

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ ХЛОРАМФЕНІКОЛУ В ПРОДУКТАХ ТВАРИННИЦТВА ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДІВ СКРИНІНГУ ТА ПІДТВЕРДЖЕННЯ

*Д. В. Янович, д-р. с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. б. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. М. Кіслова, О. М. Паздерська, наукові співробітники*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті узагальнено результати досліджень вмісту залишків хлорамфеніколу у зразках меду, м'яса та молочних продуктів методом імуноферментного аналізу за період 2008-2014 рр. Підтвердження результатів, одержаних скринінг-методом, проводили із застосуванням рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Одержані різними методами результати порівнювали у відповідності до критеріїв, викладених в Рішенні 2002/657/ЄС.

Ключові слова: ХЛОРАМФЕНІКОЛ, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ДЕТЕКТУВАННЯ, ПРОДУКТИ ХАРЧУВАННЯ.

Хлорамфенікол (ХАФ) — антибіотик широкого спектру дії, ефективний проти збудників багатьох інфекційних захворювань людей та тварин. Через небезпеку виникнення побічної дії, яка може спричинити фатальні захворювання кровотворної системи в людей, його використання в гуманній медицині обумовлено тільки у випадках тяжкого перебігу інфекцій. Заборона використання ХАФ для лікування продуктивних тварин пов'язана з високим ризиком потрапляння його залишків у харчові продукти, що може мати фатальні наслідки для людей з підвищеною чутливістю до цього антибіотику.

У зв'язку із заборонаю застосування ХАФ продуктивним тваринам не встановлено максимально допустимого рівня (МДР) вмісту його залишків у продуктах тваринництва (м'ясі, молоці, молочній сироватці). Регламент 470/2009 Європейської Комісії (ЄК) встановлює мінімальну необхідну межу визначення (МНМВ) для залишків ХАФ, яка відповідає найнижчим рівням чутливості методів контролю залишків заборонених субстанцій. Для визначення залишкових кількостей ХАФ у продуктах харчування застосовують високочутливі та специфічні методи, для яких у задокументований спосіб доведено достовірність результатів не гіршу за 95% — (β - похибка), в межах хибної відповідності на очікуваному рівні: імуноферментний аналіз (ІФА), рідинна хроматографія (РХ) або газова хроматографія (ГХ) з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (МС/МС). При одержанні висновків про невідповідність зразків, отримані результати повинні бути підтверджені методами, що відповідають вимогам критеріїв, викладених у Рішенні ЄС 657/2002. Для залишків ХАФ таким методом є рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням.

Матеріали і методи. Скринінгові дослідження проводились із застосуванням методу імуноферментного аналізу з використанням тест-наборів Ridascreen Chloramphenicol Art. No.: R1505, R-biopharm (Німеччина); для екстрагування залишків ХАФ із зразків

використовували етилацетат (Pestiscan, Lab-scan); збагачення контрольних зразків цільовим аналітом проводилось розчином ХАФ з концентрацією 50 нг/мл R-biopharm Art. No.: R1599.

Підтвердження результатів скринінгу проводили методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (PX-МС/МС). Для аналізу застосовували обладнання фірми Varian 1200L LC/MS (США) з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором, з колонкою SunFire™ C18 (3,5 μm, 2,1x100 mm) із передколонкою SunFire™ C18 (3,5 μm, 2,1x10 mm) фірми Waters (США).

Зразки продуктів харчування. Для оцінки придатності методики використовували зразки продуктів, одержаних із господарств, в яких не використовували ветеринарні лікарські засоби для профілактики та лікування тварин. Контрольні зразки продукції додатково випробовували на відсутність у них цільового аналіту методом PX-МС/МС.

Розчини стандарту. Збагачення зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводили стандартним розчином ХАФ, R-biopharm Art. No.: R1599. Основний стандартний розчин ХАФ для збагачення зразків за проведення досліджень PX-МС/МС готують у концентрації 1 мг/мл у 40% розчині метанолу.

Підготовка зразків.

Скринінг-метод. Для проведення аналізу скринінг-методом відібрані порожні (контрольні) та збагачені зразки (м'яса, меду, сухого молока) готували за методикою, наданою фірмою-виробником тест-систем.

Зразки молочної сироватки готували за методикою, розробленою і валідованою Інститутом ветеринарних препаратів (м. Вільнюс, Литва). Наважку молочної сироватки попередньо відновлювали високоочищеною водою, ретельно перемішуючи на вортексі. Нерозчинені білки осаджували центрифугуванням. Екстрагування аналіту з відібраної аліквоти проводять етилацетатом. Фази розділяють центрифугуванням. Аліквоту органічної фази, що відповідає 2 г зразка, випаровують до сухого залишку, знежирюють гексаном і відновлюють буферним розчином із тест-системи. Кількісну оцінку кольорової реакції проводили у мікротитрувальних полістиролових планшетах на планшетному рідері Titertek Multiskan MCC, довжина хвилі поглинання – 450 нм. Розрахунок вмісту ХАФ у зразках проводили з використанням комп'ютерної програми RIDAWIN.

