероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов Звенигородское шоссе, 5, Москва, 123022, Россия

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Разработана методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения антибиотика тилозина в мёде. С этой целью проведена иммунизация кроликов конъюгатом тилозина с бычьим сывороточным альбумином, получены антисыворотки. Оптимизированы условия взаимодействия антисывороток в конкурентном формате с тилозином в пробе и с тилозином, меченым флуоресцеином. Разработанная методика характеризуется пределом обнаружения тилозина 34.7 нг/мл и рабочим диапазоном определяемых концентраций от 65.2 до 564.0 нг/мл. Показана высокая воспроизводимость измерений с помощью портативного детектора: значения относительного стандартного отклонения (sr) лежат в диапазоне 1.5–2.5%. Методика апробирована на образцах мёда; процент открытия варьировал от 98 до 103.8%. Продолжительность анализа без учета подготовки проб – 10 мин.

Ключевые слова: тилозин, антибиотик, поляризация флуоресценции, гомогенный иммуноанализ, конъюгат антиген–флуорофор, получение антисывороток, безопасность пищевой продукции.

DOI: 10.31857/S0044450224020041, **EDN:** vzcxtw

Антибиотики широко применяются в ветеринарии для борьбы с бактериальными инфекциями [1]. При этом распространенным стало добавление антибиотиков в корма для того чтобы обеспечить не только лечение, но и профилактику инфекций [2]. Следствием этого является развитие резистентной микрофлоры в организме конечного потребителя [3, 4]. При несоблюдении дозирования и нарушении сроков ожидания после применения препарата антибиотики попадают в продукты питания – мясо, молоко, яйца и др. [5–7].

Важной проблемой является контаминация антибиотиками продукции пчеловодства, что обусловлено сложностями мониторинга

заболеваемости и массовым профилактическим применением. В мёде и другой продукции пчеловодства обнаруживаются антибиотики разных классов – бета-лактамы (пенициллин, ампициллин), амфениколы (тиамфеникол, хлорамфеникол), тетрациклины (окситетрациклин, тетрациклин), макролиды (тилозин, эритромицин) и аминогликозиды, фторхинолоны (ципрофлоксацин, энрофлоксацин) и др. [8, 9].

К широко используемым в пчеловодстве антибиотикам относится тилозин – бактериостатический препарат из группы макролидов, блокирующий биосинтез белков вследствие образования комплекса с 50S-субъединицей рибосом [10].

Низкая скорость трансформации и перенос по пищевым цепям обуславливают угрозы попадания этого соединения в организм человека [11–13]. Установленные токсические эффекты тилозина [14, 15] привели к разработке нормативных документов, регулирующих предельно допустимые уровни потребления и концентрации этого антибиотика в продуктах питания. Согласно законодательству Евразийского Экономического Союза присутствие остаточных количеств тилозина в мёде не допускается [16].

В соответствии с указанными требованиями для контроля тилозина разработаны методики, использующие ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [17, 18], инфракрасную спектроскопию [19] и др., характеризующиеся высокой чувствительностью и селективностью и дающие возможность подтвердить структуру определяемого соединения [20–22]. Однако из-за необходимости использования дорогого специализированного оборудования, сложной пробоподготовки (включающей как жидкостную, так и твердофазную экстракцию), высокой стоимости анализа и значительным временным интервалом между отбором проб и получением результатов данные методики непригодны для широкомасштабного первичного скринингового тестирования. Эта задача решается при использовании альтернативных методов – иммунохимических, позволяющих минимизировать либо исключить пробоподготовку, быстро осуществлять необходимые взаимодействия в присутствии компонентов тестируемых проб и регистрировать их результаты простыми, в том числе портативными (переносными), детекторами [23–25]. При контроле антибиотиков, в том числе тилозина, в пищевой продукции наиболее широко применяют иммуноферментный анализ (ИФА) [26–28], иммунохроматографический анализ (ИХА) [29–31] и поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) [32]. Особенностью ПФИА, отличающей его от ИФА и ИХА, является проведение всех взаимодействий в растворе без диффузионно-контролируемого формирования детектируемых комплексов на поверхности носителя и без разделения прореагировавших и непрореагировавших компонентов реакционной смеси. При этом формирование иммунных комплексов, отражающее наличие целевого аналита в пробе, регистрируется в режиме реального времени без дополнительных реагентов и взаимодействий. Эти особенности ПФИА делают его относительно простым и экспрессным методом, что определяет интерес к его применению для мониторинга безопасности пищевой продукции [33].

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для определения низкомолекулярных антигенов основан на конкуренции между содержащимся в пробе аналитом и его производным, меченным флуорофором, за связывание с антителами. Реакционная смесь облучается плоскополяризованным светом, возбуждающим флуорофор, и регистрируется поляризация излучаемого света. Величина поляризации флуоресценции при постоянной температуре и вязкости зависит только от размеров флуоресцирующей молекулы или содержащего ее комплекса, поэтому при формировании комплекса антитела и аналита, меченного флуоресцентной меткой, поляризация флуоресценции изменяется, а степень этого изменения определяется концентрацией в пробе аналита, конкурирующего за связывание с антителом [33].

