

Оптимізація методики визначення фторхінолонів у продуктах тваринного походження

Анотація. Удосконалено методику визначення антибактеріальних речовин, зокрема препарати групи фторхінолонів, у продуктах тваринного походження методом рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС). Проведено валідування з визначення залишкової кількості енрофлоксацину і норфлоксацину методом РХ/МС/МС.

Ключові слова: фторхінолони, енрофлоксацин, норфлоксацин, антибактеріальні речовини, метод рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора, валідація.

Оптимизация методики определения фторхинолонов у продуктах животного происхождения.

НАТАЛИЯ В. ЛИНИЙЧУК (Государственный научно-исследовательский институт лабораторной диагностики и ветеринарно-санитарной экспертизы, г.Киев)

Аннотация. Усовершенствована методика определения антибактериальных веществ, включая препараты группы фторхинолонов в продуктах животного происхождения методом жидкостной хроматографии с использованием мас-спектрометрического детектора (ЖХ/МС/МС). Проведена валидация по определению остаточного количества энрофлоксацина и норфлоксацина методом ЖХ/МС/МС.

Ключевые слова: фторхинолоны, энрофлоксацин, норфлоксацин, антибактериальные вещества, метод жидкостной хроматографии с использованием мас-спектрометрического детектора, валидация.

Optimization methods for determination fluoroquinolones in foods of the animal origin. NATALIYA V. LINIICHUK (State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kiev)

Abstract. The method of determination of antibacterials is improved, including preparations of group of fторkhiноlonov in the products of animal origin of liquid chromatography a method with the use of mas-spectrometry detector (ZHkH/mS/ms). Validaciya is conducted on determining the remaining amount of enrofloxacin and norfloxacin method of ZHkH/mS/ms.

Key words: fluoroquinolones, enrofloxacin, norfloxacin, antibacterial drugs, liquid chromatography with mas-spectrometry detector, validation.

Рецензенти: докт. вет. наук., В. Л. Коваленко (ІВМ НААН України) канд. вет. наук А. О. Меженський (ДНДІЛДВСЕ)



Фторхінолони – антибактеріальні речовини, що являють собою молекули, утворені шляхом хімічного синтезу. Це препарати широкого спектра дії, здатні пригнічувати активність як хромосомної, так і плазмідної бактеріальної ДНК-гірази і спричинювати тим самим функціональне припинення реплікації ДНК у бактерій [5, 8, 10].

У ветеринарній медицині їх часто використовують для лікування маститів у корів, тому фторхінолони є потенційними залишками у молоці та молочних продуктах. Також широкого застосування вони набули у птахівництві та рибництві [4, 8, 11].

Після довготривалого і широкого їх застосування все частіше почали з'являтися стійкі до фторхінолонів ентеробактерії. Дослідження цілого ряду штамів бактерій довели появу точкових мутацій, які проявляються в генах ДНК-гірази і топоізомерази IV та призводять до виникнення резистентності до фторхінолонів [3, 9]. Залишкові кількості антибактеріальних речовин, крім токсичної дії на організм, можуть впливати на кишково-шлункову мікрофлору. Особливого значення набуває той факт, що залишкові кількості за неправильного застосування виявляються в продуктах тваринництва і, потрапляючи з ними до організму людей, зумовлюють серйозні алергічні захворювання та інші побічні реакції. Крім того, присутність антибіотиків та антибактеріальних речовин у м'ясі, молоці та інших продуктах негативно впливає на технологічні процеси, ускладнює проведення бактеріологічних досліджень під час ветеринарно-санітарної оцінки продуктів тваринного походження.

У зв'язку з підвищенням вимог до безпечності харчових продуктів і посиленої стурбованості споживачів стосовно впливу на життя та здоров'я людей харчових продуктів створено загальнодержавну цільову економічну програму здійснення моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у тваринах, продуктах тваринного походження і кормах [2].

Одним із найпоширеніших методів контролю, що використовується для виявлення залишків препаратів групи фторхінолонів у продуктах тваринництва, є метод рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора, який дає змогу досить швидко і якісно визначити препарати групи фторхінолонів у поєднанні з іншими антибактеріальними речовинами інших класів.

