

*Е.И. Козельцева, С.Н. Верещак, Л.Д. Божко
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ В МЯСЕ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

(Поступила в редакцию 22.02.2011)

В статье приведены данные по содержанию остаточных количеств антибиотиков в образцах мясного сырья. Для определения остаточных количеств антибиотиков использовали метод иммуноферментного анализа. Проведенные исследования показали, что содержание антибиотиков в представленных образцах не превышало допустимых концентраций. Необходимо дальнейшее проведение исследований по определению наиболее часто применяемых в ветеринарии антибиотиков.

Введение. Активное использование антибиотиков в животноводстве обуславливает потенциальную возможность присутствия остаточных количеств этих препаратов в продуктах животного происхождения.

Остатки антибиотиков, попадающие в пищевые продукты и далее в организм человека, могут вызывать различные аллергические реакции, нарушение обмена веществ, способствовать распространению устойчивых форм микроорганизмов, провоцировать нарушение функции почек и кроветворных органов, угнетать микрофлору кишечника.

Также следует учитывать, что даже незначительное количество антибиотиков может нарушать ход технологических процессов при выработке кисломолочных продуктов, сыров, сырокопченых колбас. Все это обуславливает необходимость контролировать содержание остаточных количеств антибиотиков.

Для определения остатков антибиотических препаратов в настоящее время используются:

микробиологические методы связанные с регистрацией роста тест-культур микроорганизмов в присутствии стандартных количеств антибиотиков и анализируемых экстрактов;

высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [1] и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ем (ЖХМС), связанные с количественным анализом времени выхода хроматографического пика;

тонкослойная хроматография (ТСХ), регистрирующая появление индивидуального пятна анализируемого вещества;

флуоресцентный анализ, связанный с образованием флуоресцирующего комплекса антибиотика со специальным органическим хромофором.

Применяемые аналитические методы определения содержания антибиотиков различаются по минимально определяемому уровню вещества в зависимости от характера самого антибиотика и используемого метода [2].

Однако следует отметить, что, хотя традиционное применение хроматографических и спектральных методов для анализа остаточных количеств антибиотиков позволяет решать задачу аналитического контроля, имеется ряд проблем.

Хроматографическая идентификация предусматривает анализ содержания конкретного вещества по времени удержания хроматографического пика. Известно значительное количество причин, по которым времена удержания могут варьироваться или даже совпадать для некоторых веществ. В случае очень низких концентраций веществ эта особенность часто является неразрешимой проблемой даже при использовании внутренних стандартов определяемых веществ. Ведущие производители хроматографического оборудования предлагают для надежной двойной идентификации веществ в установленном пике использовать, например, запись УФ-спектра или масс-спектра вещества с последующим сравнением со стандартной базой компьютерных данных. Такой подход к определению остаточного содержания антибиотиков является достаточно надежным, но требует очень дорогостоящего аналитического оборудования и не может быть рекомендован для серийного анализа [3].

В последнее десятилетие наблюдается быстрое внедрение иммуноферментного метода анализа (ИФА) в лабораторную практику, связанное с усовершенствованием техники такого анализа и обусловленное потребностью в быстрых, чувствительных, специфичных, производительных и достаточно простых методах [4]. В странах ЕС, США и Японии метод ИФА является основным скрининговым методом для определения

остаточных количеств ветеринарных препаратов в сырье и пищевых продуктах.

Метод основан на специфическом взаимодействии между антигеном (загрязняющим веществом) и антителом (полученным против контролируемого вещества). Образующийся комплекс антиген-антитело после его мечения ферментом детектируется по цветовой реакции с помощью измерительных приборов.

Базовым принципом для количественного определения антибиотиков в пищевых продуктах является твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ на полистироловых планшетах. Метод основан на конкуренции свободного антибиотика из исследуемых образцов и антибиотика, предварительно адсорбированного на твердой фазе (лунке планшета) в составе белкового конъюгата, за центры связывания специфических к антибиотику антител во вносимом растворе. После отделения не связавшихся реагентов количества антител, прореагировавших с иммобилизованным антигеном, определяют с помощью вторичных антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Количество связавшегося с антителами конъюгата вторичных антител определяют с помощью субстрат-хромогенной смеси. При этом количество определяемого антибиотика, содержащегося в исследуемом образце, обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции.

Большой спектр тест-систем представлен серией RIDASCREEN®, произведенных концерном R-Biopharm, для ИФА, с помощью которых возможно выполнение массовых исследований сырья и пищевых продуктов за короткое время. Чувствительность тест-систем обеспечивает определение антибиотиков в рабочих интервалах, предусмотренных в Санитарных нормах, правилах и гигиенических нормативах «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» (СанПиН от 09.06. 2009 П. N 63).

