УДК 54.062/543.054/.422.31/.54

ВИКОРИСТАННЯ ІМУНОАФІННИХ КОЛОНОК У ПІДГОТОВЦІ ЗРАЗКІВ ПРОДУКТІВ ХАРЧУВАННЯ ДЛЯ СКРИНІНГ-ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРАМФЕНІКОЛУ

Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. М. Кіслова, О. М. Паздерська, наукові співробітники,
Н. А. Майба, молодший науковий співробітник,
М. В. Шимко, старший лаборант

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

У статті наведено особливості аналізу зразків харчової продукції тваринного походження після глибокої технологічної обробки (твердий сир, молоко згущене з цукром, згущене з цукром та какао, варене згущене з цукром та масло), зокрема визначення вмісту залишків антибіотиків із застосуванням методів скринінгового аналізу (ІФА). Наведено дані про вміст залишків хлорамфеніколу у зразках за період 2014-2016 рр. Розглянуто питання ефективності застосування при підготовці зразків імуноафінних колонок, виробництва фірми Р-Біофарм (Німеччина), призначених для аналізу темних сортів меду. Відсоток повернення аналіту в модельних вищезгаданих зразках складав від 42 до 98 %. Одержані результати порівнювали до критеріїв, викладених у Рішенні 2002/ 657/ ЕС.

Ключові слова: ХЛОРАМФЕНІКОЛ, ІМУНОАФІННІ КОЛОНКИ, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ПРОДУКТИ ХАРЧУВАННЯ.

Хлорамфенікол (ХАФ) – це антибіотик широкого спектру дії, ефективний як проти грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, та інших груп мікроорганізмів. Однак, у зв’язку з його негативним впливом на здоров'я людей, використання ХАФ у тваринництві та бджільництві суворо заборонено у країнах ЄС, США, Канаді. Виявлення окремих випадків несанкціонованого застосування ХАФ та інших заборонених антимікробних речовин призвело то послідовного впровадження низки заходів, які було затверджено рядом директив та постанов, що регламентують вимоги до проведення аналізів та створення системи контролю безпеки харчових продуктів тваринного походження.

Так, Регламент Комісії 508/1999 / ЕС [1] встановлює максимально допустимі межі залишків ветеринарних лікарських препаратів у харчових продуктах тваринного походження, Директива Ради 96/23 / ЕС [2] містить рекомендації для країн-членів ЄС щодо контролю залишків ветеринарних лікарських препаратів у продуктах харчування і тваринах із докладним описом процедур для розробки Національних планів моніторингу. Критерії для визначення продуктивності аналітичних методів та інтерпретації результатів обумовлено рішенням Комісії 2002/657/ ЕС [3].

Для будь-якого виду тварин або продуктів харчування є дві основні групи речовин, які необхідно контролювати: недозволені речовини, що належать до групи А, (визначаються Директивою Ради 96/22/ЕС і Додатком IV Регламенту Ради 2377/90/ЕЕС); і речовини групи В – дозволені до використання із встановленими МДР. Згідно з вказаними нормативними документами, ХАФ віднесено до препаратів зі встановленим нульовим рівнем толерантності у продуктах харчування тваринного походження. Для таких заборонених речовин встановлена

мінімально необхідна межа визначення – МНМВ (MRPL) для методу аналізу; у випадку ХАФ вона становить 0,3 мкг/кг. Однак, у якості запобіжного заходу для потенційно забруднених продуктів харчування багато країн ввели власні мінімально допустимі рівні досліджень – менше 0,1 мкг/кг, тим самим сприяючи розвитку надчутливих методів аналізу.