Метод PX-МС/МС. Зразки меду розчиняють у високоочищеній воді, ретельно перемішуючи на вортексі, і проводять екстрагування етилацетатом. Фази розділяють центрифугуванням, аліквоту супернатанту випаровують до сухого залишку. Відновлюють сухий залишок 30% розчином метанолу і знежирюють сумішшю гексан / тетрахлорметан (1:1). Контрольний зразок меду навантажують внутрішнім стандартом ХАФ і готують за вказаною вище методикою. Для побудови калібрувальної кривої контрольні зразки меду навантажують різними об'ємами розчину стандартного зразка хлорамфеніколу (діапазон калібрувальної кривої складає від 0,1 до 10 нг/мл).

Наважки сухого молока та молочної сироватки відновлюють високоочищеною водою і проводять екстракцію аналіту в два етапи — спочатку 10% розчином метанолу, а потім етилацетатом. Аліквоту супернатанту випаровують до сухого залишку і відновлюють розчином 40% метанолу і знежирюють сумішшю гексан / тетрахлорметан (1:1). Контрольний зразок сухого молока або молочної сироватки навантажують внутрішнім стандартом ХАФ і готують за вказаною вище методикою. Для побудови калібрувальної кривої контрольні зразки сухого молока або молочної сироватки навантажують різними об'ємами розчину стандартного зразка ХАФ (діапазон калібрувальної кривої складає від 0,1 до 10 нг/мл).

Зразки м'язової тканини гомогенізують і проводять екстракцію етилацетатом у два етапи. Отримані екстракти об'єднують і висушують. Сухий залишок знежирюють сумішшю гексан / тетрахлорметан (1:1) і відновлюють високоочищеною водою. Очистку водного екстракту зразка проводять твердо-фазним екстрагуванням на колонках Bond Elut Plexa. Елюцію хлорамфеніколу проводять 2,5 мл метанолу, випаровують до сухого залишку і

відновлюють 40% розчином метанолу. Контрольний зразок м'язової тканини навантажують внутрішнім стандартом хлорамфеніколу і готують за описаною вище методикою. Для побудови калібрувальної кривої контрольні зразки м'язової тканини навантажують різними об'ємами розчину стандартного зразка ХАФ (діапазон калібрувальної кривої складає від 0,1 до 10 нг/мл).

Хроматографування проводять в градієнтному режимі, система метанол / вода, швидкість потоку 0,3 мл/хв. Час виходу аналіту — 2,6 хв. Іонізацію ХАФ проводять в режимі негативної іонізації по продукт-іонах 321 → 152 m/z та 321 → 257 m/z з енергією удару відповідно 15,5 та 9 V.

Результати й обговорення. Роботи, що з 2005 року виконувались лабораторією по дослідженню продуктів тваринного походження, дозволили зібрати значну кількість матеріалу щодо використання ХАФ у ветеринарній практиці. За вказаний період методом імуноферментного аналізу було проаналізовано 11670 зразків м'язів різних видів тварин (25 – позитивних), 5116 зразків сухого молока (13 – позитивних), 3492 зразки меду (10 – позитивних). Метод ІФА дозволяє виявляти окремі досліджувані аналіти на рівні 0,05 мкг/кг. Однак, для чіткого розмежування неправдиво-позитивних та підозрілих результатів даний метод потребує певної фахової оцінки, оскільки висока специфічність і селективність методу напряму залежить від здатності специфічних антитіл зв'язувати досліджуваний аналіт. Хоча в окремих випадках можливе неспецифічне зв'язування антитілами компонентів матриці досліджуваного зразка і, відповідно, отримання неправдиво-позитивних результатів. З метою відсікання подібних результатів нами було проведено оцінку придатності ІФА на типових матрицях (м'ясі, сухому молоці, меді), в яких у подальшому буде проводитись дослідження. Результати оцінки точності та правильності ІФА для перерахованих матриць представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Контроль точності та правильності методу імуноферментного аналізу щодо дослідження продуктів харчування

Зразки	Середня концентрація аналіту (нг/кг)				СС α	СС β	Довірчий інтервал проценту повернення
	Контрольні зразки		Навантажені 1/2 MRPL				
	X _{сер} ± SD	RSD	X _{сер} ± SD	RSD			
М'язова тканина	12,7±2,3	18,3	142,8±16,9	11,8	18,4	180,5	79,1-94,5
Сухе молоко	98,9±12,8	12,9	214,2±15,1	7,1	127,1	248,3	70,4-83,1
Мед	42,1±4,7	11,2	158,5±15,4	9,74	52,1	193,1	74,5-81,2