Основной областью применения ПФИА является медицинская диагностика – мониторинг уровней низкомолекулярных фармацевтических препаратов и регуляторов метаболизма в биологических жидкостях [34, 35]. В ряде работ показана эффективность ПФИА для контроля пищевой продукции на содержание остаточных количеств антибиотиков [36], токсинов [37], пестицидов [38], гормонов [39] и др. Для проведения ПФИА коммерчески доступны серийные стационарные приборы [33], однако для целей скрининга интересен компактный инструментальный прибор, который может применяться во внелабораторных условиях. В частности, описаны примеры успешного применения в последние годы портативного детектора Sentry [40–42], но они ограничены небольшим числом аналитов и видов тестируемых проб.

Целью данного исследования является разработка методики поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием портативного детектора для определения тилозина и ее апробация для анализа проб мёда. Ранее такое сочетание регистрируемого параметра и средств измерений для иммуноопределения тилозина не применяли.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали N-гидроксисукцинимид (N-ГС), N, N'-дициклогексилкарбодиимид (N, N'-ДЦК), тилмикозин, линкомицин, клиндамицин, пирлимицин, спирамицин, эритромицин, вальнемулина гидрохлорид, тиамулин, стрептомицин, рокситромицин, спектиномицин, тилозина тартрат (Sigma Aldrich, США), азид натрия (Serva, США), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Fluka, Швейцария), полный и неполный

адъюванты Фрейнда (InvivoGen, Франция), О-(карбоксиметил)гидроксиламин полухлорид (КМО) (Sigma Aldrich, США), тиосемикарбазид флуоресцеина (Fluka, Швейцария), сульфат и гидросульфат натрия (Sigma Aldrich, США), этилацетат (Scharlau, Германия), дихлорметан, метанол, диметилформамид (ДМФА), глицерин (Реахим, Россия), триэтиламин (Merck, Германия), хлороформ ос. ч. (Химмед, Россия).

Материалы и оборудование. Конъюгат тилозин-флуоресцеин (ТИЛ-ФЛУ) очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле 60 (0.063–0.200 мм, 70–230 mesh) (Merck, Германия), для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли пластины Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) [43]. Для измерений поляризации флуоресценции использовали портативный детектор Sentry 200 (Ellie, США), а для кинетических измерений — флуориметр BEACON2000 (Panvera, США). При обработке данных применяли программное обеспечение Origin (OriginLab, США).

Получение иммуногена. Для синтеза методом активированных эфиров [44] предварительно получали производное тилозина с О-(карбоксиметил)гидроксиламином следующим образом: 5 мг КМО и 2 мг гидросульфата натрия растворяли в 1 мл деионизованной воды. Полученный раствор по каплям добавляли в метанольный раствор тилозина тартрата (53 мг/мл) и перемешивали в течение 2.5 ч при комнатной температуре. После окончания реакции смесь сушили под вакуумом. Полученный остаток растворяли в 1 мл дихлорметана, добавляли 0.5 мл этанола и 1 г безводного сульфата натрия. Смесь оставляли на ночь при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После фильтрации растворитель испаряли при 60 °С.

15 мг синтезированного ТИЛ-КМО, 4 мг N, N'-ДЦК и 2 мг N-ГС растворяли в 1 мл ДМФА и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Активированный ТИЛ-КМО по каплям добавляли к 1 мл раствора БСА (10 мг/мл) в 50 мМ карбонатном буферном растворе (рН 9.5) и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Непрореагировавшие компоненты удаляли диализом против 50 мМ фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7.2).

Получение антисывороток. Кроликов иммунизировали путем внутрикожного введения конъюгатов ТИЛ-БСА. Эксперименты проводили в соответствии с этическими принципами, изложенными в Европейской директиве (2010/63/ЕС). Вначале 100 мкг ТИЛ-БСА в виде эмульсии в полном

адъюванте Фрейнда вводили в несколько точек на спине. Далее иммуноген вводили с интервалом в 4 недели по 20–50 мкг с использованием неполного адъюванта Фрейнда с добавкой стерильного 0.9%-ного раствора хлорида натрия в соотношении 1:1. Через неделю после каждой иммунизации у кроликов отбирали порцию крови из краевой вены уха; сыворотку отделяли, добавляли к ней глицерин в соотношении 1:1 и хранили при –20 °С.