Сьогодні розроблено та впроваджено цілий ряд нових сучасних методів для визначення залишків ХАФ: рідинна хроматографія з УФ-детектуванням [4], мас-спекрометрія у варіантах ГХ/МС [5, 6] та РХ/МС/МС [7–9, 10–16] або з високою роздільною здатністю РХ/МС [6, 17] для дослідження зразків молока, м'язових тканин тваринного походження, морепродуктів і меду, а також для прижиттєвого моніторингу ХАФ у сечі і плазмі крові. Залежно від вибору методу дослідження, застосовуються різноманітні способи підготовки зразків зі складними матрицями: від простого екстрагування у системі «рідина : рідина» до використання додаткових кроків очистки та концентрування методом висушування або твердофазного екстрагування (ТФЕ) із використанням колонок з різними типами сорбентів. Наприклад, для визначення ХАФ у меді деякі автори розчиняють зразки у воді та екстрагують ацетонітрилом із додаванням NaCl та наступним екстрагуванням хлороформом [14]. Інші автори пропонують розчиняти зразки меду у воді, встановлювати певне значення pH екстракту, а потім очищати методом ТФЕ на картриджах, таких як OASIS HLB [12]. Однак, найчастіше процедуру очистки зразків використовують для пробопідготовки зразків м'язових тканин або морепродуктів. Так, для проведення дослідження на наявність залишкових кількостей ХАФ у зразках м'язів коней, свиней та великої рогатої худоби авторами запропоновано екстрагування етилацетатом із подальшим двоступінчастим очищенням на колонках С18 [18]. В іншій роботі, у підготовці зразків молока і м'язових тканин свиней використано метод очистки та концентрування ХАФ на імуноафінних колонках високої продуктивності (ІАК), виготовлених самими дослідниками [13, 19,].

Оскільки сьогодні не всі лабораторії мають можливість підготувати власні імуноафінні колонки, комерційні ІАК можна вважати оптимальним варіантом для проведення рутинних досліджень зразків зі складними матрицями. Механізм розділення в імунній хроматографії ґрунтується на взаємодії антиген-антитіло. При цьому або антиген, або антитіло іммобілізують до стаціонарної фази або гелю картриджа. Такий інструментальний підхід особливо актуальний для підготовки складних препаративних зразків: за необхідності дослідження достатньо низьких концентрацій аналіту зі складних біологічних матриць, таких як продукти харчування. Процедура аналізу таких зразків складається з трьох етапів: екстрагування аналіту зі зразка у відносно чистій формі, максимальна інструментальна очистка його методом твердофазного екстрагування та подальше визначення концентрації досліджуваного аналіту.

Нашим завданням було запропонувати достатньо простий у виконанні метод підготовки зразків продуктів харчування для кількісного скринінг-визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу. Враховуючи позитивний досвід використання ІАК у рутинних аналізах різних лабораторій [8, 20], нами використано очистку зразків комерційними імуноафінними колонками Easi-Extract Chloramphenicol, виробництва фірми Р-Біофарм (Німеччина), призначених для очистки та концентрування залишкових кількостей хлорамфеніколу зі зразків темних сортів меду, маточного молочка та морепродуктів.

У цій статті представлено результати визначення залишкових кількостей ХАФ, отримані за очистки зразків зі складними матрицями (різних типів згущеного солодкого молока (вареного, з додаванням какао), твердих сирів та масла) на імуноафінних колонках та подальшого дослідження скринінг-методом ІФА.

Матеріали і методи. *Реактиви та стандарти.* Етилацетат (Pestiscan, Lab-scan), натрій дигідрофосфат дигідрат (AppliChem), натрій гідрофосфат (Fluka Analytical), натрій хлорид (MCoPharma), метанол (Lab-Scan), гексан (Lab-Scan), колонки для ТФЕ Bond Elut Plexa (30 mg, 3 ml), імуноафінні колонки Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column, R-Biopharm Rhone Ltd (Німеччина), тест-набір Ridascreen Chloramphenicol Art. No.: R1505, виробництва

фірми R-Biopharm (Німеччина) для кількісного визначення залишків хлорамфеніколу в меді, молоці, молочній продукції, м‘ясі та яйцях. Розчин стандарту ХАФ з концентрацією 50 нг/мл фірми R-Biopharm Art. No.: R1599.

Приготування зразків.

Зразки твердого сиру – у поліпропіленову пробірку, об’ємом 50 мл, зважують 5 г подрібненого на тертці зразка, додають 20 мл етилацетату та екстрагують впродовж 40 хв. за перемішування на вортексі у горизонтальному положенні. Центрифугують упродовж 10 хв. за 3000 g та температурі 10° С. Відбирають супернатант у скляну пробірку для висушування і повторюють процедуру екстрагування з 20 мл етилацетату. Дві порції супернатанту об’єднують для висушування. Сухий залишок відновлюють у 5 мл 20 мМ фосфатного буферу, рН 7.4, та знежирюють 5 мл суміші гексан:тетрахлорметан (1:1). Знежирений супернатант очищають на імуноафінній колонці.

