

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ТЕТРАЦИКЛІНІВ У ПРОДУКТАХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Н. В. Лінійчук

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Державний науково-дослідний інституту з лабораторної діагностики
та ветеринарно-санітарної експертизи

У статті наведено дані щодо розробки методики визначення залишкової кількості препаратів групи тетрациклінів у продуктах тваринного походження методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та методом рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС). Проведено порівняльний аналіз методик різних лабораторій з використанням РХ/МС/МС. Перевірено ефективність методики визначення препаратів групи тетрациклінів у продуктах тваринного походження на прикладі тестового матеріалу FAPAS, який досліджували на наявність залишкової кількості препаратів групи тетрациклінів, таких як тетрациклін, окситетрациклін, хлортетрациклін, доксициклін.

Ключові слова: АНТИБІОТИКИ, ТЕТРАЦИКЛІНИ, ЗАЛИШКОВА КІЛЬКІСТЬ, ТЕТРАЦИКЛІН, ОКСИТЕТРАЦИКЛІН, ХЛОРЕТЕТРАЦИКЛІН, ДОКСИЦИКЛІН, ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО ДЕТЕКТОРА

Присутність залишкової кількості антибіотиків у продуктах харчування є потенційну небезпечним, оскільки їх вживання з їжею може викликати алергічні реакції, нудоту, анафілактичний шок, пригнічення активності певних груп ферментів, появу дисбактеріозу, резистентності до антибіотиків [1–3].

Тетрацикліни — антибіотики широкого спектру, вони є остеотропними, і тому накопичуються в кістковій тканині, особливо молодій, проліферуючій [4].

У Європейському Союзі на наявність препаратів групи тетрациклінів досліджують яловичину, свинину, баранину, конину, птицю, рибу, молоко, яйця, кролятину, мед. Позитивні результати виявлення тетрациклінів у продукції тваринництва було отримано в таких країнах, як Франція, Італія, Голландія, Німеччина, Австрія, Бельгія, Данія, Іспанія, Ірландія, Греція, Фінляндія, Польща, Словаччина, Кіпр, Угорщина, Англія, Естонія та Румунія [5].

В Україні щорічно, починаючи з 2000 року, розробляється, впроваджується та виконується План Державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у необроблених харчових продуктах тваринного походження і кормах. При цьому антибіотики почали досліджувати з 2004 року. В Україні з 2011 рік обов'язковим є визначення антибіотиків групи тетрациклінів (тетрациклін, хлортетрациклін, окситетрациклін, доксициклін), що передбачено Директивою Ради 96/23/ЕС [6, 7]. У країнах Європейського Союзу допустимий вміст залишкових кількостей препаратів групи тетрациклінів у продуктах тваринного походження регламентовано максимально допустимими рівнями (МДР). Згідно з постановою ЄС 2377/90, яка визначає порядок встановлення МДР для залишкових кількостей ветеринарних препаратів, рівень залишків тетрациклінів у м'язах, молоці (окрім доксицикліну) — 100 мкг/кг, печінці — 300 мкг/кг, нирках — 600 мкг/кг, яйцях (окрім доксицикліну) — 200 мкг/кг. Ці рівні встановлюють відповідно вимоги до чутливості методів контролю препаратів групи тетрациклінів у продуктах тваринного походження [8].

Метою роботи була розробка методики РХ/МС/МС з визначення препаратів групи тетрациклінів і порівняння її до інших методик.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). Матеріалом для дослідження були продукти тваринного походження — сухе молоко, незбиране молоко, м'язи риби. Для дослідження використовувалися методики ДНДІЛДВСЕ методом ВЕРХ і РХ/МС/МС та методики Данії (Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Danish Veterinary and Food Administration) і Нідерландів (Laboratory Region East, Wageningen) [9, 10]; сертифіковані стандарти тетрацикліну, хлортетрацикліну, окситетрацикліну, доксицикліну, тестовий матеріал FAPAS.

З метою оцінки збіжності результатів проводили по 5 паралельних досліджень кожного зразка. Отримані дані обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми M.Exel 2000.

Результати й обговорення

Згідно Плану Державного моніторингу, на препарати групи тетрациклінів досліджуються мед, яйця, молоко, риба, гусяча печінка, м'язи птиці, свинина, яловичина. Відповідно до Плану моніторингу, тетрацикліни з 2007 року досліджували радіоімунним методом (2007–2008 рр.), а потім — методом імуноферментного аналізу (починаючи з 2009 року). При цьому, якщо порівнювати щорічні дослідження на препарати групи тетрациклінів, то кількість досліджуваних проб, як правило, зростала (табл. 1). За останні роки позитивні результати щодо наявності тетрациклінів були отримані під час дослідження меду.