Получение конъюгата тилозина с флуоресцентным маркером. Синтез проводили, как описано в работе [43]. Раствор тилозина с концентрацией 20 мг/мл в 0.4 М ацетатном буферном растворе (рН 4.7) смешивали с водным раствором флуоресцеин-5-тиосемикарбазида с концентрацией 10 мг/мл в объемном соотношении 1:1. Смесь перемешивали при 50 °С в течение 12 ч, после чего 5%-ным раствором NaHCO₃ доводили рН до 8.5 и экстрагировали продукт синтеза этилацетатом. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали на ротаторном испарителе. Полученное маслянистое вещество желтого цвета очищали колоночной хроматографией в системе растворителей метанол–хлороформ (1:4, по объему) и затем проводили элюирование метанолом. Выход составил 70%. ТСХ: R_f(CHCl₃–MeOH, 4:1) 0.41, R_f(CHCl₃–MeOH, 5:1) 0.24, R_f(CHCl₃–MeOH–AcOH, 60:10:1) 0.09; τ(ВЭЖХ) = 14.5 мин (градиент 20–80% ацетонитрила в 0.01%-ной водной трифторуксусной кислоте за 30 мин); флуоресценция (0.1 М Трис с рН 9.0): λ_{ex} = 492 нм, λ_{em} = 516 нм; MALDI MS, m/z вычислено для C₆₇H₉₁N₄O₂₁S⁺, 1 319.6, найдено 1 317.5.

Концентрацию конъюгата определяли, используя молярный коэффициент поглощения флуоресцеина ε₄₉₁ = 8.7 × 10⁴ М^{–1} см^{–1} [45].

Определение рабочей концентрации конъюгата тилозин-флуоресцеин. Готовили серии разведений конъюгата ТИЛ-ФЛУ в 50 мМ боратном буферном растворе (рН 8.5) (ББ) и измеряли их поляризацию флуоресценции с помощью портативного детектора Sentry 200 при длине волны возбуждения 495 нм и регистрации эмиссии при 530 нм. Критерием выбора рабочей концентрации конъюгата ТИЛ-ФЛУ являлось превышение фонового значения сигнала в 10 раз (фоновым значением сигнала считали значение флуоресценции буферного раствора).

Характеристика взаимодействия конъюгата тилозин-флуоресцеин с антисыворотками. Рабочее разведение антисывороток определяли следующим образом. В пробирках из боросиликатного стекла готовили серию разведений антисывороток от 1:100 до 1:1 000 в ББ в объеме 500 мкл. К ним добавляли по 500 мкл

раствора конъюгата ТИЛ-ФЛУ с концентрацией 5 нМ в том же буферном растворе, выдерживали при комнатной температуре 5 мин и измеряли поляризацию флуоресценции с помощью портативного детектора Sentry 200. Все эксперименты выполняли в двух повторах.

Изучение кинетики взаимодействия тилозин-флуоресцеин с антисывороткой. К 500 мкл конъюгата ТИЛ-ФЛУ в выбранном разведении добавляли 500 мкл антисыворотки против тилозина в разведении 1:1000 в ББ и с использованием флуориметра BEACON2000 измеряли поляризацию флуоресценции в течение 25 мин с 30-секундными интервалами.

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. В стеклянные пробирки вносили по 50 мкл растворов тилозина в воде (0, 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 мкг/мл) и 500 мкл раствора конъюгата ТИЛ-ФЛУ с концентрацией 5 нМ в ББ. Затем добавляли 500 мкл антисыворотки против тилозина в выбранном разведении и через 10 мин регистрировали поляризацию флуоресценции с помощью портативного детектора Sentry 200. Каждое измерение проводили в трех повторах.

Определение аналитических характеристик поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Зависимость поляризации флуоресценции от концентрации тилозина (градуировочную кривую) строили в полулогарифмических координатах и аппроксимировали с помощью четырехпараметрической сигмоидной функции. Значения IC_{10} , IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} рассчитывали как концентрации, снижающие аналитический сигнал на 10, 20, 50 и 80% соответственно. Значение IC_{10} оценивали как предел обнаружения, IC_{20} – IC_{80} – рабочий диапазон определяемых концентраций. Значения кросс-реактивности рассчитывали по формуле: $CR(\%) = IC_{50}(\text{ТИЛ})/IC_{50}(\text{аналог}) \times 100\%$.

Подготовку образцов мёда проводили, как описано в работе [22], с некоторыми модификациями. В полипропиленовые пробирки емк. 2 мл помещали 0.3 г мёда и добавляли аликвоты от 0 до 20 мкл раствора тилозина с концентрацией 100 мкг/мл. Образцы перемешивали на вихревом смесителе Vortex-1 (ИКА, Германия) в течение 1 мин. Затем в каждую пробирку вносили 750 мкл 5 М водного раствора ацетата натрия, инкубировали 30 мин при 37 °С, затем вносили 750 мкл ацетонитрила. Экстракцию проводили в течение 30 мин и центрифугировали при 3 500 g в течение 10 мин. Отбирали 650 мкл верхнего органического слоя, упаривали его до удаления растворителя,

сухой остаток растворяли в 650 мкл деионизованной воды и перемешивали. Полученный экстракт перед анализом разводили в пять раз ББ.