Зразки масла – у поліпропіленову пробірку, об’ємом 15 мл, зважують 1 г зразка, нагрівають у водяній бані до 40° С, знежирюють 1 мл гексану та екстрагують 1 мл 20 % метанолу. Екстрагування проводять на вортексі впродовж 10 хв. Фракції розділяють центрифугуванням упродовж 10 хв. за 2000 g та температури 4° С. За необхідності процедуру знежирення повторюють. Відбирають 1 мл супернатанту, розводять 4 мл 20 мМ фосфатного буферу, рН 7.4, та очищають на імуноафінній колонці.

Зразки згущеного молока з цукром – у поліпропіленову пробірку, об’ємом 15 мл, зважують 1 г зразка, додають 4 мл 20 мМ фосфатного буферу, рН 7.4, і екстрагують упродовж 10 хв. за перемішування на вортексі. Фракції розділяють центрифугуванням упродовж 10 хв. за 3000 g та температури 10° С. Відкидають шар жиру, супернатант очищають на імуноафінних колонках.

Зразки згущеного молока з цукром і какао – у поліпропіленову пробірку, об’ємом 15 мл, вносять 4 мл зразка і розводять у 6 мл високоочищеної води. Фракції розділяють центрифугуванням упродовж 10 хв. за 2000 g та температури 12° С. У чисту поліпропіленову пробірку відбирають 3 мл супернатанту додають 6 мл 10 % розчину метанолу і перемішують упродовж 40 хв. Екстрагування аналіту проводять 16 мл етилацетату за ретельного перемішування впродовж 40 хв. на вортексі. Розділення фаз проводять центрифугуванням упродовж 10 хв. за 3000 g та температури 10° С. Відбирають 12 мл супернатанту і висушують до сухого залишку, який відновлюють 5 мл 20 мМ фосфатного буферу, рН 7.4, і знежирюють 4 мл суміші гексан:тетрахлорметан (1:1). Після розділення фаз відбирають 5 мл верхньої водної фази для очистки на імуноафінних колонках.

Зразки згущеного карамелізованого молока (Іриска) – приготування зразків за методом, описаним для зразків згущеного молока з какао.

Очистка на імуноафінних колонках. Відповідний об’єм підготовленого екстракту зразка наносять на імуноафінну колонку за швидкості потоку приблизно 1 кр./с (3 мл/хв.) або під дією сили тяжіння. Після нанесення колонку промивають 10 мл високоочищеної води за швидкості потоку 5 мл/хв. Залишки води видаляють пропусканням повітря через колонку під тиском впродовж 10 с. Елюцію аналіту проводять у скляну пробірку за допомогою 1 мл метанолу зі швидкістю 1 кр./с. Отриманий елюат висушують до сухого залишку і відновлюють буфером для розведення зразків, наданим в тест-наборі для кількісного визначення хлорамфеніколу.

Навантаження зразків проводили на рівні 1 та 1/2 МНМВ, тобто 0.3 та 0.15 мкг/кг стандартним розчином ХАФ чистих (контрольних) зразків досліджуваних матриць, попередньо проаналізованих підтверджуючим методом РХ-МС/МС, і, у нашій роботі, зазначені як контрольні зразки. Після навантаження зразки ретельно перемішували на вортексі та залишали на 3-4 год за температури 4 °С.

Імуноферментний аналіз проводили згідно з інструкцією до тест-набору Хлорамфенікол, виробництва фірми Р-Біофарм (Німеччина) та Методичних вказівок (протокол № 1 від 23-24 грудня 2009 р.) [21].

Результати й обговорення. Починаючи з 2003 року, в лабораторії проводили аналізи зразків молока та молочної продукції на наявність залишкових кількостей хлорамфеніколу. На початкових етапах було запропоновано проводити дослідження зразків різних типів згущеного молока з цукром та твердих сирів методом РХ-МС/МС, як більш чутливим та специфічним. Пробопідготовка вказаних зразків включала часткове знежирення проби, екстрагування аналіту етилацетатом, попереднє концентрування шляхом висушування органічного екстракту, відновлення у водному розчині з подальшим двоступеневим знежиренням сумішшю гексан:тетрахлорметан. Для очистки та концентрування, попередньо підготованих зразків, використовували метод твердофазного екстрагування на колонках Bond Elute Plexa (30 mg, 3 ml). Отриманий елюат у метанолі додатково концентрували висушуванням до сухого залишку, відновлювали у 40 % розчині метанолу, знежирювали сумішшю гексан: тетрахлорметан. Розділення фаз проводили центрифугуванням.