Таблиця 1

Запланована кількість досліджень на препарати групи тетрациклінів за 2007–2010 роки

Назва матриці	Запланована кількість досліджень по роках			
	2007	2008	2009	2010
Мед	82	85	100	120
Яйця	262	139	140	145
Молоко	93	246	246	250
Риба	103	103	127	139
Гусяча печінка	—	33	35	35
М'язи птиці	100	33	35	40
Свинина	324	340	446	450
Яловичина	405	426	341	399
Конина	—	50	—	—

Методика визначення тетрациклінів у продуктах тваринного походження методом ВЕРХ розроблена з метою проведення моніторингу наявності у продуктах чотирьох антибіотиків: тетрацикліну, хлортетрацикліну, окситетрацикліну, доксицикліну. Принцип цієї методики полягає в тому, що тетрацикліни екстрагують з тканин три хлороцтовою кислотою. Екстракт фільтрують і очищують за допомогою твердофазних колонок С-18. Розділення проводять за допомогою рідинної хроматографії, використовуючи колонку С-8 і ультрафіолетовий детектор.

Сьогодні з метою підтвердження позитивних результатів і дослідження імпортованої та експортованої продукції застосовують метод рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС), який є точнішим і чутливішим, ніж ВЕРХ.

Принцип методу: білки молока осаджують та екстрагують за допомогою трихлороцтової кислоти, екстракт центрифугують, очищують та аналізується за допомогою РХ/МС/МС.

Методика має такі етапи дослідження:

- осадження білків;
- екстракція;
- очищення екстракту шляхом фільтрування;
- ідентифікація та кількісне визначення методом РХ/МС/МС;
- калібрування та обчислення.

Зразки ідентифікують за іонами і часом виходу речовин і обраховують за допомогою калібрувальної кривої.

Іони, за якими ідентифікують:

- тетрациклін — 445.2 > 410.1, 445.2 > 427;
- хлортетрациклін — 478.8 > 444.1, 478.8 > 462.0;
- окситетрациклін — 461.2 > 426.1, 461.2 > 443.2;
- доксидоксиклінін — 445.1 > 462.1, 445.1 > 428.1.

Порівняння розробленої нами української методики з методиками таких країн, як Данія (Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Danish Veterinary and Food Administration) і Нідерланди (Laboratory Region East, Wageningen), дає підстави зробити висновок, що кожна з них має такі основні етапи пробопідготовки: осадження білків та екстракція, змішування і центрифугування (табл. 2). Інші етапи підготовки зразка мають відмінності, а саме: в методиці ДНДІЛДВСЕ (для молока) використовується фільтрування через шприцевий фільтр (обов'язковий етап), а в методиці Данії і Нідерландів застосовується твердофазна екстракція, випарювання і, відповідно, перерозчинення.

Таблиця 2

Основні етапи пробопідготовки для визначення препаратів групи тетрациклінів у молоці

Основні етапи пробопідготовки	Методика ДНДІЛДВСЕ	Методика Данії	Методика Нідерландів
Осадження білків та екстракція	+	+	+
Твердофазна екстракція	+	+	—
Випарювання	+	+	—
Перерозчинення	+	+	—
Фільтрування	—	—	+

Примітка: «+» — етап використовується в підготовці зразка; «—» — етап не використовується.

Крім того, нами були удосконалені основні етапи пробопідготовки для визначення препаратів групи тетрациклінів у молоці, яка має 5 етапів; методика Данії — 8, Голландії — 9. В якості рухомої фази використовується 0,1 % розчин мурашиної кислоти у воді і 0,1 % розчин мурашиної кислоти в метанолі (Данія) чи ацетонітрилі (ДНДІЛДВСЕ і Нідерланди). Спільним для кожної з цих методик є те, що вони мають градієнтний режим елюювання і включають в себе здатність визначати, окрім препаратів групи тетрациклінів, й інші антибіотики та антибактеріальні препарати, такі, як сульфаніламід, препарати пеніцилінового ряду, кінолони, макроліди, амфеніколи. При цьому чутливість усіх методик не суперечить вимогам Європейського Союзу, оскільки чутливість методик, які аналізувалися, не перевищує 100 мкг/кг у продукті [11].

З метою перевірки ефективності даної методики для визначення препаратів групи тетрациклінів ми брали участь у міжнародному професійному тестуванні FAPAS, учасниками якого були 43 країни. Тестовим матеріалом були заморожені м'язи риби, які досліджували на тетрациклін, окситетрациклін, хлортетрациклін, доксициклін.