С помощью портативного детектора Sentry 200 регистрировали поляризацию флуоресценции в трех повторах для каждого образца и на основании градуировочной кривой ПФИА определяли концентрации тилозина. Соответствие между введенными и обнаруженными концентрациями тилозина оценивали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунизация животных и получение антисывороток. Тилозин относится к низкомолекулярным соединениям, его молярная масса составляет 916 г/моль. Для выработки иммунного ответа синтезировали конъюгат тилозина с белком-носителем – бычьим сывороточным альбумином – с соотношением гаптен: белок при синтезе 100:1. Проводили иммунизацию малыми дозами – 20–100 мкг/кролика, такой способ хорошо зарекомендовал себя ранее при получении поликлональных антител против фторхинолонов [46]. В результате от одного кролика получали серию антисывороток, отличавшихся количеством недель с начала иммунизации – 8, 10, 16, 18 и 21. Далее данные антисыворотки обозначены № 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно.

Синтез и очистка конъюгатов производного тилозина с флуоресцентной меткой. Для введения флуоресцентной метки в молекулу тилозина выбрали альдегидную группу C20, что позволило получить конъюгат в мягких условиях с хорошим выходом без предварительной защиты функциональных групп антибиотика [43].

Согласно [43] получили конъюгат тилозина с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом (ТИЛ-ФЛУ) (схема 1), очищенный колоночной хроматографией на силикагеле 60. Выход синтеза составил 70%. Препарат растворяли в метаноле и далее для иммуноанализа разбавляли ББ.

Изучение взаимодействия конъюгата тилозин-флуоресцеин с антисыворотками. Взаимодействие синтезированного конъюгата ТИЛ-ФЛУ со специфическими антителами в антисыворотках регистрировали по изменению поляризации флуоресценции. При этом использовали разведения препаратов антисывороток от 100 до 1 200 (данные не приведены), критерием выбора разведения было значение поляризации флуоресценции на уровне 120 mP. Разбавленные антисыворотки смешивали с раствором конъюгата ТИЛ-ФЛУ и через 10 мин

измеряли поляризацию флуоресценции. Данная величина возрастала, что свидетельствовало о связывании антител с конъюгатом ТИЛ-ФЛУ. В качестве отрицательного контроля использовали неиммунную сыворотку кролика, смешивание конъюгата ТИЛ-ФЛУ с которой показало низкие значения поляризации флуоресценции — 53 ± 2 mP. Для сывороток, содержащих антитела к тилозину, наблюдалось изменение поляризации флуоресценции в зависимости от их разведения (рис. 1). Для дальнейшего осуществления конкуренции между меченым тилозином (ТИЛ-ФЛУ) и свободным тилозином за центры связывания антител

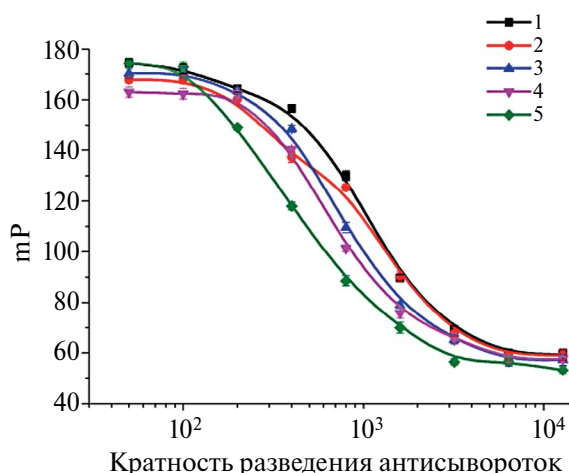


Рис. 1. Изменения поляризации флуоресценции при взаимодействии конъюгата тилозин-флуоресцеин (конечная концентрация 2.5 нМ) с антисыворотками в разных разведениях в боратном буферном растворе. 25 °C, $n = 2$.

использовали разведения антисывороток, обеспечивающие 50%-ное ингибирование сигнала (параметр IC_{50}). Данные величины составили: 1: 1 050 для антисыворотки № 1, 1:1 070 для антисыворотки № 2, 1:750 для антисыворотки № 3, 1:700 для антисыворотки № 4 и 1:400 для антисыворотки № 5. Как видно, наибольшими разведениями характеризовались препараты № 2 и № 1.

Выбор времени взаимодействия конъюгата тилозин-флуоресцеин с антисывороткой. Для изучения кинетики взаимодействия с конъюгатом ТИЛ-ФЛУ использовали антисыворотку № 1 и 5 нМ раствор конъюгата, обеспечивающий десятикратное превышение фонового сигнала. При формировании комплекса антитело-ТИЛ-ФЛУ меняется поляризация флуоресценции. В первые 3 мин наблюдается интенсивный рост сигнала (рис. 2), который затем замедляется и после 6 мин переходит в область плато, стабилизируясь в течение последующих нескольких минут. Время взаимодействия 10 мин выбрали в качестве оптимального и использовали для ПФИА тилозина.

Характеристика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа тилозина. После выбора необходимых разведений антисывороток использовали их в конкурентной схеме. Для этой цели к разбавленной антисыворотке добавляли раствор тилозина (в разных концентрациях) в ББ, рабочий раствор конъюгата ТИЛ-ФЛУ и через 10 мин измеряли поляризацию флуоресценции. Полученные градуировочные зависимости (рис. 3) имеют S-образную форму и расположены близко друг к другу. Однако по параметрам кривой (IC_{10} , IC_{20} , IC_{50} , IC_{80}) — см. табл. 1 — наблюдаются различия.