У зв'язку зі значним збільшенням кількості рутинної роботи, постало питання оптимізації методу пробопідготовки зразків та можливості залучення імуноферментного аналізу до проведення вказаних досліджень. Цей метод майже не поступається за чутливістю методу РХ-МС/МС [22] та дозволяє проводити одночасний скринінг-аналіз великої кількості зразків у короткі терміни, не потребуючи при цьому багатоступеневої очистки при пробопідготовці. Однак, специфічність та селективність ІФА напряму залежить від здатності специфічних антитіл зв'язувати досліджуваний аналіт та можливого неспецифічного зв'язування антитіл з іншими компонентами матриці зразка.

За час проведення досліджень методом РХ-МС/МС було зібрано значну кількість чистих (контрольних) та забруднених ХАФ зразків, на базі яких було проведено розробку нових способів підготовки проб. Оскільки зразки карамелізованого згущеного молока з цукром репрезентують найбільш складну суміш різноманітних компонентів (молочні: жири, білки, цукри; кристалічний цукор, лактоза, аскорбінова кислота та стабілізатори), їх було вибрано для оцінки придатності методу очистки та концентрування аналіту з матриці для подальшого аналізу методом ІФА.

Для проведення підготовки зразків для аналізу, як базову, використано методику пробопідготовки для методу РХ/МС/МС: екстрагування аналіту етилацетатом із наступним концентруванням шляхом висушування у ротаційному випарювачі. На жаль, етилацетат, як екстрагент, сприяє високому відсотку витягу не тільки вказаного аналіту, але й інших баластних компонентів матриці, що призводить до неспецифічного зв'язування антитілами набору і, відповідно, отримання неправдиво-позитивних результатів. Тому для очистки отриманих екстрактів використано два способи: твердофазне екстрагування на колонках Bond Elute Plexa та імуноафінних колонках Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column. Оскільки для проведення очистки як ТФЕ, так і ІАК, зразки необхідно перевести у водно-сольовий розчин з нейтральним значенням pH, то сухий залишок зразка відновлювали у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7.4. Після повного розчинення залишку буферним розчином, проводили знежирення екстракту сумішшю гексан:тетрахлорметан (1:1).

Результати порівняння ефективності очистки та концентрування екстрактів імуноафінними колонками Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column та на колонках Bond Elut Plexa представлені в таблиці 1.

Як випливає з представлених даних, використання імуноафінних колонок дозволило значно очистити отримані екстракти вареного згущеного молока «Іриска» , а саме: від 3 (Варене згущене молоко "Іриска" зразок 2: 0,09 і 0,029 мкг/кг) до 16 (Варене згущене молоко "Іриска" зразок 4: 0,726 до 0,045 мкг/кг) разів. За дослідження контрольного зразка, навантаженого розчином стандарту ХАФ на рівні ½ МНМВ та очищеного методом ТФЕ

відсоток витягу становив лише 32 %, тоді як за використання очистки ІАК – 64 %. Це вказує на те, що використання ІАК дозволяє очистити екстракти складної матриці, специфічно зв'язуючи аналіт та видаляючи всі вторинні компоненти екстракту в процесі промивання водою. Отриманий чистий елюат в метанолі майже не містив жодних забруднювачів, які могли б мати негативний вплив на подальші імунні дослідження.

Таблиця 1

Порівняння методів очистки зразків вареного згущеного молока на колонках Bond Elut Plexa та імуноафінних колонках Rida® Chloramphenicol column, проаналізованих методом імуноферментного аналізу

