

ВЕТСАНЕКСПЕРТИЗА, ЯКІСТЬ ТА БЕЗПЕКА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

УДК 543.05:638.14.06

ГРИБОВА Н. Ю., канд. хім. наук

БІЩУК Е. В., лікар вет. медицини

УШКАЛОВ В. О., д-р вет. наук, чл.-кор. НААН

ПАЗУЩАН Т. С., лікар вет. медицини

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ АНТИБІОТИКІВ В ПРОДУКЦІЇ БДЖІЛЬНИЦТВА

Вивчено особливості визначення вмісту хлорамфеніколу (левоміцетину) та тетрацикліну в бджолиному меді методом імуноферментного аналізу (ІФА). Встановлено особливості підготовки до вимірювання проб зразків меду різних за консистенцією і кольором. Складено робочі інструкції на проведення вимірювань залишкових кількостей хлорамфеніколу та тетрацикліну в меді. Для визначення антибіотиків в зразках бджолиного меду застосовано метод ІФА, виявлено зразки меду, забруднені тетрацикліном.

Ключові слова: хлорамфенікол, тетрациклін, імуноферментний аналіз, високоефективна рідинна хроматографія, бджолиний мед.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. На сьогодні використання антибіотиків для лікування та профілактики захворювань бджіл в Україні дозволено [1], наразі до Переліку входить 16 сертифікованих препаратів, проте використовується більший перелік антибіотиків, які можна виявити лише в експортних партіях меду. Препарати хлорамфеніколу (левоміцетину) та тетрацикліну належать до антибіотиків широкого спектра дії [2–3]. Тетрациклін зазвичай застосовується у ветеринарії за лікування багатьох бактеріальних інфекцій органів травлення, органів дихання і шкіри, використовується як стимулятор росту тварин, тому в деяких країнах його використовують як кормову добавку. Застосування тетрацикліну як стимулятора росту в Європейському Союзі (ЄС) заборонено. Тетрацикліни не зареєстровані в ЄС для лікування бджіл, тому немає ніяких встановлених рівнів залишків для цього типу антибіотика в меді. На сьогодні окситетрациклін – це єдиний антибіотик, який зареєстрований для використання в Канаді для лікування бджіл. Застосування тетрацикліну призводить до накопичення його залишків в продуктах харчування. Споживання людиною таких продуктів призводить до пригнічення мікрофлори кишківнику, розвитку дисбактеріозу, появи вторинних грибкових інфекцій, проявів алергічного характеру, зміни слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, зниження опірності організму, підвищення стійкості патогенних мікроорганізмів. Особливо чутливі до препаратів тетрациклінової групи вагітні жінки, діти раннього віку, люди, які страждають на хвороби печінки й нирок. Наявність тетрацикліну в меді, що реалізується в Україні, не допускається [4].

Хлорамфенікол діє на різні патогени, які уражують як людей, так і тварин. Це один з найбільш токсичних антибіотиків, який має гемотоксичні властивості і може спричинювати аплазію кісткового мозку (втрата можливості до кровотворення), внаслідок цього виникає апластична анемія, що супроводжується швидким зниженням рівня гемоглобіну і еритроцитів у крові. У разі розвитку явищ апластичної анемії незрілі форми еритроцитів не виявляються не лише в крові, але й в пунктаті кісткового мозку. Хлорамфенікол заборонений до використання в ЄС, США та Японії. Вміст залишкових кількостей левоміцетину в українському меді нормується ДСТУ 4497:2005 і становить 0,3 мг/кг.

Враховуючи міжнародні вимоги, зокрема Регламенту ЄС 2377/90 щодо максимально допустимих рівнів залишкових кількостей ветеринарних лікарських засобів, в Україні заборонено застосовувати для бджіл наступні препарати: ізатизон (метисазон, диметилсульфоксид), апікон

(ністатин, окситетрациклін), ларвізол (норсульфазол, окситетрациклін), нозапідид (сульфадимезин), воротил (флювамізол) [5].

Згідно із Постановою Державного департаменту ветеринарної медицини та Наказом N 52 від 04.07.2003 максимально допустимі норми залишкових речовин встановлені відповідно до загально визначених методів оцінки безпечності і ґрунтуються на відмінностях ксенобіотиків.