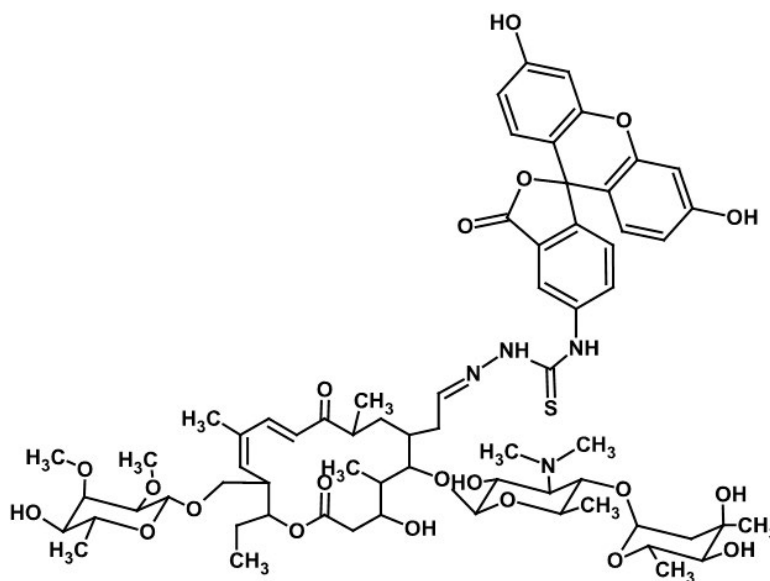


Схема 1. Структура конъюгата тилозина с флуоресцеином.

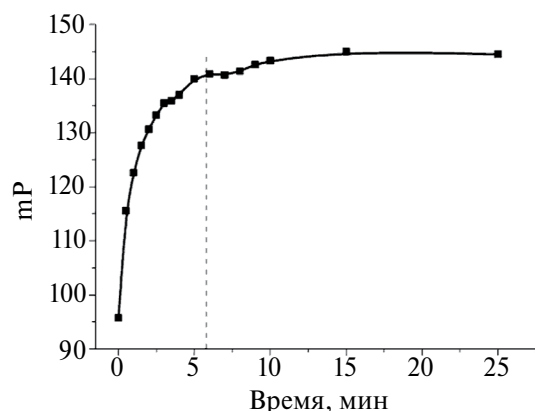


Рис. 2. Кинетика связывания конъюгата тилозин-флуоресцеин (2.5 нМ) с антисывороткой № 1 (разведение 1: 1000 в боратном буферном растворе). 25 °С, $n = 2$.

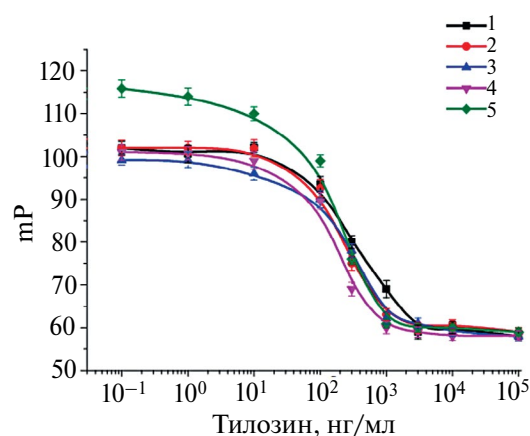


Рис. 3. Градуировочные зависимости для определения тилозина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа в боратном буферном растворе ($n = 3$).

Для антисыворотки № 1 получены наименьшее значение предела обнаружения (IC_{10}) 51.3 нг/мл, а также наиболее широкий диапазон определяемых концентраций (IC_{20} – IC_{80}) – от 101.5 до 1 050 нг/мл. Значения s_r для соответствующей градуировочной

кривой составили от 1.5 до 2.3%. Данную антисыворотку выбрали для дальнейшей работы.

Установили, что для работы с образцами мёда из-за влияния компонентов матрикса и после проведения экстракции во избежание ухудшения чувствительности ПФИА требуется увеличить содержание антисыворотки в реакционной смеси. Опробовали разведения от 1:100 до 1:1 000 ББ; наилучших аналитических характеристик достигли при использовании антисыворотки № 1 с разведением 1:400 – см. градуировочную кривую на рис. 4. Предел обнаружения тилозина составил 34.7 нг/мл, IC_{50} –191.8 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций (IC_{20} – IC_{80}) – 65.2–564.0 нг/мл. Отметим, что подбор условий проведения ПФИА с учетом особенностей тестируемого матрикса сопровождался нехарактерными изменениями аналитических характеристик – несмотря на возросшее содержание антител в реакционной смеси, несколько (в 1.5 раза) снизился предел обнаружения – с 51.3 нг/мл до 34.7 нг/мл. Аналогичные изменения произошли с рабочим диапазоном – он сдвинулся в область более низких концентраций. Возможное объяснение этого эффекта состоит в поликлональности антител, вследствие чего вклад низко- и высокоаффинных фракций в формирование детектируемых комплексов неодинаков при разных разведениях. Отметим также высокую точность измерений – значения s_r не превышали 2.5%, что значительно ниже, чем в других полевых методов.

