DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-100
УДК 543.068.8:639.2/.5

МЕТОДИКА ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНТАМИЦИНА В МОРЕПРОДУКТАХ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Бакай Кристина Александровна
Нестеренко Ирина Сергеевна, канд. хим. наук
Сафронова Валентина Андреевна, канд. хим. наук
Прийма Анастасия Дмитриевна
ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва, Российская Федерация

Разработана методика экспресс-определения остаточного содержания гентамицина в морепродуктах на основе прямого твердофазного конкурентного иммуноанализа. Получены конъюгаты гентамицина с белками-носителями, специфичные сыворотки антител к гентамицину, подобраны оптимальные условия проведения иммуноферментного анализа, а также условия для экстракции гентамицина из образцов морепродуктов. Было показано отсутствие перекрёстной реакции с другими антибиотиками аминогликозидной группы. Диапазон определяемых концентраций гентамицина составил 16,0-2000,0 мкг/кг, а время анализа без учета пробоподготовки – 25 минут.

Ключевые слова: гентамицин; иммуноферментный анализ; аминогликозиды; морепродукты

THE METHOD OF RAPID DETERMINATION GENTAMICIN RESIDUES IN SEAFOOD BY ENZYME IMMUNOASSAY

Bakai Kristina Aleksandrovna
Nesterenko Irina Sergeevna, PhD Chem. Sci.
Safronova Valentina Andreevna, PhD Chem. Sci.
Priima Anastasiya Dmitrievna
The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russian Federation

A method for rapid determination of residual gentamicin content in seafood based on direct solid-phase competitive immunoassay has been developed. The conjugates of gentamicin with carrier protein, specific antisera to gentamicin was obtained, appropriate conditions for immunoassay and for extraction gentamicin from seafood samples were selected. It has been shown that there is no cross-reaction with other antibiotics of the aminoglycoside group. The linear range of gentamicin concentrations was 16.0-2000.0 µg/kg, and the analysis time, without sample preparation, was about 25 minutes.

Keywords: gentamicin; enzyme immunoassay; aminoglycosides; seafood

Аминогликозиды – антибиотики с химической структурой на основе аминоолигосахаридов. Эти соединения широко используются как в медицине, так и в ветеринарии для лечения и профилактики различных бактериальных инфекций [4]. Нерациональное использование аминогликозидов в качестве лекарственных препаратов для ветеринарного применения может привести к аккумулированию их в тканях животных и дальнейшему переходу остатков антибиотиков в продукцию животноводства, а также несет в себе риск развития резистентности у бактерий и может ослабить эффективность этих препаратов в качестве лекарств для человека [7]. Все аминогликозиды обладают характерными токсическими свойствами – ототоксичностью (кохлеарной и вестибулярной), нефротоксичностью и, реже – нейротоксичностью. Поэтому контроль уровня остаточного

содержания данных антибиотиков в продукции питания является важной задачей в сфере продовольственной безопасности.

Гентамицин – антибиотик, продуцируемый актиномицетами рода *Micromonospora* – *M. purpurea* и *M. echinospora* (рисунок. 1), который применяется для лечения желудочно-кишечных и респираторных заболеваний, вызванных преимущественно грамотрицательными и некоторыми грамположительными бактериями, в частности *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и др.

По данным ФГИС «Веста» в период с 2023 по 2025 год на территории РФ было проведено 249 627 исследований проб пищевой продукции на содержание в них аминогликозидов, среди которых 16 079 – на содержание гентамицина [1].