Структурні формули хлорамфеніколу та тетрацикліну наведені на рисунку 1.

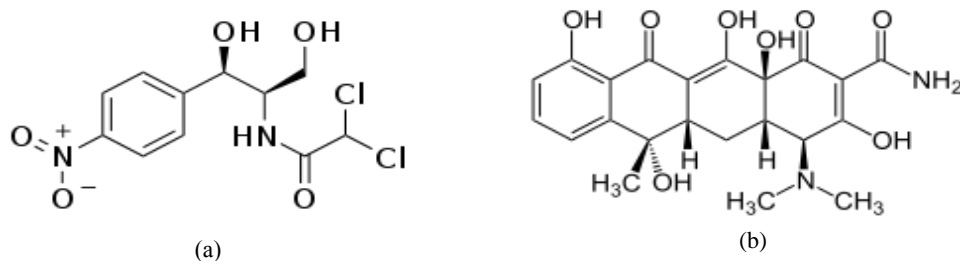


Рис. 1. Структурна формула хлорамфеніколу (а), тетрацикліну (b).

Наявність в молекулах цих антибіотиків систем зв'язаних подвійних зв'язків, що включають кетони і енольні групи, обумовлюють характерне поглинання в ультрафіолетовій області спектра, яке лежить в основі детектування як індивідуальних сполук та їх продуктів, в таких методах дослідження як рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектуванням та імуноферментний аналіз із спектрофотометричною реєстрацією екстинції розчину.

Мета роботи – дослідження особливостей лабораторного контролю антибіотиків в бджолиному меді методом імуноферментного аналізу.

Матеріал і методика дослідження. Робота виконана з використанням обладнання: вортекс «BIOSAN VI», термо-шейкер «SHAKER ST-3», вошер «BIOTEK ELx-800», рідер «BIOTEK ELx-800», тест-системи, назви яких зашифровані як А1 та А2, придбані у постачальника витратних матеріалів і реактивів для визначення антибіотиків методом імуноферментного аналізу. В роботі застосовано розчинники та реагенти кваліфікації «чда»: метанол, ацетонітрил. Дистильована вода відповідала показникам якості ДСТУ 6709-72, використана для приготування буферних розчинів для екстракції та зупинки реакцій, стандартні зразки хлорамфеніколу та тетрацикліну, із вмістом діючої речовини $\geq 98\%$, виробництва Sigma-Aldrich. Опрацювання методики проведено на різних за кольором та густиною зразках меду: темному, світлому, рідкому та густому.

Оскільки бджолиний мед має в'язку консистенцію, яка обумовлена природним складом хімічних речовин, перед підготовкою проб до лабораторного контролю антибіотиків, густі зразки меду були термостатовані за температури від 30 до 42 °С до отримання текучої структури та ретельно перемішані. Із лабораторних проб меду відібрано для дослідження у двох паралелях наважки по 0,50 г ($\pm 0,01$ г) у пластикові пробірки з кришками, що загвинчуються.

Аналіз антибіотиків методом ІФА ґрунтується на взаємодії антигенів з антитілами. Тест-системи, різних виробників, містять планшети із лунками, поверхні яких сенсibiliзовані антитілами специфічними до антибіотиків. Аналіз виконується таким чином: стандартні розчини відповідного антибіотика та досліджувані проби дозуються в лунки планшета, до них додають розчини, що містять кон'югат. Під час інкубації планшета в термо-шейкері молекули антибіотиків, що містяться в пробах або стандартних розчинах, і молекули кон'югата, конкуруючи між собою, зв'язуються з антитілами антибіотика на поверхні лунок планшета. Через певний проміжок часу планшет поміщають у прилад, в якому з лунок видаляються вільні молекули кон'югата. Потім в лунки додають комбінований розчин субстрату з хромогеном. У процесі інкубації за хімічної взаємодії субстрату з хромогеном, у якому ферментний фрагмент молекули кон'югата, зв'язаний на поверхні лунок, виступає як каталізатор, утворюються забарвлені продукти реакції. Через визначений час розвитку кольорової реакції, у результаті якої безбарвний хромоген забарвлюється, у лунки додають стопреагент, який змінює колір розчину. Екстинцію розчинів, що утворилися у лунках, вимірюють на спектрофотометрі (рідері) за 450 нм, її значення обернено пропорційне концентрації антибіотика в досліджуваних пробах. На рисунках 2, 3 наведено калібрувальні залежності визначення антибіотиків у меді.