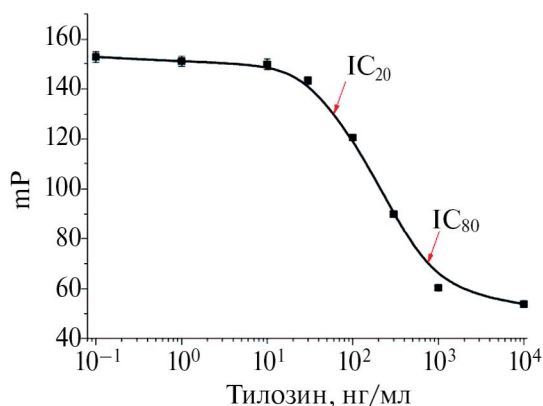
Для оценки селективности ПФИА вместо целевого аналита использовали антибиотики разных классов – тилмикозин, линкомицин, клиндамицин, пирлимицин, спирамицин, эритромицин, вальнемулин, тиамулин, стрептомицин, рокситромицин, спектиномицин. Для всех этих соединений кросс-реактивность не превосходила 0.1% (отсутствовали достоверные изменения сигнала при концентрациях 1 000 нг/мл), т.е. ПФИА высокоспецифичен по отношению к тилозину.

Таблица 1. Аналитические характеристики определения тилозина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием различных антисывороток ($n = 3$)

Номер антисыворотки	Предел обнаружения, нг/мл	IC_{20} , нг/мл	IC_{80} , нг/мл	IC_{50} , нг/мл
1	51.3	101.5 ± 1.0	1050 ± 1.2	326.5 ± 1.5
2	56.8	91.9 ± 1.5	476.3 ± 1.4	209.2 ± 1.9
3	64.1	109.7 ± 1.2	688.6 ± 2.1	274.9 ± 2.0
4	56.6	85.6 ± 0.9	353.5 ± 1.3	174.0 ± 1.4
5	62.0	95.5 ± 1.4	419.6 ± 1.5	200.2 ± 1.2

Таблица 2. Уровень открытия тилозина в меде методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа в экспериментах введено—найдено ($n = 2$)

№ пробы	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Процент открытия, %
1	0	0	н.о.
2	1.67	1.42 ± 0.05	99.2 ± 3.0
3	3.33	2.99 ± 0.04	103.8 ± 1.0
4	6.67	5.66 ± 0.05	98.0 ± 1.0

**Рис. 4.** Градуировочная зависимость для определения тилозина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа в боратном буферном растворе с использованием антисыворотки № 1 в разведении 1:400 ($n = 3$).

Анализ образцов мёда методом введено—найдено. Для экспериментов использовали образцы мёда из различных цветочных групп и регионов, в которых отсутствие тилозина было ранее подтверждено методом ВЭЖХ—МС [18]. Отобранные отрицательные образцы хранили при +4 °С до проведения анализа. Использовали только жидкую часть мёда без нерастворимых включений — фрагментов воска, кусочков прополиса, пыльцы и др. Для экстракции компонентов и введения в образец известного количества тилозина использовали равные объёмы ацетонитрила и 5 М раствора ацетата натрия, образующих двухфазную систему. Такая смесь позволяет, с одной стороны, растворять сахара и переводить углеводную часть мёда в водную фазу экстрагирующей смеси, с другой — переводить целевой аналит в органическую фазу без потерь [22]. В результате отбора 86.7% от полученного органического экстракта (650 мкл от общего объема 750 мкл), последующего высушивания и повторного растворения экстрагированных компонентов пробы, а также разведения пробы перед проведением ПФИА тилозин из исходной пробы в 0.3 г перевели в объем 3.25 мл.

Как видно из табл. 2, в таких препаратах после экстракции, повторного растворения и концентрирования (с учетом доли тестируемого экстракта) разработанной методикой ПФИА выявляется 98.0—103.8% добавленного количества тилозина.