Безпосередньо перед дослідженням зразка було побудовано калібрувальну криву для кожного з наведених вище препаратів за допомогою фортифікованих зразків, в яких було додано відомі концентрації тетрациклінів. Перевірку придатності умов підготовки тестового матеріалу до аналізу тетрациклінів проводили за критерієм «додано—одержано» шляхом додаванням до м'язів риби розчину тетрациклінів та проведення аналізу на приладі у поєднанні зі стандартним розчином з концентрацією 1000 нг/мл. Результати дослідження тестового матеріалу наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати дослідження тестового матеріалу FAPAS

Назва речовини	Отримана концентрація	Концентрація стандартного розчину (1000 нг/мл)	Концентрація проби з добавкою (100 нг/мл)
Окситетрациклін	210,405±25,899	1115,164	110,227
Тетрациклін	19,155±7,973	1000,808	108,277
Хлортетрациклін	32,669±5,177	1039,287	125,215
Доксициклін	36,7796±13,933	948,450	103,048

Дані, наведені в таблиці 3, свідчать про те, що тестовий матеріал містив завищену кількість окситетрацикліну (210,405±25,899нг/мл). Результати тестування підтвердили, що отриманий нами результат є задовільним, оскільки приписне значення для тестового матеріалу становить 304 мкг/кг з ймовірним відхиленням від 188 мкг/кг до 421 мкг/кг.

Висновки

1. Розроблена в ДНДІЛДВСЕ методика виявлення препаратів групи тетрациклінів у продуктовому харчуванні відповідає за чутливістю вимогам ЄС, є зручною та досить простою у використанні.

2. Проаналізовані методики виявлення препаратів групи тетрациклінів за чутливістю практично не відрізняються, удосконалена нами методика, значно здешевлює дослідження.

Перспективи подальших досліджень. Розроблена методика може використовуватися для дослідження продуктів тваринного походження. Вона надасть можливість проводити дослідження і виявляти залишкову кількість препаратів групи тетрациклінів іншим лабораторіям України, що сприятиме якіснішому контролю безпечності продукції тваринництва.

N. V. Liniichuk

DEFINITION RESIDUE OF TETRACYCLINES IN PRODUCTS OF THE ANIMAL ORIGIN

S u m m a r y

In the article presents the method of high performance liquid chromatography (HPLC) and the method of liquid chromatography with mas-spectrometer detector (LC/MS/MS) has been developed for detection of residues tetracycline in products of the animal origin. It was checked by the comparative analysis of methods of different laboratories. The of efficiency of this method was verified by definition tetracyclines in products of the animal origin on the example of test material

of FAPAS, which was probed in the presence of remaining amount of preparations by the group of tetracyclines such as tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, doxycycline.

Н. В. Линийчук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А н н о т а ц и я

В статье наведены данные разработки методики определения остаточных количеств препаратов группы тетрациклинов в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЕЖХ) и методом жидкостной хроматографии с использованием мас-спектрометрического детектора (ЖХ/МС/МС). Проведено сравнительный анализ методик разных лабораторий с использованием ЖХ/МС/МС. Проверено эффективность методики определения препаратов группы тетрациклинов в продуктах животного происхождения на примере тестового материала FAPAS, который исследовали на наличие остаточных количеств препаратов группы тетрациклинов, таких как тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин.

1. Эндрю Четли. Проблемы лекарства. Антибиотики. Кризис с антибиотиками. <http://www.antibiotic.ru/books/pd/10.shtml>

2. Косенко М. Проблема антибіотикорезистентності у ветеринарній медицині / М. Косенко, В. Музика, О. Чайковська, Т. Стецько // Ветеринарна медицина України. — 2005. — № 1. — С. 38–39.

3. Гуфрій Д. Використання антибіотиків у тваринництві — порятунок чи поява нової проблеми при прогресуючому зростанні опірності мікроорганізмів проти них / Д. Гуфрій // Ветеринарна медицина України. — 2000. — № 8. — С. 20–22.

4. Постников С. С. Токсические эффекты антибиотиков / С. С. Постников. — Москва, 2006. — 115 с.

5. Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2007 (Council Directive 96/23/EC). — Brussels, 2008. — 285 p.

6. Council Directive 96/23/EC// Official journal of the European Commission. — 1996. — L 125. — 26 p.

7. Новожицька Ю. Проблеми та шляхи виконання національних планів моніторингу / Ю. Новожицька // Ветеринарна медицина України. — 2008. — № 1. — С. 6–8.

8. Council Regulation № 2277/90// Official journal of the European Commission. — 1990. — L 224. — 112 p.

9. Stolker A. A. M. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF–MS / A. A. M. Stolker, P. Rutgers, E. Osterink et al. // Anal Bioanal Chem. — 2008. — 391. — P. 2309–2322.

10. Gitte Geertsen. Determination of antidiotics and chemotheraperutics in milk by LC-MS/MS, Replaces ANA-03.1152.01 of 15/05/2009, Denmark, 2009.

11. Commission Regulation (EU) № 37/2010 // Official journal of the European Commission. — 2010. — L 15. — 72 p.

Рецензент: завідувач кафедри фармакології і токсикології НУБіПУ, доктор ветеринарних наук, професор Духницький В. П.

Рецензент: завідувач лабораторії обміну речовин, кандидат біологічних наук, с. н. с. Салига Ю. Т.