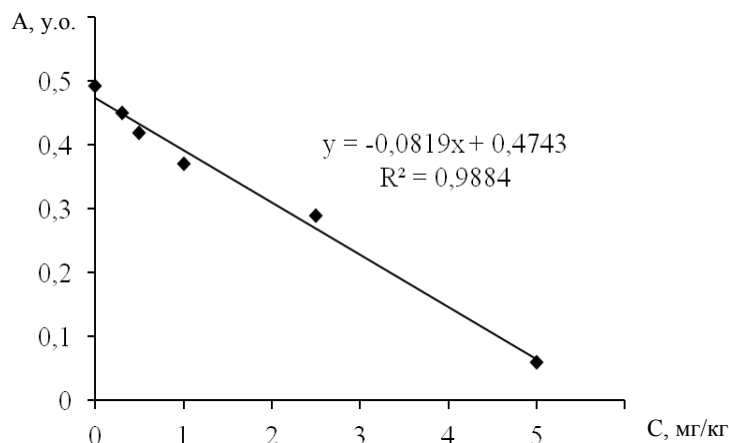


Рис. 2. Калібрувальна залежність екстинції розчинів від концентрації хлорамфеніколу, отриманих на тест-системах А1.

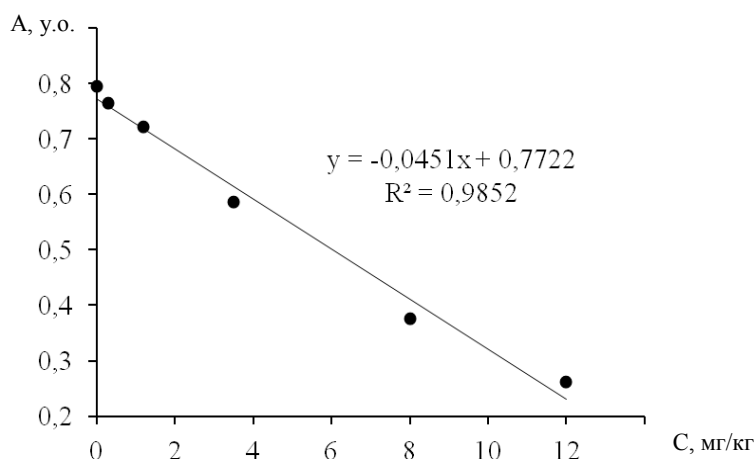


Рис. 3. Калібрувальна залежність екстинції розчинів від концентрації тетрацикліну, отриманих на тест-системах А2.

Основні результати дослідження. Встановлено, що лінійна залежність величини аналітичного сигналу від концентрації хлорамфеніколу знаходиться в діапазоні концентрацій 0,25–5,0 мг в 1 кг меду. Лінійна залежність вимірюваної екстинції в дослідженнях із тетрацикліном встановлена в діапазоні від 0,25 до 12,0 мг/кг. Межа кількісного визначення тетрацикліну та хлорамфеніколу методом ІФА з використанням тест-систем А1 та А2 становить 0,25 мг/кг.

За результатами аналізу шести зразків меду, придбаних на базарі, методом ІФА встановлено, що зразок № 1 (темний, густий мед) містить тетрациклін у кількості $6,1 \pm 0,5$ мг/кг, зразок № 3 (світлий, рідкий мед) також не відповідає вимогам ДСТУ 4497:2005 і містить тетрациклін у кількості $1,4 \pm 0,3$ мг/кг.

За проведення серії досліджень з виявлення антибіотиків методом ІФА було встановлено, що цей метод є чутливим до показників мікроклімату. В серії паралельних випробувань встановлено, що на величину екстинції впливає час і температура інкубації планшету. Для контролю якості випробувань в дослідженнях необхідно готувати і використовувати наважку, приготувану із зразка, в яку вноситься відома кількість антибіотика. Для уніфікації процесу приготування наважок мед потрібно термостатувати до отримання однорідної густої консистенції. Зразки меду, що різняться за кольором, не потребують додаткових процедур. Для зручності виконання лабораторного контролю складено робочі інструкції, які допомагають чітко і вчасно виконати кожен етап методики лабораторного контролю.