Хлорамфеникол (левомицетин) – эффективный синтетический антибиотик широкого спектра действия, запрещен к использованию в животноводстве и ветеринарии для лечения скота, птицы, мясо, молоко и яйца которых предназначены для питания людей. При действии на человека левомицетин может проявлять гемотоксические свойства и вызвать

аплазию костного мозга (потерю способности к кроветворению) и, как следствие, апластическую анемию, сопровождающуюся быстрым снижением уровня гемоглобина и эритроцитов в крови. Известно, что хлорамфеникол медленно выводится из организма животных и сравнительно долго сохраняет свою активность при хранении продуктов.

Микробиологические методы не эффективны для анализа этого антибиотика, так как используемые в методике тест-культуры малочувствительны и не позволяют осуществлять контроль за остаточными количествами левомицетина на уровне ПДК.

Тетрациклин – высокоэффективный антибиотик широкого спектра действия, который часто используются в животноводстве. Кроме того, тетрациклин используется как кормовой антибиотик для стимуляции роста животных. При нарушении режима лечения, а также при несоблюдении времени выдержки перед убоем остатки препаратов тетрациклиновой группы могут попадать в пищевые продукты животного происхождения.

Потребление человеком пищевых продуктов, содержащих остаточные количества тетрациклина, угнетает микрофлору кишечника, может вызвать дисбактериоз, снижает сопротивляемость организма и повышает устойчивость патогенных микроорганизмов.

Действующие в Республике Беларусь нормы, постоянно ужесточающиеся требования директив ЕС требуют расширения проведения проверок продукции на содержание остаточных количеств антибиотиков. На сегодняшний день проблема безопасного питания в отношении содержания антибиотиков не решена. Снизить риск загрязнения продовольственного сырья антибиотиками можно только при эффективной системе контроля от производства до реализации. Однако, несмотря на высокую актуальность проблемы, сведений о степени загрязнения антибиотиками мясного сырья недостаточно.

Цель исследований – исследование сырья, поступающего на мясоперерабатывающие предприятия РБ, на соответствие требованиям СанПиН от 09.06.2009 П. N 63 по содержанию остаточных количеств антибиотиков хлорамфеникола и тетрациклина.

Материалы и методы исследования. Для определения остаточных количеств левомицетина и тетрациклина мы использовали тест-системы «Ридаскрин[®] Хлорамфеникол и Ридаскрин[®] Тетрациклин».

Иммуноферментная тест-система на 96 определений включает:

- 96-луночный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок);

- комплект градуировочных растворов антибиотиков;

- конъюгат (антибиотик, конъюгированный пероксидазой);

- раствор субстрат / хромоген;

- антитела к антибиотику;

- стоп-реагент;

- буфер (для разведения градуировочных растворов и проб).

Образцами для определения хлорамфеникола и тетрациклина служили пробы говядины, свинины и мяса кур. Всего на наличие остаточных количеств антибиотиков было исследовано 254 образца мышечной ткани.

Количество хлорамфеникола определяли по методике, регламентированной в МВИ.МН 2644–2007 «Методика выполнения измерения количества хлорамфеникола в молоке, яйцах, мясе с использованием тест-системы «Ридаскрин[®] Хлорамфеникол» [5].

Для определения хлорамфеникола, мышечную ткань измельчали в гомогенизаторе, к 3 г гомогенизированной пробы добавляли 3 см³ дистиллированной воды, 6 см³ этилацетата и интенсивно перемешивали в течение 10 мин. Затем центрифугировали 10 мин при 3000g для разделения фаз, отбирали 4 см³ надосадочной части этилацетата (что соответствует 2 г пробы) и выпаривали досуха в устройстве для испарения растворов при 60 в непрерывном токе азота.

К сухому остатку добавляли 1 см³ *n*-гексана, 0,5 см³ буфера, интенсивно перемешивали на вортексе до полного растворения осадка. Центрифугировали 10 мин при 3000g для разделения фаз. Полученную водную фазу в течение часа использовали для проведения испытаний.

Проведение теста включало следующие этапы:

- внесение по 50 мкл градуировочных растворов хлорамфеникола в соответствующие лунки микротитровального планшета;

- внесение по 50 мкл растворов проб в соответствующие лунки микротитровального планшета;
- внесение по 50 мкл раствора конъюгата;
- инкубирование 1 ч при комнатной температуре;
- промывка трижды моющим буфером;
- внесение 100 мкл хромогена;
- инкубирование 15 мин при комнатной температуре в темноте;
- внесение 100 мкл стоп-реагента;
- измерение оптической плотности при 450 нм.

Количество тетрациклина определяли по методике, регламентированной в МВИ.МН 2644–2007 «Методика выполнения измерения количества тетрациклина в молоке и мясе с использованием тест-системы «Ридаскрин[®] Тетрациклин» [6].