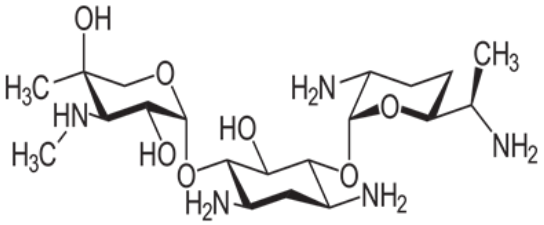

Рисунок 1 – Структурная формула гентамицина

Одним из основных методов контроля остаточных количеств терапевтических препаратов на данный момент является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [2]. Данный метод требует наличия в лаборатории дорогостоящего оборудования, а время проведения анализа может занимать до двух суток. Альтернативой для быстрого определения остаточных количеств гентамицина является метод иммуноферментного анализа (ИФА). Он позволяет за короткое время оценить содержание аналита в большом объёме проб.

Методика исследований. В основе разработанной методики лежит метод твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа. В работе был применён прямой формат конкурентного анализа. В данном случае на поверхности полистиролового планшета иммобилизованы специфические антитела к гентамицину, к которым в процессе анализа добавляют смесь исследуемого образца и коньюгата гентамицина с пероксидазой хрена. После проведения реакции окрашивания субстратом регистрируют аналитический сигнал с помощью спектрофотометра.

Так как гентамицин является низкомолекулярным веществом, то для получения специфических антител необходимо было получить иммуноген – коньюгат гентамицина с бычьим сывороточным альбумином (ГЕНТ-БСА), который был синтезирован карбодиимидным методом.

Специфические сыворотки антител получали следующим образом: самцов кроликов породы Шиншилла весом 2 кг с двухмесячного возраста иммунизировали конъюгатом ГЕНТ-БСА с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) или неполным адъювантом Фрейнда (НАФ). Адъюванты применяли для стимуляции иммунного ответа у иммунизируемого животного: для первичной иммунизации использовали ПАФ, дальнейшие поддерживающие иммунизации проводили с использованием НАФ. Синтезированный ранее иммуноген вводили подкожно в 20 точек спины один раз в месяц в дозах 0,02–0,1 мг в физрастворе в смеси с адъювантом. Отбор крови проводили через неделю после поддерживающей иммунизации. Повторную иммунизацию проводили через месяц.

Коньюгат гентамицина с пероксидазой хрена получали перйодатным методом.

Результаты исследований и их обсуждение. Полученные антисыворотки были протестированы на предмет связывания с ферментным конъюгатом, после чего была отобрана наиболее специфичная сыворотка.

В процессе работы были подобраны оптимальные концентрации иммунореагентов, буферные растворы и условия сорбции антител на планшете.

Для создания экспресс-методики было оптимизировано время проведения анализа. Было установлено, что сокращение времени

иммунохимической реакции до 15 минут не оказывает существенного влияния на аналитические характеристики методики.

На рисунке 2 представлен характерный градуировочный график для определения гентамицина с помощью разработанной методики ИФА.

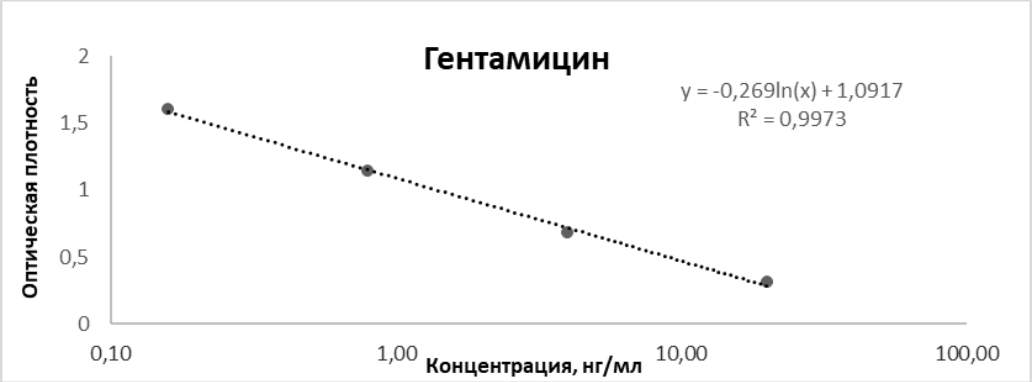

Рисунок 2 – Градуировочный график для определения гентамицина

Также была проведена оценка перекрестного реагирования выбранной сыворотки с другими антибиотиками аминогликозидного ряда и антибиотиков схожих по химическому строению. Была показана высокая специфичность разработанной методики по отношению к гентамицину (таблица 1).