Назва зразків	Комерційні назви картриджів для ІАФ та ТФЕ	Кількість хлорамфеніколу (мкг/кг)
Варене згущене молоко "Іриска" зразок 1	Bond Elut Plexa,	0,421
	Rida® Chloramphenicol column	0,045
Варене згущене молоко "Іриска" зразок 2	Bond Elut Plexa,	0,090
	Rida® Chloramphenicol column	0,029
Варене згущене молоко "Іриска" зразок 3	Bond Elut Plexa	0,512
	Rida® Chloramphenicol column	0,049
Варене згущене молоко "Іриска" зразок 4	Bond Elut Plexa	0,726
	Rida® Chloramphenicol column	0,045
Варене згущене молоко "Іриска" контроль	Bond Elut Plexa	0,210
	Rida® Chloramphenicol column	0,071
Варене згущене молоко "Іриска" контроль навантажений ½ МНМВ	Bond Elut Plexa	0,258
	Rida® Chloramphenicol column	0,167

За аналогічними принципами було проведено пробопідготовку згущеного молока із цукром і какао, а для зразків твердого сиру та масла – внесено деякі зміни (табл. 2).

Таблиця 2

Оцінка точності та придатності використання очистки на імуноафінних колонках Easi-Extract Chloramphenicol при підготовці зразків продуктів харчування

Зразки	Середня концентрація аналіту (мкг/кг)				Довірчий інтервал проценту повернення
	Контрольні зразки		Навантажені на рівні 0,3 мкг/кг		
	$X_{сер} \pm SD$	RSD	$X_{сер} \pm SD$	RSD	
Сир твердий	0,037 ± 0,007	9,74	0,16 ± 0,02	12,2	37,2 – 47,3
Масло	0,103 ± 0,012	11,8	0,295 ± 0,043	14,6	53,7 – 73,7
Згущене молоко з цукром	0,04 ± 0,011	27,4	0,275 ± 0,034	12,4	68,1 – 88,2
Згущене молоко з цукром і какао	0,048 ± 0,023	48,4	0,213 ± 0,057	26,5	46,9 – 63,5
Згущене молоко з цукром варене «Іриска»	0,019 ± 0,0037	19,67	0,315 ± 0,053	19,7	86 – 111,1

Оскільки твердий сир – це не тільки концентрат молочних білків та жиру, але й рослинних жирів та синтетичних барвників, то для покращеного екстрагування аналіту використано покрокове екстрагування етилацетатом із подальшим об'єднанням органічної фази, концентруванням шляхом висушування на ротаційному випарювачі та відновлення сухого залишку у 0,020 М фосфатному буфері з pH 7,4 та подальшою очисткою на імуноафінних колонках Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column.

Для підготовки зразків масла та спреду, як базову, використано методику, запропоновану в інструкції до тест-набору Хлорамфенікол фірми Р-Біофарм та Методичних вказівках [21]. Розділення жирової та сироваточної фракцій, проводили розігріваючи зразки у водяній бані за температури 40 °С. Знежирювали зразки масла та спреду гексаном, екстракцію досліджуваного аналіту проводили 20 % розчином метанолу. Після розділення фаз, для

зниження відсотка метанолу у екстракті та проведення очистки на ІАК, водну частину фракції розводили у п’ять раз фосфатним буфером.

Зразки згущеного молока з цукром, без попереднього екстрагування органічними розчинниками, розводили тільки 20 мМ фосфатним буфером та знежирювали за центрифугування за низьких температур.

Результати оцінки точності та придатності описаних вище методик пробопідготовки для проведення імуноферментного аналізу з використанням етапу очистки і концентрування імуноферментними колонками Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column представлені в таблиці 2.

Для кожної представленої матриці було проаналізовано 10 чистих (контрольних) зразків та навантажених розчином стандартного зразка ХАФ на рівні МНМВ (цільової концентрації скринінгу).

Як видно з отриманих даних, для всіх запропонованих методик пробопідготовки та кількісного визначення залишків ХАФ було отримано достатньо низькі рівні матричного впливу: 0,037, 0,103, 0,04, 0,048, 0,019 мкг/кг для зразків твердого сиру, масла, згущеного молока з цукром, згущеного молока з цукром і какао, згущеного молока з цукром вареного, відповідно. Відсоток витягу для зразків різних типів згущеного молока з цукром знаходився в діапазоні від 47 до 111 %. Найвищий відсоток витягу спостерігали для зразків згущеного молока з цукром та какао – від 47 до 64 %. Для зразків масла відсоток витягу становив від 54 до 74 %, а для твердого сиру – від 37 до 47 %. Це дає підставу стверджувати, що метод очистки та концентрування з використанням ІАК дозволяє значно зменшити матричний вплив на систему ІФА, не зважаючи на склад зразка, зводячи практично до мінімуму неспецифічну адсорбцію компонентів матриці за проведення імунних досліджень аналіту.