Для определения тетрациклина мышечную ткань измельчали в гомогенизаторе, к 5 г гомогенизированной пробы добавляли 25 мл буфера Макклвейна и экстрагировали на шейкере в течение 30 мин. Затем пробу центрифугировали 10 мин при 4000g, надосадочный слой переносили в колбу, еще раз повторяли процесс экстрагирования (внесение 25 мл буфера Макклвейна, экстрагирование, центрифугирование). Объединенные смеси надосадочного слоя фильтровали через бумажный фильтр.

5 мл отфильтрованного из 50 мл экстракта пропускали через колонку RIDA[®] C18. Колонку предварительно промывали 3 мл метанола (100%) и затем 2 мл дистиллированной воды. После пропускания экстракта колонку C18 промывали 3 мл дистиллированной воды и элюировали продукт, пропуская 2 мл раствора метанола с 20 мМ щавелевой кислотой со скоростью тока 15 капель в минуту.

Полученный элюат смешивали с буфером для разбавления 1 : 10 и использовали для постановки теста.

Постановка теста включала следующие этапы:

- внесение по 50 мкл градуировочных растворов тетрациклина в соответствующие лунки микротитровального планшета;
- внесение по 50 мкл растворов проб в соответствующие лунки микротитровального планшета;
- внесение по 50 мкл раствора антител к тетрациклину;
- инкубирование 1 ч при комнатной температуре;
- промывка трижды моющим буфером;

- внесение 100 мкл конъюгата ;
- инкубирование 15 мин при комнатной температуре;
- промывка трижды моющим буфером;
- внесение 100 мкл хромогена;
- инкубирование 15 мин при комнатной температуре;
- внесение по 100 мкл стоп-реагента;
- измерение оптической плотности при 450 нм.

Для оценки результатов исследований использовали программу автоматической обработки данных RIDA SOFN Win.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования по выявлению остаточных количеств антибиотиков в образцах мяса методом ИФА представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Результаты исследования по выявлению остаточных количеств антибиотиков в образцах мяса методом ИФА

Исследуемые образцы	Кол-во образцов	Допустимые уровни антибиотиков по СанПиН от 09.06.2009 П. №63		Предел обнаружения антибиотиков методом ИФА		Кол-во положительных проб
		Левомецетин (хлорамфеникол)	Тетрациклиновая группа	Левомецетин (хлорамфеникол)	Тетрациклиновая группа	
Говядина	40	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	0,00625 мкг/кг	6,0 мкг/кг	0
Свинина	130	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	0,00625 мкг/кг	6,0 мкг/кг	0
Курятина	84	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	Не допускается (<0,3 мкг/кг)	0,00625 мкг/кг	6,0 мкг/кг	0
Всего	254	-	-	-	-	0

Заключение. Исследования показали, что содержание остаточных количеств антибиотиков во всех исследованных образцах не превышало допустимых концентраций, установленных СанПиН от 09.06.2009 П.63.

Однако необходимо продолжить исследование содержания по выявлению в мясном сырье как хлорамфеникола и тетрациклина, так и других, наиболее часто применяемых в ветеринарии и животноводстве, антибиотиков.

Учитывая тот факт, что требования нормативных документов ЕС и РФ не допускают содержание хлорамфеникола в мясном сырье даже в ко-

личестве менее 0,3 мкг/кг, необходимо провести цикл исследований содержания хлорамфеникола с параллельным использованием ИФА метода и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.

Литература

1. Эллер, К.И. Методы контроля качества и безопасности пищевых продуктов // Российский Химический журнал. - 1994. – №1. - С. 10-18.
2. Методы практической биотехнологии / А.Б. Лисицын и [др.]. - М.: ВНИИМП, 2002. – 408 с.
3. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов / И.А.Рогов и [др.]. – Новосибирск, 2007. – 227 с.
4. Галкин, А.Н. Иммуноферментный метод экспресс-контроля продовольственного сырья и пищевых продуктов за содержанием потенциально опасных химических соединений / А.Н. Галкин, В.И. Комаров, Е.А. Иванова //Хранение и переработка сельхозсырья. - 1998. – №5. – С. 21-24.
5. Методика выполнения измерения количества хлорамфеникола в молоке, яйцах, мясе с использованием тест-системы «Ридаскрин[®]Хлорамфеникол». – МВИ. МН 2436-2006.
6. Методика выполнения измерения количества тетрациклина в молоке и мясе с использованием тест-системы «Ридаскрин[®]Тетрациклин». - МВИ. МН 2644-2007.

E. Kozeltsava, L. Bozhko, S. Vereschak

DETERMINE THE RESIDUAL QUANTITIES OF ANTIBIOTICS IN SAMPLES OF RAW MEAT BY THE METHOD OF ENZEME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Summary

The article presents data on the content of residues of antibiotics in samples of raw meat. To determine the residual quantities of antibiotics it was used the method of ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Studies have shown that the content of antibiotics in the submitted samples did not exceed allowable concentrations. It is necessary further research to identify the most frequently used antibiotics in animal husbandry.