Висновок. Таким чином, в роботі встановлено оптимальні умови вимірювання вмісту антибіотиків в різних за кольором та густиною зразках бджолиного меду методом ІФА. Метод випробувано на шести різних зразках меду, придбаного на базарі. Виявлено зразки меду що не відповідали вимогам ДСТУ 4497:2005 і містили тетрациклін. Виявлення небезпечних зразків меду говорить про актуальність досліджень та необхідність контролю меду, що реалізується на внутрішньому ринку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гол. держ. інспектор ветмедицини; Наказ від 30.01.2001 № 9 «Про затвердження Інструкції щодо попередження та ліквідації хвороб і отруєнь бджіл». <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/z0131-01>.
2. Химическая энциклопедия / Под ред. И.Л. Кнунянца. – М.: Советская энциклопедия, 1988. – 623 с.
3. Isenberg S.J. The fall and rise of chloramphenicol / S.J. Isenberg // J. AAPOS. – 2003. – Vol. 7 (5). – P. 307.
4. ДСТУ 4497:2005. Мед натуральний. Технічні умови.
5. Наказ Департаменту вет. медицини №111 від 27.12.2006 року «Про тимчасову заборону застосування ветеринарних лікарських засобів для продуктивних тварин».
6. John Tann. Honey in Traditional and Modern Medicine // NSW Australia. – 2011. – 315 p.
7. Wang S. A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in honey / S. Wang, J. Liu, W. Yong // Talanta. – Vol. 131.– С. – 2014. – P. 562–569.
8. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food / Ed.: Jian Wang, James D. MacNeil, Jack F. Kay. – Wiley: A John Wiley & Sons, 2012. – 347 p.
9. Бельтюкова С.В. Методы определения антибиотиков в пищевых продуктах (Обзор) / С.В. Бельтюкова, Е.О. Левенцова // Методы и объекты химического анализа. – 2013. – № 1. – С. 4–13.
10. Методичні вказівки по кількісному визначенню хлорамфеніколу в зразках м'яса, молока, яєць та меду тест-системою рідаскрін хлорамфенікол / Д.В. Янович, Ю.М. Косенко, А.О. Костюк, З.С. Засадна. – Львів, 2003. – № 15–14/320. – С. 17.

REFERENCES

1. Gol. derzh. inspektor vetmedycyny; Nakaz vid 30.01.2001 № 9 «Pro zatverdzhennja Instrukcii' shhodo poperedzhennja ta likvidacii' hvorob i otrujen' bdzhiil». <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/z0131-01>.
2. Himicheskaja jenciklopedija / Pod red. I.L. Knunjanca. – M.: Sovetskaja jenciklopedija, 1988. – 623 s.
3. Isenberg S.J. The fall and rise of chloramphenicol / S.J. Isenberg // J. AAPOS. – 2003. – Vol. 7 (5). – P. 307.
4. DSTU 4497:2005. Med natural'nyj. Tehnichni umovy.
5. Nakaz Departamentu vet. medycyny №111 vid 27.12.2006 roku «Pro tymchasovu zaboronu zastosuvannja veterynarnyh likars'kyh zasobiv dlja produktyvnyh tvaryn».
6. John Tann. Honey in Traditional and Modern Medicine // NSW Australia. – 2011. – 315 p.
7. Wang S. A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in honey / S. Wang, J. Liu, W. Yong // Talanta. – Vol. 131.– С. – 2014. – P. 562–569.
8. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food / Ed.: Jian Wang, James D. MacNeil, Jack F. Kay. – Wiley: A John Wiley & Sons, 2012. – 347 p.
9. Bel'tjukova S.V. Metody opredelenija antibiotikov v pishhevyh produktah (Obzor) / S.V. Bel'tjukova, E.O. Levencova // Metody i ob'ekty himicheskogo analiza. – 2013. – № 1. – S. 4–13.
10. Metodychni vkazivky po kil'kisnomu vyznachennju hloramfenikolu v zrazkah m'jasa, moloka, jajec' ta medu test-sistemoju ridaskrin hloramfenikol / D.V. Janovyč, Ju.M. Kosenko, A.O. Kostjuk, Z.S. Zasadna. – L'viv, 2003. – № 15–14/320. – S. 17.