Підсумовуючи представлені результати, можна запропонувати використання імуноафінних колонок Easi-Extract Chloramphenicol для очистки та концентрування аналіту не тільки для зразків темного меду, маточного молочка та морепродуктів (згідно з інструкцією виробника), але й з інших складних матриць (масла, згущеного молока з цукром, вареного згущеного молока, згущеного молока з какао) навіть за умови подальшого дослідження вказаних зразків скринінг-методом ІФА. При цьому зберігається достатній рівень прецизійності методики та відсоток витягу, що узгоджується з вимогами Рішення 2002/ 657/ ЕС [3].

В И С Н О В К И

1. Використання імуноафінних колонок Easi-Extract Chloramphenicol immunoaffinity column фірми R-Biopharm Rhone Ltd (Німеччина) у пробопідготовці зразків продуктів харчування зі складними матрицями дозволяє проводити скринінг-визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу імуноферментним аналізом тест-системами Chloramphenicol фірми R-Biopharm (Німеччина).

2. Отримані результати оцінки точності та правильності запропонованої методики з подальшим проведенням скринінг-визначення дозволяють на належному рівні проводити контроль безпечності продуктів харчування зі складними матрицями, такими як твердий сир, масло, спред, різних типів згущеного молока з цукром.

Перспективи досліджень. Використання запропонованої методики очистки та концентрування зразків на імуноафінних колонках для дослідження інших зразків продуктів харчування.

USE OF IMMUNOAFFINITY COLUMNS CLEANUP FOR CHLORAMPHENICOL SCREENING ASSAY IN FOOD SAMPLES

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

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

This paper presents the features of analysis of food of animal origin after technological processing (samples of cheese, condensed milk with sugar, condensed milk with sugar and cocoa, condensed milk caramel with sugar, butter) for determination of antibiotic residues using the methods of screening assay (ELISA). The data concerning chloramphenicol residues in the samples for the period of 2014-2016 are presented. The effectiveness of immunoaffinity columns manufactured by R-Biopharm (Germany) for dark types of honey analysis in the preparation of these samples was examined. The percentage of analyte return from model samples amounted 42 – 98 %. The results were compared with the criteria established in Decision 2002/657 / EC.

Keywords: CHLORAMPHENICOL, IMMUNOAFFINITY COLUMNS, ELISA, FOOD SAMPLES.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОАФИННЫХ КОЛОНОК В ПОДГОТОВКЕ ОБРАЗЦОВ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ СКРИНИНГ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

Д. Янович, З. Засадна, М. Ридчук, С. Кислова, О. Паздерська, Н. Майба, М. Шимко

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 приведены особенности анализа образцов продуктов животного происхождения после глубокой технологической обработки (твердый сыр, сгущенное молоко с сахаром, сгущенное с сахаром и какао, вареное сгущенное с сахаром и масло) для определения остаточных количеств антибиотиков с использованием методов скрининг-анализа (ИФА). Приведены результаты по содержанию остаточных количеств хлорамфеникола в образцах за период 2014-2016 гг. Рассмотрен вопрос эффективности использования при подготовке образцов иммуноафинных колонок фирмы Р-Биофарм (Германия), предназначенных для анализа темных сортов меда. Процент возврата аналита в модельных вышеперечисленных образцах составляет от 42 до 98 %. Полученные результаты сравнивали с критериями, согласно с Решением 2002/657/ЕС.

Ключевые слова: ХЛОРАМФЕНИКОЛ, ИММУНОАФИННЫЕ КОЛОНКИ, ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Commission Regulation (EC) No 508/1999 of 4 March 1999 amending Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.

2. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing, p 10.

3. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, p 8.

4. *Posyniak A.* Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography / A. Posyniak, J. Zmudzki, J. Niedzielska // Analytica Chimica Acta. – 2003. – V. 483 – P. 307–311.

5. *Rejtharova M.* Determination of chloramphenicol in urine, feed water, milk and honey samples using molecular imprinted polymer clean-up / M. Rejtharova, L. Rejthar // J. of Chromatography A. – 2009. – V. 1216. – P. 8246–8253.