Таблица 1 – значения перекрестной активности для различных антибиотиков

Антибиотик	Перекрестное связывание, %
гентамицин	100
стрептомицин	<0,1
канамицин	<0,1
неомицин	<0,1
амикацин	<0,1
паромомицин	<0,1
гигромицин	<0,1
апрамицин	<0,1
спектиномицин	<0,1
эритромицин	<0,1
дигидрострептомицин	<0,1
линкомицин	<0,1

Разработанную методику применили для определения остаточного содержания гентамицина в пищевой продукции животного происхождения. Рядом авторов описаны способы экстракции гентамицина из таких матриц, как свинина, говядина, мясо птицы, субпродукты, яйцо куриное, молоко, мёд [3, 5, 6, 8, 9]. Однако нет данных об исследовании морепродуктов (кальмар, креветка), поэтому подбор условий пробоподготовки для этих объектов представлял интерес.

Содержание аминогликозида в исследуемой пробе, определяемое с помощью ПТК ИФА, зависит не только от точности самого метода, но и от степени извлечения аналита на стадии пробоподготовки, а также от влияния фона матрицы на результаты анализа.

Гентамицин – антибиотик, который практически не растворяется в органических растворителях, но хорошо растворим в воде. Поэтому при выборе экстрагента были рассмотрены водно-солевые растворы с разными значениями pH, а также химические реагенты, которые приводят к денатурации белков. Все-

го было исследовано 8 различных растворов и буферов: 0,1 М фосфатно-солевой буфер с pH 7,4 (ФСБ), 0,1 М гидрофосфат калия, 1 М сульфат аммония, 1 М гидроксид натрия, 25 мМ боратный буфер с pH 10,5 (ББ), 5 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 0,1 М карбонат-бикарбонатный буфер с pH 9,5 (КББ), 0,05 М ацетатный буфер с pH 4,7 (АБ).

Образцы морепродуктов тщательно гомогенизировали с помощью лабораторного измельчителя. Навеску образца массой 1 г помещали в полипропиленовую центрифужную пробирку, добавляли 10 мл экстрагента и перемешивали 30 минут на шейкере, после чего центрифугировали 10 минут при 4 000 об/мин и 4 °С. Полученный супернатант сливали в чистую пробирку. К осадку добавляли 10 мл экстрагента и повторяли экстракцию. Супернатант после повторной экстракции смешивали с первым супернатантом. От полученной смеси отбирали аликвоту экстракта, которую смешивали с рабочим буфером в соотношении 1:4, и далее этот раствор использовали при проведении анализа. Результаты проведённых экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Процент извлечения гентамицина из образцов морепродуктов

Матрица	Экстрагент							
	0,1 М ФСБ pH 7,4	0,1 М K_2HPO_4	1 М $(NH_4)_2SO_4$	1М NaOH	25 мМ ББ pH 10,5	5 % раствор ТХУ	0,1 М КББ pH 9,5	0,05 М АБ pH 4,7
Кальмар	< 10 %	25-50 %	< 10 %	>200%	75-115%	< 10 %	15-55 %	< 10 %
Креветки	< 10 %	30-65 %	< 10 %	>200%	80-120%	< 10 %	10-50 %	< 10 %

Высокая степень извлечения гентамицина из морепродуктов наблюдалась при использовании 25 мМ боратного буфера с pH 10,5 в качестве экстрагирующего раствора.

Также хотелось бы отметить такую особенность подготовки данных объектов, как повторная экстракция, которая позволяла дополнительно извлечь значительную часть антибиотика, оставшегося в образце после первого этапа экстракции.