Таким образом, разработанная методика ПФИА характеризуется простотой, экспрессностью, приемлемым диапазоном определяемых концентраций, высокой воспроизводимостью и поэтому перспективна для контроля безопасности мёда.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 20-76-10033.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Briyne N., Atkinson J., Borriello S.P., Pokludová L. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe // Vet. Rec. 2014. V. 175. № 13. P. 325.
2. Barton M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health // Nutr. Res. Rev. 2000. V. 13. № 2. P. 279.
3. Cazer C.L., Eldermire E.R., Lhermie G., Murray S.A., Scott H.M., Gröhn Y.T. The effect of tylosin on antimicrobial resistance in beef cattle enteric bacteria: A systematic review and meta-analysis // Prev. Vet. Med. 2020. V. 176. Article 104934.
4. Kim J., Ahn J. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table // Food Sci. Biotechnol. 2022. V. 31. № 12. P. 1481.
5. Ghimpețeanu O.M., Pogurschi E.N., Popa D.C., Dragomir N., Drăgoțoiu T., Mihai O.D., Petcu C.D. Antibiotic use in livestock and residues in food — A public health threat: A review // Foods. 2022. V. 11. № 10. Article 1430.
6. Liu C., Li B., Liu M., Mao S. Demand, status, and prospect of antibiotics detection in the environment. // Sens. Actuators B: Chem. 2022. V. 369. Article 132383.
7. Virto M., Santamarina-García G., Amores G., Hernández I. Antibiotics in dairy production: Where is the problem? // Dairy. 2022. V. 3. P. 541.
8. Bargańska Ž., Namieśnik J., Ślebioda M. Determination of antibiotic residues in honey // Trends Anal. Chem.. 2011. V. 30. № 7. P. 1035.
9. Orso D., Floriano L., Ribeiro L.C., Bandeira N.M., Prestes O.D., Zanella R. Simultaneous determination

- of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Food Anal. Methods*. 2016. V. 9. P. 1638.
10. *De Liguoro M., Cibin V., Capolongo F., Halling-Sørensen B., Montesissa C.* Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: Evaluation of transfer to manure and soil // *Chemosphere*. 2003. V. 52. № 1. P. 203.
 11. *Thompson T.S., Pernal S.F., Noot D.K., Melathopoulos A.P., van den Heever J.P.* Degradation of incurred tylosin to desmycosin – Implications for residue analysis of honey // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 586. № 1–2. P. 304.
 12. *Mitchell S.M., Ullman J.L., Teel A.L., Watts R.J.* Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin // *Chemosphere*. 2015. V. 134. P. 504.
 13. *Wijayanti A.D., Ardiansyah R.D., Pratama A.M., Haryanto A., Fitriana I.* Validation method for determining enrofloxacin and tylosin levels in broiler liver, kidney, and muscle using high-performance liquid chromatography // *Vet. World*. 2022. V. 15. № 2. P. 268.
 14. *Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L.* Antimicrobials in beekeeping // *Vet. Microbiol*. 2012. V. 158. № 1. P. 1.
 15. *Cripps C.J.* Veterinary regulations / *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. 1st Ed. / Eds. Kane T.R., Faux C.M. John Wiley & Sons, Inc., 2021. P. 191.
 16. Технический регламент Таможенного союза “О безопасности пищевой продукции” (с изменениями на 14 июля 2021 года) ТР ТС 021/2011. 173 с.
 17. *Xu J., Yang M., Wang Y., Yang Y., Tu F., Yi J., Lu H., Jiang X., Chen D.* Multiresidue analysis of 15 antibiotics in honey using modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Food Compos. Anal.* 2021. V. 103. Article 104120.
 18. *Granja R., Nio A.M., Zucchetti R., Nio R.M., Patel R., Salerno A.G.* Determination of erythromycin and tylosin residues in honey by LC/MS/MS // *J. AOAC Int.* 2009. V. 92. № 3. P. 975.
 19. *De Freitas A.G.M., Minho L.A.C., de Magalhães B.E.A., Dos Santos W.N.L., Santos L.S., de Albuquerque Fernandes S.A.* Infrared spectroscopy combined with random forest to determine tylosin residues in powdered milk // *Food Chem.* 2021. V. 365. Article 130477.
 20. *Di Corcia A., Nazzari M.* Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 974. № 1. P. 53.
 21. *Peris-Vicente J., Peris-García E., Albiol-Chiva J., Durgbanshi A., Ochoa-Aranda E., Carda-Broch S., Bose D., Esteve-Romero J.* Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples // *Microchem. J.* 2022. V. 177. Article 107309.
 22. *Thompson, T.S., van den Heever J.P., Komarnicki J.A.F.* Tylosin A and desmycosin in honey by salting-out assisted liquid-liquid extraction and aqueous normal phase ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 24. P. 6509.
 23. *Ahmed S., Ning J., Peng D., Chen T., Ahmad I., Ali A., Lei Z., Abu bakr Shabbir M., Cheng G., Yuan Z.* Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: A review // *Food Agric. Immunol.* 2020. V. 31. № 1. P. 268.
 24. *Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V.* Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 55. P. 81.
 25. *Lei H., Wang Z., Eremin S.A., Liu Z.* Application of antibody and immunoassay for food safety // *Foods*. 2022. V. 11. № 6. Article 826.
 26. *Gaudin V., Hedou C., Verdon E.* Validation of two ELISA kits for the screening of tylosin and streptomycin in honey according to the European decision 2002/657/EC // *Food Addit. Contam. Part A: Chem.* 2013. V. 30. № 1. P. 93.
 27. *Peng D., Ye S., Wang Y., Chen D., Tao Y., Huang L., Liu Z., Dai M., Wang X., Yuan Z.* Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, milk, honey and eggs // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 1. P. 44.
 28. *Burkin M., Galvidis I.* Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay // *Food Chem.* 2012. V. 132. № 2. P. 1080.
 29. *Yang J., Wang Y., Zhang Y., Zeng X., Liu J., Tian Y., Wang H., Xu Z., Shen Y.* Reverse distal similarity of hapten structure enhancing antibody’s group-specificity: Development of an immunochromatographic strip for tylosin and tilmicosin in milk and water // *J. Food Compos. Anal.* 2023. V. 116. Article 105068.
 30. *Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B.* Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs // *Food Chem.* 2020. V. 318. Article 126510.
 31. *Li X., Wu X., Wang J., Hua Q., Wu J., Shen X., Sun Y., Lei H.* Three lateral flow immunochromatographic assays based on different nanoparticle probes for on-site detection of tylosin and tilmicosin in milk and pork // *Sens. Actuators B: Chem.* 2019. V. 301. Article 127059.
 32. *Бакай К.А., Прийма А.Д., Сафронова В.А., Нестеренко И.С.* Разработка экспресс-методики для определения тилозина в продукции животноводства // *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко*. 2021. V. 82. P. 34.
 33. *Hendrickson O.D., Taranova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A.* Fluorescence polarization-based