6. *Śniegocki T.* Determination of chloramphenicol residues in milk by Gas and Liquid Chromatography Mass Spectromerty Methods / T. Śniegocki, A. Posyniak, J. Żmudzki // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2007. – V. 51. – P. 59–64.

7. *Zawadzka I.* Determination of chloramphenicol in milk powder using liquid-liquid cartridge extraction (Chem Elut) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / I. Zawadzka, L. Rodziewicz // Rocz. Panstw. Zakl. Hig. – 2014. – 65 (3). – P. 185–191.

8. *Mackie J.* Immunoaffinity Column Cleanup with LC/MS/MS for the Determination of Chloramphenicol in Honey and Prawns / J. Mackie, E. Marley,1, C. Donnelly // J. of AOAC International. – 2013. – V. 96, (4). – P. 910–916.

9. *Rodziewicz L.* Rapid Determination of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and the Validation of Method Based on 2002/657/EC / L. Rodziewicz, I. Zawadzka // APIACTA. – 2007. – V. 42. – P. 25–30.

10. *Yibar A.* 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 / A. Yibar, F. Cetinkaya, G. E. Soyutemiz // Poultry Science. – 2011. – V. 90. – P. 2619–2626.

11. *Ashwin H. M.* Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / H. M. Ashwin, S. L. Stead, J. C. Taylor et al. // Analytica Chimica Acta. – 2005. – V. 529. – P. 103–108.

12. *Cronly M.* Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry / M. Cronly, P. Behan, B. Foley et al. // Food Additives and Contaminants. – 2010. – V. 27, (09). – P. 1233–1246.

13. *Wang Qing.* Determination of chloramphenicol and zeranols in pig muscle by immunoaffinity column clean-up and LC-MS/MS analysis / Qing Wang, Hua Zhao, Cunxian Xi et al. // Food Additives & Contaminants, Part A – 2014. – V. 31, (7). – P. 1177–1186.

14. *Barretoab F.* Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive / F. Barretoab, C. Ribeiroa, R. Barcellos Hoffac et al. // Food Additives and Contaminants. – 2012. – V. 29, (4). – P. 550–558.

15. *Rezende D. R.* Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in liquid milk, milk powder and bovine muscle by LC–MS/MS / D. R. Rezende, N. Fleury Filho, G. L. Rocha // Food Additives and Contaminants. – 2012. – Vol. 29, (4). – P. 559–570.

16. *Taka Tsuyoshi.* Validation of a rapid and sensitive routine method for determination of chloramphenicol in honey / Tsuyoshi Taka, Marina C. Baras, Zahra F. et al. // Food Additives and Contaminants. – 2012. – V. 29, (4). – P. 596–601.

17. *Xu Hong.* Rapid detection of chloramphenicol in animal products without clean-up using LC–high resolution mass spectrometry / Hong Xu, Jun Zhang, Jia He et al. // Food Additives and Contaminants. – 2011. – V. 28, (10). – P. 1364–1371.

18. *Bilandžić N.* Control of chloramphenicol in samples of meat, meat products and fish / Bilandžić N., Varenina I., Solomun Kolanović B. // J. Meso. – 2011. – V. XIII – P. 192–196.

19. *Li T. L.* Determination and Confirmation of Chloramphenicol Residues in Swine Muscle and Liver / T. L. Li, Y. J. Chung-Wang, Y. C. Shih // J. of Food Science. – 2001. – V. 67, (1). – P. 21–28.

20. *Янович Д. В.* Застосування імуноафінної хроматографії при аналізу продуктів харчування / Д. В. Янович, З. С. Засадна, С. М. Кіслова та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок і ІБТ. – 2016. – В. 17, № 1. – С. 319–328.

21. *Янович Д. В.* Методичні вказівки по кількісному визначенню хлорамфеніколу у зразках м’яса, молока, яєць та меду тест-системою Рідаскрин®Хлорамфенікол / Д. В. Янович, З. С. Засадна // ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. Вид-во ДНДКІ. – 2009. – 12 с.

22. *Янович Д. В.* Визначення залишків хлорамфеніколу в продуктах тваринництва із застосуванням методів скринінгу та підтвердження / Д. В. Янович, З. С. Засадна, М. В. Ридчук та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок і ІБТ. – 2015. – В. 16, № 1. – С. 186–191.

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