Для кожної з представлених матриць було проаналізовано 20 контрольних (“чистих”) зразків та навантажених на рівні 1/2 МНМВ (цільова концентрація для заборонених препаратів). За встановлення валідаційних параметрів було проаналізовано м'язову тканину (яловичину, свинину і курятину). За отриманими результатами було встановлено, що регуляторна межа для всіх видів матриць була практично однакова. Проаналізовані контрольні зразки яловичини та свинини не перевищували раніше встановленого нульового рівня для зразків курятини. Збагачені зразки були не нижчі або вкладались у 5% відхилення за встановлену для курятини межу відсікання.

Як видно із даних таблиці 1, для всіх методик визначення залишкових кількостей ХАФ було отримано достатньо низький поріг матричного впливу на рівні 0,018; 0,127; 0,052 мкг/кг для зразків м'язових тканин, сухого молока та меду, відповідно. Обчислене значення фактору відсікання 0,181; 0,248; 0,193 мкг/кг для м'язової тканини, сухого молока і меду, відповідно, показують, що будь-який результат, вищий за цей рівень, перевищує встановлену здатність виявлення СС β , можна вважати скринінг-позитивним. У відповідності до Регламенту (ЄС) №37/2010, необхідно провести розслідування причин невідповідності, застосувати коригувальні дії для їх виправлення.

Тому, згідно з Директивою 2002/657/ЕС, у випадку підозри про невідповідність, одержаний результат повинен отримати підтвердження попередньо визначеним для цієї мети підтверджуючим методом, у нашому випадку — це метод рідинної хроматографії з тандемним мас-спектрометричним детектуванням.

Підтверджуючий метод був валідований у відповідності до Рішення Єврокомісії 2002/657/ЕС. Протягом процедури валідації встановлено такі параметри: специфічність, селективність, точність, лінійність, внутрішньо-лабораторна відтворюваність, відсоток витягу, межа прийняття рішення (СС α) та здатність виявлення (СС β). Специфічність методики визначали за дослідження 20 різних контрольних зразків для оцінки можливої розбіжності часу елюції ХАФ. Лінійність встановлювали за калібрувальною кривою, отриманою за дворазового вимірювання контрольних зразків, навантажених стандартом у концентрації 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 мкг/кг. Точність та внутрішньо-лабораторну відтворюваність визначали при повторному проведенні аналізу (n=6) зразків м'язів, сухого молока та меду, навантажених аналітом на рівні 0,5, 1,0 та 1,5 валідаційних рівні (0,15; 0,3; 0,45 мкг/кг), дослідження проводили 2 дні. Точність оцінювали за підрахунком середньостатистичного відхилення результатів, отриманих для кожної концентрації зокрема. Витяг вираховували за концентрацією навантажених певною кількістю аналіту контрольних зразків. СС α та СС β визначали за калібрувальною кривою, побудованою на навантажених різними концентраціями стандарту матрицях, як описано у ISO 11843. Межу прийняття рішення вираховували як середнє значення, отримане для шести контрольних зразків плюс 2,33 помножене на стандартне відхилення. Здатність виявлення розраховували як середнє значення отримане для шести навантажених контрольних зразків плюс 1,64 помножене на стандартне відхилення.

Дані по проведенню порівняльних досліджень скринінг-позитивних зразків методом РХ-МС/МС представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати порівняльних досліджень скринінг-позитивних зразків методом РХ-МС/МС

№ п/п	Назва зразків	Результати досліджень (мкг/кг), отримані методами	
		ІФА	РХ-МС/МС
1	Контроль м'язової тканини	0,013 \pm 0,0023	0,0197 \pm 0,0058
2	Позитивні зразки м'язової тканини ВРХ: Зразок 1	0,185	0,249
3	Зразок 2	0,351	0,298
4	Зразок 3	0,487	0,473
5	Позитивні зразки м'язової тканини свинини	0,244	0,328
6	Позитивні зразки м'язової тканини птиці	0,585	0,685
7	Контроль сухого молока	0,098 \pm 0,013	0,04 \pm 0,0011
8	Позитивні зразки сухого молока: Зразок 1	0,307	0,413
9	Зразок 2	0,534	0,637
10	Зразок 3	0,253	0,329
11	Контрольні зразки меду	0,042 \pm 0,0047	0,045 \pm 0,0015
12	Позитивні зразки меду: Зразок 1	0,211	0,175
13	Зразок 2	0,195	0,225