Лабораторный контроль антибиотиков в продукции пчеловодства

Н. Ю. Грибова, Э. В. Бищук, В. О. Ушкалов, Т. С. Пазушан

Изучены особенности измерения содержания в пчелином меде хлорамфеникола (левомицетина) и тетрациклина методом иммуноферментного анализа (ИФА). Установлены особенности подготовки проб образцов меда, которые отличались по консистенции и цвету. Составлены рабочие инструкции на проведение измерений остаточных количеств хлорамфеникола и тетрациклина в меде. Для выявления антибиотиков в образцах пчелиного меда применен метод ИФА, выявлены образцы меда, содержащие тетрациклин.

Ключевые слова: хлорамфеникол, тетрациклин, иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, пчелиный мед.

Laboratory control antibiotics in keeping production

N. Gribova, E. Bischuk, V. Ushkalov, T. Pazuschan

Laboratory monitoring of residues of antibiotics in honey is a necessary step in the admission of these products into the consumer market. In Ukraine, allowed 16 certified antibiotic drugs, but beekeepers use more types of antibiotics drugs. Information of violations are usually exist in export shipments of honey. Preparations of chloramphenicol and tetracycline belong to the broad-spectrum antibiotics. Tetracycline is commonly used in veterinary medicine in the treatment of many bacterial infections of the digestive system, respiratory system and skin, used as animal growth promoters, so in some countries it is used as a feed additive. The use of tetracycline as growth promoters in the European Union (EU) is prohibited. Tetracycline does not have registration in the EU for the treatment of bees, so there is no established residue levels for this

type of antibiotics in honey. Oxytetracycline is currently the only antibiotic approved for use in Canada to treat bees. Chloramphenicol is banned for use in the EU, US and Japan. The content of residual amounts of Chloramphenicol in Ukrainian honey standardized and equal to 0.3 mg/kg. Significant export potential of Ukrainian honey can be implemented under the condition of constant laboratory testing of products, compliance with safety standards confirmation. Laboratory methods for monitoring honey bee safety performance must comply with the international requirements for specificity, sensitivity and duration of analyzes.

The paper studied the peculiarities of the measurement of chloramphenicol (chloramphenicol) and tetracycline by modern methods of enzyme immunoassay (EIA). As a result of research determined features of sampling of honey samples which different in texture and color. Written work instructions for carrying out the measurement of residual amounts of tetracycline and chloramphenicol in honey. The method requires special laboratory equipment: thermostats and stirring devices, devices for washing and measuring the optical density of the solutions. Also, the method is sensitive to environmental conditions, method is requires a separate room to avoid contamination. The investigated method allows to get the result for the four samples of honey about residual quantities of antibiotics for five–six hours. The duration of the analysis depends on the consistency of honey samples and increases only in the first stage of sample preparation – the formation of laboratory samples from samples. It was established that the linear dependence of the analytical signal of chloramphenicol concentrations in the range of concentrations of 0.25 mg/kg to 5.0 mg/kg of honey. The linear dependence of the measured extinction in studies of tetracycline set in the range of 0.25 mg/kg to 12.0 mg/kg of honey. The limit of quantification of tetracycline and chloramphenicol using test systems A1 and A2 is 0.25 mg/kg. The analysis of six samples of honey bought in the market, by this method, revealed that the sample number 1 (a dark, thick honey) containing tetracycline in an amount of 6.1 ± 0.5 mg/kg and sample number 3 (light, liquid honey) that also did not meet the requirements of State Standard of Ukraine 4497:2005 and contains tetracycline in an amount of 1.4 ± 0.3 mg/kg. Identifying hazardous honey samples suggests the relevance of research and the need to control honey sold on the domestic market.

Key words: chloramphenicol, tetracycline, enzyme immunoassay, high performance liquid chromatography, honey.

Надійшла 12.05.2016 р.