Выводы. Таким образом, была разработана высокочувствительная методика для быстрого определения гентамицина в морепродуктах. Предел количественного определения составил 16 мкг/кг. Время пробоподготовки – 80 минут, а время постановки иммунохимической реакции – 25 минут. Было показано отсутствие перекрёстного реагирования с другими антибиотиками аминогликозидной группы. Проведено определение содержания гентамицина в образцах морепродуктов. В качестве экстрагента был выбран 25 мМ боратный буфер с pH 10,5. Степень извлечения гентамицина составила от 75 до 120 %.

Список литературы

1. Веста : информационно-аналитическая система / Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – URL: https://vesta.vetrf.ru/ (дата обращения: 06.04.2026).

2. ГОСТ 32798-2014. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором : межгосударственный стандарт / разработан ФГБУ «ВГНКИ». – Москва : Стандартинформ, 2015. – 11 с.

3. Фарафонова О. В. Определение аминогликозидных антибиотиков в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / О. В. Фарафонова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 7 (38). – С. 65–69.

4. Glinka M. Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends / M. Glinka, W. Wojnowski, A. Wasik // Trends in Analytical Chemistry. – 2020. – Vol. 131. – P. 52.

5. Ishii R. Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / R. Ishii, M. Horie, W. Chan [et al.] // Food Additives and Contaminants. – 2008. – Vol. 25. – P. 1509–1519.

6. Li C. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY anti-

body based ic-ELISA and FPIA / C. Li [et al.] // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 227. – P. 48–54.

7. Xiaolong F. Mechanism and prevention of ototoxicity induced by aminoglycosides / F. Xiaolong, P. Wan, P. Li [et al.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – P. 11.

8. Zeng K. Chemiluminescence imaging immunoassay for multiple aminoglycoside antibiotics in cow milk / K. Zeng [et al.] // International Journal of Food Science and Technology. – 2019.

9. Zhu W. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps / W. Zhu, J. Yang, W. Wei [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1207. – P. 29–37.

DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-101
УДК 638.178

СОСТАВ ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА И НАСТОЕК НА ЕГО ОСНОВЕ

Будникова Наталья Валентиновна, канд. с.-х. наук
Митрофанов Дмитрий Викторович, канд. с.-х. наук
ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства», г. Рыбное, Российская Федерация

Продукты пчеловодства являются важными компонентами многочисленных фармацевтических препаратов и биологически активных добавок. Исследование состава и свойств трутневого расплода и его экстрактов представляют собой актуальные и значимые задачи современной науки. Целью настоящего исследования стало детальное изучение химического состава и биологических свойств настоек, изготовленных на основе трутневого расплода. Получено, что в результате получения настойки трутневого расплода достигается извлечение целевых биологически активных компонентов, входящих в состав расплода.

Ключевые слова: трутневый расплод; состав; настойки; биологически активные компоненты

COMPOSITION OF THE DRONE BROOD AND TINCTURES BASED ON IT

Budnikova Natalia Valentinovna, PhD Agr. Sci
Mitrofanov Dmitriy Victorovich, PhD Agr. Sci.
Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Beekeeping Research Centre", Rybnoye, Russian Federation

Beekeeping products are important components of numerous pharmaceuticals and biologically active supplements. The study of the composition and properties of drone brood and its extracts is an urgent and significant task for modern science. The purpose of this study was to investigate the chemical composition and biological properties of tinctures made from drone brood. It was found that the extraction of target biologically active components from drone brood results in the production of tinctures.

Key words: drone brood; composition; tinctures; and biologically active components

Сегодня многие врачи и ученые справедливо считают пасеку подлинной природной лечебницей, благодаря ее микроклимату и арсеналу биологически активных продуктов пчеловодства, которые она дает человеку. При правильном и разумном их использовании они служат человеку как питательные, диетические, лечебные и косметические средства, которые в настоящее время используют врачи апитерапевты и народные целители. Мед и другие продукты пчеловодства известны уже очень давно. Эти продукты являясь