- bioassays: New horizons // *Sensors*. 2020. V. 20. № 24. Article 7132.
34. *Bojescu E.D., Prim D., Pfeifer M.E., Segura J.M.* Fluorescence-polarization immunoassays within glass fiber micro-chambers enable tobramycin quantification in whole blood for therapeutic drug monitoring at the point of care // *Anal. Chim. Acta*. 2022. V. 1225. Article 340240.
35. *Qiu P., Song Z.* Determination of nicotinic acid in food and pharmaceuticals by a simple and rapid fluorescence polarization immunoassay (FPIA) // *Anal. Lett.* 2023. V. 1225. Article 340240.
36. *Zhang Y., Duan C., Li Q., Bai Y., Dong B., Tang Y., He M., Hao C., Wen K., Shen J., Wang Z.* Fluorescence polarization immunoassay based on fragmentary hapten for rapid and sensitive screening of polymyxins in human serum // *Sens. Actuators B: Chem.* 2022. V. 370. Article 132404.
37. *Lippolis V., Porricelli A.C., Mancini E., Ciasca B., Lattanzio V.M., De Girolamo A., Maragos C.M., McCormick S., Li P., Logrieco A.F., Pascale M.* Fluorescence polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins and their glucosides in wheat // *Toxins*. 2019. V. 11. № 7. Article 380.
38. *Ding Y., Chen H., Yang Q., Feng L., Hua X., Wang M.* A fluorescence polarization immunoassay for detection of thiacloprid in environmental and agricultural samples // *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 63. P. 36825.
39. *He S., Liang D., Xiong J., Wang Z., Zheng P., Zhang H., Ren Z., Jiang H.* Development of a sensitive and rapid fluorescence polarization immunoassay for high throughput screening eight glucocorticoids in beef // *J. Pharm. Biomed Anal.* 2022. V. 214. Article 114719.
40. *Мухаметова Л.И., Еремин С.А., Арутюнян Д.А., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В.* Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ лактоферрина человека в молоке с использованием однодоменных антител // *Биохимия*. 2022. Т. 87. № 12. С. 2065.
41. *Chen Y., He Q., Shen D., Jiang Z., Eremin S.A., Zhao S.* Fluorescence polarization immunoassay based on a new monoclonal antibody for the detection of the diisobutyl phthalate in yoghurt // *Food Control*. 2019. V. 105. P. 38.
42. *Raysyan A., Eremin S.A., Beloglazova N.V., De Saeger S., Gravel I.V.* Immunochemical approaches for detection of aflatoxin B1 in herbal medicines // *Phytochem. Anal.* 2020. V. 31. № 5. P. 662.
43. *Терещенков А.Г., Шишкина А.В., Карпенко В.В., Чертков В.А., Коневега А.Л., Касацкий П.С., Богданов А.А., Сумбатьян Н.В.* Новые флуоресцентные производные макролидов для изучения взаимодействия антибиотиков и их аналогов с рибосомным туннелем // *Биохимия*. Т. 81. № 10. С. 1439.
44. *Hermanson G.T.* Bioconjugate Techniques, 2nd Ed. Academic Press, 2008. 1323 p.
45. *DeRose P.C., Kramer G.W.* Bias in the absorption coefficient determination of a fluorescent dye, standard reference material 1932 fluorescein solution // *J. Lumin.* 2005. V. 113. № 3. P. 314.
46. *Нестеренко И.С., Бакай К.А., Прийма А.Д., Сафронова В.А., Сарханова А.А., Беляцкая А.В.* Разработка методики конкурентного иммуноферментного анализа для определения остаточных количеств фторхинолонов в продукции животноводства // *Ветеринария*. 2022. V. 1. P. 59.