В Україні ретельний контроль за вмістом препаратів групи фторхінолонів у продуктах тваринного походження зумовлює «План моніторингу залишків ветеринарних препаратів та інших забруднювачів у живих та необроблених харчових продуктах тваринного походження», що виконується відповідно до Директиви 96/23/ЕС від 29 квітня 1996 року.

Також слід зазначити, що важливими аспектами є валідація методик згідно з Європейськими вимогами, а також запровадження методів визначення сполук відповідно до Рішення комісії 657/2002 від 12 серпня 2002 року, яке забезпечує виконання Директиви Ради 96/23/ЕС, що стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів [6].

У країнах Європейського Союзу допустимий вміст залишкових кількостей препаратів групи фторхінолонів у продуктах тваринного походження регламентовано максимально допустимими рівнями (МДР). Згідно із Регламентом ЄС 37/2010 рівень залишків фторхінолонів (енрофлоксацин і ципрофлоксацин) становить у молоці 100 мкг/кг, у м'язах тварин (яловичина, козлятина, баранина, свинина, кролятина, м'ясо птиці) – 100 мкг/кг, в жири, шкурі – 100 мкг/кг, у печінці – 200 мкг/кг (велика рогата худоба (ВРХ), дрібна рогата худоба (ДРХ) – 300 мкг/кг), у нирках – 300 мкг/кг (нирки ВРХ, ДРХ – 200 мкг/кг), в яйцях – не регламентовано [7, 12].

Метою роботи є оптимізація методики визначення препаратів групи фторхінолонів, а саме енрофлоксацину та норфлоксацину, в продуктах тваринного походження методом рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора; експериментальне встановлення валідаційних характеристик.

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІ ЛДВСЕ).

Матеріалом для дослідження слугували продукти тваринного походження: сухе молоко, незбиране молоко, сир, м'язи тварин. Для визначення препаратів групи фторхінолонів використовували метод рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС); сертифіковані стандарти енрофлоксацину, норфлоксацину.

За Планом Державного моніторингу на препарати групи фторхінолонів досліджують молоко,

Таблиця 1

**Результати валідації дослідження незбираного молока,
сухого молока, сиру**

Параметри валідації/ показник	Енрофлоксацин			Норфлоксацин		
	50 кг/ кг	100 мкг/ кг	150 мкг/кг	50 мкг/ кг	100 мкг/кг	150 мкг/ кг
Середнє значення, Хсер. ($M \pm m$, n=6)	55,73± 1,10	119,83± 0,75	163,66±1,29	48,51± 1,02	93,95± 1,81	135,73± 4,22
% повернення	111,5	119,8	109,1	97,0	94,0	90,5
Коефіцієнт варіації повто- рюваності, (Sr), CV%	8,0	2,7	3,5	8,3	7,9	8,5
Коефіцієнт варіації, вну- трішньо-лабораторної від- творюваності, (SR), CV%	8,6	2,7	3,5	9,2	8,3	14,7
CC α		11,50			13,98	
CC β		19,39			21,32	

Таблиця 2

Результати валідації дослідження м'язів тварин (курятини, свинина, яловичина)

Параметри валідації/ Показник	Енрофлоксацин			Норфлоксацин		
	50 мкг/ кг	100 мкг/ кг	150 мкг/ кг	50 мкг/ кг	100 мкг/ кг	150 мкг/ кг
Середнє значення, Хсер. ($M \pm m$, n=6)	49,54± 0,81	101,02± 2,34	144,79± 2,87	54,22± 1,10	109,27± 1,63	153,97± 1,45
% повернення	99,1	101,0	96,5	108,5	109,3	102,6
Коефіцієнт варіації повто- рюваності, (Sr), CV%	6,0	5,3	6,2	6,2	5,6	2,8
Коефіцієнт варіації, вну- трішньо-лабораторної від- творюваності, (SR), CV%	7,3	11,2	9,2	9,5	6,6	4,4
CC α		9,76			13,35	
CC β		15,71			21,77	

м'язи риби, м'язи птиці, печінку, свинину, яловичину, конину, яйця.

Принцип розробленого нами методу полягає в екстракції залишкової кількості антибактеріальних речовин трихлороцтовою кислотою, подальшому очищенні за допомогою твердофазної екстракції та ідентифікації і кількісному визначенні методом РХ/МС/МС. Ідентифікацію проводять за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношення їхньої інтенсивності (материнський іон для енрофлоксацину – 359,8, норфлоксацину – 319,6; дочірні іони для енрофлоксацину – 286 і 342, для норфлоксацину – 233 і 276,2).