За дослідження методом підтвердження трьох зразків м'язової тканини яловичини, що методом скринінгу були визнані як позитивні з концентрацією аналіту 0,185, 0,351 та 0,487 мкг/кг, отримано такі результати: 0,249, 0,298 та 0,473 мкг/кг відповідно. Зразок, що містить 0,185 мкг/кг аналізу і знаходиться фактично на границі здатності виявлення скринінг-методу (СС β становить 0,181 мкг/кг за табл. 1) був підтверджений, як позитивний

(0,249 мкг/кг). Всі досліджені контрольні скринінг-негативні зразки були кваліфіковані як негативні і підтверджуючим методом (рівень хлорамфеніколу складав 0,041 і 0,045 мкг/кг).

Контрольні зразки сухого молока, що досліджувались імуноферментним та підтверджуючим методами, обчислені як негативні, і рівень аналіту становив 0,098 та 0,04 мкг/кг, відповідно. Скринінг-позитивні зразки сухого молока з виявленим аналітом на рівні 0,307; 0,537; 0,253 мкг/кг також були підтверджені методом мас-спектрометрії як позитивні. Кількість ХАФ у них становила 0,413; 0,637; 0,329 мкг/кг відповідно.

Зразки меду, що були кваліфіковані як позитивні методом ІФА з рівнем аналіту 0,211 та 0,195 мкг/кг, отримали підтвердження на рівні 0,175 та 0,225 мкг/кг, відповідно. Контрольні зразки меду також були підтверджені як “чисті” методом РХ-МС/МС.

ВИСНОВКИ

1. Процедура валідації ІФА для визначення залишкових кількостей ХАФ у зразках м'язових тканин (свинини, яловичини, курятини), сухого молока та меду, виконана тест-набором Ridascreen Chloramphenicol Art. No.: R1505, R-biopharm (Німеччина) згідно з Рішенням Єврокомісії 2002/657/ЕС, дозволяє на належному рівні проводити контроль якості продуктів харчування.

2. Представлений метод підтвердження (рідинної хроматографії з тандем-мас-спектрометричним детектуванням) дає можливість чітко відділяти неправдиво-позитивні та сумнівні зразки продуктів харчування (м'яса, сухого молока та меду) від реально забруднених ХАФ.

Перспективи подальших досліджень. Розробка методів підтвердження для визначення залишкових кількостей інших аналітів у продуктах тваринництва.

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN PRODUCTS OF ANIMAL ORIGIN USING SCREENING AND CONFIRMATION METHODS

D. Yanovych, Z. Zasadna, M. Rydchuk, S. Kislova, O. Pazderska

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The paper summarizes the results of studies of chloramphenicol residues content in samples of honey, meat and dairy products by enzyme immunoassay for the period 2008-2014. The confirmation of the results obtained by screening method was carried out using liquid chromatography with mass spectrometric detection. The results obtained by different methods were compared according to the criteria set out in Decision 2002/657 / EC.

Keywords: CHLORAMPHENICOL, REMAINING AMOUNTS, ANALYSIS OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS-SPECTROMETER DETECTION, FOODSTUFFS.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ХЛОРАМФЕНИКОЛА В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СКРИНИНГА И ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

Д. Янович, З. Засадная, М. Ридчук, С. Кислова, О. Паздерская

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье обобщены результаты исследований остаточных количеств хлорамфеникола в образцах меда, мяса и молочных продуктов методом иммуноферментного анализа за период 2008-2014 г. Подтверждение результатов, полученных скрининг-методом, проводили, используя жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием. Полученные результаты сравнивали в соответствии с критериями Решения 2002/657/ЕС.

Ключевые слова: ХЛОРАМФЕНИКОЛ, ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ, ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Community. L 221. – 2002. – P. 8-36No. 2002/657/EC.
2. ISO 11843 Capability of detection - Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case, 2003.
3. CRLs (2010): Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer). Community Reference Laboratories 20/1/2010. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf
4. *Impens S., Reybroeck W., Vercaemmen J.* Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2 // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. — V. 483. — P. 153–163.
5. *Tolgtesi A., Fekete J., Sharma V. K.* A LC-MS/MS Confirmatory method for determination of chloramphenicol in real samples screened by competitive immunoassay // *Acta Alimentaria.* — 2014. — V. 23 (2). — P. 114–122.
6. *Shen H. Y., Jiang H. L.* Screening determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 535 — P. 33–41.
7. *Yibar A., Cetinkaya F., Soyutemiz G. E.* ELISA screening and liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmation of chloramphenicol residues in chicken muscle, and the validation of a confirmatory method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Poult. Sci.* — 2011. — V. 90 — P. 2619–2626.

Рецензент — І. М. Кушнір, д. вет. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.