Перед виконанням валідації потрібно ретельно спланувати та виписати процедуру її проведення. Необхідно дотримуватись відповідних умов хроматографування: температура навколишнього середовища – 18-28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), атмосферний тиск – від 84 до 107 кПа (від 630 до 800 мм рт. ст.), відносна вологість повітря за температури 20°C – 40-70%, напруга в електричній мережі живлення – 220 ± 10 В, частота – 50 ± 1 Гц.

Валідацію методики проводили відповідно до Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року.

Повернення – за відсутності сертифікованого референс-матеріалу визначають шляхом дослідження зразків з додаванням аналіту; для цього відбирають 6 чистих проб, до яких додають точну кількість аналіту, що відповідає 0,5 максимально-допустимого рівня (МДР), 1 МДР, 1,5 МДР (чи 2 МДР).

Повторюваність (repeatability) – близькість результатів індивідуальних тестів, коли процедура аналізу повторюється на безлічі пробах гомогенного зразка за нормальних умов проведення аналізу. Визначають шляхом додавання до матриці точної кількості аналіту, що відповідає 0,5 максимально допустимого рівня (МДР), 1 МДР, 1,5 МДР (чи 2 МДР). Використовують щонайменше по 6 зразків для кожної концентрації.

Відтворюваність (reproducibility) – ступінь подібності результатів одержання одних і тих самих зразків за різних умов – різні хіміки-аналітики, партії реактивів, температура навколишнього середовища, різний час проведення дослідження тощо. Для цього готують зразки з додаванням аналіту в кількості, що відповідає 0,5 максимально допустимого рівня (МДР), 1 МДР, 1,5 МДР (чи 2 МДР), як мінімум по 6 зразків. Відтворюваність основного компонента не повинна перевищувати 3% і для визначення домішок – 10%.

Лінійність (linearity) – здатність показати, що результати тесту пропорційні концентрації аналіту в зразках у межах даного інтервалу. Коефіцієнт кореляції лінійної регресії повинен бути близьким до 1,0.

СС α – межа, яка і вище якої дозволяється зробити висновок з імовірністю помилки α , що зразок є невідповідним;

СС β – це найменший вміст аналіту, що може бути встановлений, ідентифікований та кількісно визначений у зразку з імовірністю помилки β [6].

Під час проведення валідації було визначено такі основні робочі характеристики, як Х середне, повернення, коефіцієнт варіації, СС α , СС β . (табл.1-2).

У процесі досліджень проаналізовано по 6 аліквот чистого матеріалу, який збагатили на рівні, мкг/кг 50, 100, 150. Розрахунки проводили відповідно до ІСО 5725-2-2002 [1].

Коефіцієнт варіації повторюваності і внутрішньо-лабораторної відтворюваності, згідно з рівнянням Хорвіца, становить менше 22,6.

За даними табл. 1 і 2, основні параметри валідації є в допустимих межах, що дає змогу використовувати її для проведення досліджень.

Висновки

Одержані валідаційні дані під час проведення досліджень з визначення залишкової кількості препаратів групи фторхінолонів удосконаленим методом РХ/МС/МС свідчать про те, що ця методика придатна для дослідження продуктів тваринного походження і може успішно використовуватися лабораторіями ветеринарної медицини.

ЛІТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р ІСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.
2. Концепція загальнодержавної цільової економічної програми здійснення моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також у харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, на 2008-2013 роки // Здоров'я тварин і ліки. – 2007. – №9. – С. 10-13.
3. Косенко М., Музика В., Чайковська О., Стецько Т. Проблема антибіотикорезистентності у ветеринарній медицині. // Ветеринарна медицина України. – 2005. – №1. – С. 38-39.
4. Сливкин А.И., Карлов П.М., Сипливая Л.Е. Выделение и анализ фторхинолонов в субстанциях лекарственных форм и биожидкостях с использованием хроматографии и спектрофотометри. // Курский государственный медицинский университет. – Курск. – 2009. – С. 288-295.

5. **Amjad H., Iqbal J., Naeem M.** Analysis of some residual in muscle, kidney and liver samples of broiler chicken by various method . // Institute of Chemistry, University of the Punjab, Applied Chemistry Research Centre, PCSIR, Labs. Complex, Ferozepur Road, Lahore, Pakistan. – 2005. – September. – P. 223-231.
6. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Comission, Brussels.
7. Commission Regulation (EU) № 37/2010 // Official journal of the European Commission. – 2010. – L 15. – 72 p.
8. Determination of enrofloxacin in milk by direct bioautography detection. // Planar Chromatography in Practic, Camag bibliography service planar chromatography (CBS 106). – 2011. – March.
9. **Limian Zha, Joan Stevens.** Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Liver Using Agilent SampliQ QuEChERS Kits by LC/MS/MS. // Agilent Technologies, Inc. USA
10. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-5085EN.pdf>
11. **Naeem M., Khan K., Rafiq S.** Determination of Residues of Quinolones in Poultry Products by High Pressure Liquid Chromatography . // Applied Chemistry Research Center, PCSIR Labs. Complex, Ferozepur Road, Center for Integrated Mountain Research, University of The Punjab, Lahore, Pakistan. <http://www.aseanfood.info/Articles/11016084.pdf>
12. **Torralbo Jose Barbosa, Dolores Barron Bueno.** Multi-Class, Multi Method for Determination of Penicillin, Cephalosporins and Quinolones in Cow Milk and Validation in Accordance with Commission Decision 2002/657/EC. // Europes in Masters in Quality in Analytical Laboratories, Rameshwari Amatya, Department of Analytical Chemistry at university of Barcelona – 2010. – February.
13. **Verdon E., Couedor P., Roudaut B., Sanders P.** Multiresidue Method for Simultaneous Determination of Ten Quinolone Antibacterial Residues in Multimatri, Multispecies Animal Tissues by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Single Laboratory Validation Study // Journal of AOAC International, – 2005. – Vol. 88. – № 4. – P.1179-1191.

Р. ФЕДОРУК, докт. вет. наук

Л. РОМАНІВ, м. н. с.

Інститут біології тварин НААН

У результаті значного прогресу у біотехнології останнім часом все більше сільськогосподарських культур і сировини з генетично модифікованих організмів, у тому числі сої, входять до складу кормів та продуктів харчування. Проте, ще не вивченими є питання щодо застосування бобів сої нативного та трансгенного сортів у підгодівлі бджіл та її впливу на метаболізм окремих мікроелементів у тканинах їхнього організму. [1-3]. Не з'ясованими є особливості впливу агро-екологічних умов, у т. ч. з пилконосних і медодайних рослин живлення бджіл на співвідношення окремих мінеральних і структурних речовин у тканинах різних анатомічних відділів їхнього організму. Тоді як одержання екологічно безпечної сировини і продукції бджільництва, вільної від ГМО та невластивих продуктам харчування хімічних елементів, має особливо важливе значення для збереження високої біологічної активності меду та іншої продукції бджіл [6, 7, 10].

Використання борошна з бобів сої, в т. ч. трансгенної, що містить антипоживні речовини, може специфічно впливати не лише на протеїновий і ліпідний обмін, а й на метаболізм окремих мінеральних елементів в організмі робочих бджіл [8, 13]. Відомо, що соєве борошно є як цінним джерелом протеїнів і жирів, так і макро- та мікроелементів і може ефективно конкурувати з іншими екзогенними протеїново-жировими компонентами, у т. ч. синтетичного походження [8]. Порівняльним аналізом борошна з бобів сої нативного та трансгенного сортів за вмістом макро- і мікроелементів встановлено значно вищий вміст калію, кальцію, магнію, фосфору, сірки, заліза, марганцю, кобальту і хрому порівняно з вмістом цих металів у інших бобових, зокрема квасолі, гороху, пшениці, вівса та рису. Однак соєве борошно характеризується відносно нижчим вмістом натрію, міді, цинку та стронцію [9]. Вказані вище відмінності мінерального складу бобів сої зумовлюють доцільність вивчення їхнього впливу на вміст окремих важких металів у тканинах різних анатомічних відділів організму бджіл.

Тому метою роботи було дослідити вміст окремих важких металів – Zn, Cr, Fe, Cu, Cd і Pb у тканинах організму медоносних бджіл у весняно – літній період за включення до компонентів підгодівлі борошна з бобів сої нативного та трансгенного сортів.