

УДК 637.075(045)

*О.В. Дымар, к.т.н., доцент, И.П. Пыжик, Т.М. Смоляк,
В.А. Клапкова, Н.В. Карницкая
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БЕТА-АГОНИСТОВ В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

(Поступила в редакцию 1 апреля 2016 г.)

В статье приведены результаты проделанной работы над разработкой методических указаний относительно идентификации бета-агонистов в мясных продуктах иммуноферментным анализом и экспериментальной разработкой этого метода.

Ключевые слова: бета-агонисты, методические указания, иммуноферментный анализ, мясо.

В современном промышленном животноводстве для увеличения производства продукции нередко используются различные гормональные стимуляторы роста (естественные и синтетические стероиды, бета-агонисты и др.), что приводит к их избыточному накоплению в мясе и мясопродуктах, представляющему серьезную опасность для здоровья человека.

Использование веществ, оказывающих анаболическое действие в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных, запрещено во многих странах мира, в том числе в Европейском союзе (Директива 96/22/ЕС), Российской Федерации (Указание Главного госветинспектора № 12-7-1/900 от 04.10.99 г.), Аргентине, Бразилии и других странах. В ряде стран (США, Канада, Австралия и др.) допускается ограниченное применение стимуляторов роста под государственным контролем. Тем не менее, часто встречаются злоупотребления, в частности, использование запрещенных препаратов, увеличение дозировок, нарушение регламента использования и сроков выдержки животных перед убоем. В большинстве случаев это связано с доступностью на рынке препаратов, содержащих бета-агонисты [1].

В ряде Европейских стран разработаны и действуют национальные программы контроля остаточного содержания бета-агонистов в продукции животноводства. Эффективность реализации таких программ очевидна. Так, в Нидерландах количество положительных проб продуктов животного происхождения, в которых обнаруживалось остаточное содержание бета-агонистов, уменьшилось с 10% в 1990 году до 0,5% в 1995 году.

В 1994 году Европейская организация потребителей провела независимые исследования присутствия остаточного содержания бета-агонистов в образцах говяжьей печени, купленных в магазинах странах Евросоюза (ЕС). Из 936 проанализированных образцов бета-агонисты были обнаружены в 92 случаях (около 10% проб). Если систематизировать результаты исследования по странам, то наибольшее количество положительных проб выявлено в Испании – 36%, Бельгии – 23%, Франции – 12%, Люксембурге и Нидерландах – по 10%, Италии – 8%, Португалии – 7%, Греции – 5%, Германии – 3% и Великобритании – 2% [2, 3].

В Республике Беларусь количество бета-агонистов не регламентируется, однако существует Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 16 декабря 2005 г. № 78 «Об утверждении

Правил осуществления контроля за содержанием вредных веществ и их остатков в живых животных и продукции животного происхождения при экспорте их в страны Европейского Союза» в соответствии с которым, продовольственное сырье и пищевые продукты животного происхождения, реализуемые в странах Европейского союза, должны быть полностью свободны от остатков бета-агонистов [4].

Целью работы является разработка методических указаний по определению содержания бета-агонистов в мясной продукции методом иммуноферментного анализа и экспериментальная отработка данного метода.

Для аналитического определения стимуляторов роста в продуктах животноводства применяют физико-химические и химико-биологические методы [5].

Физико-химические методы количественного анализа стимуляторов роста основаны на использовании реакций, с помощью которых выявляют и учитывают особенности их химической структуры.

Определение содержания стимуляторов роста возможно лишь после их предварительного извлечения и очистки, которые достигаются экстракцией, ультрацентрифугированием, хроматографией и так далее.

Для разделения смеси белковых гормонов часто применяют электрофорез в полиакриламидном геле. Под действием электрического поля заряженные молекулы гормонов перемещаются в геле. При этом поры геля выполняют функцию «молекулярного сита».

Эффективным методом очистки белковых и пептидных гормонов является ионно-обменная хроматография с применением специальных смол и других компонентов. Для разделения катехоламинов и стероидных гормонов применяют адсорбционную (молекулярную) колоночную хроматографию.

Чаще всего в различных методах хроматографии используют растворители с определенной полярностью, которые под действием капиллярных сил обеспечивают перемещение в слое сорбента исследуемых гормонов.

В последние годы для количественного анализа стероидных гормонов применяют газожидкостную хроматографию. Через колонку газового хроматографа, заполненную гранулами адсорбента с растворителем, с помощью газа-носителя (аргон, водород, азот) продувают нагретую в испарительной камере исследуемую смесь. Выход гормонов из колонки в потоке газа регистрируется детектором. Для газо-жидкостной хроматографии требуется предварительная очистка экстрактов стероидов и их разделение с помощью тонкослойной и других видов хроматографии.

К физико-химическим методам относятся метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ) и метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии (далее – ГХ-МС).

Однако, данные методы имеют ряд недостатков, ограничивающих их широкомасштабное применение, к которым относятся высокая стоимость используемого оборудования, сложность приготовления проб для анализа, необходимость привлечения высококвалифицированных специалистов. Эти методы отнимают много времени, сложны в постановке.

К химико-биологическому методу относится радиоиммунологический анализ (далее – РИА), который был предложен в конце 50-х годов. Разработка РИА являлась поворотным моментом в развитии анализа, положившим начало целой серии методов с использованием различных меченых соединений. Однако, наряду с несомненными достоинствами, РИА имеет и определенные недостатки, к которым можно отнести следующие:

– ограниченный срок жизни радиоактивной метки, что вызывает необходимость постоянной замены реактивов;

– относительно дорогое специальное оборудование для регистрации радиоактивности;

– возможность радиоактивного заражения окружающей среды при осуществлении большого количества анализов, что вызывает необходимость соблюдения специальных мер предосторожности и высокой квалификации обслуживающего персонала [5, 6].

Из этого следует, что физико-химические и химико-биологические методы, используемые для определения гормонов, не могут быть рекомендованы для серийного анализа.

В последние годы в мировой практике используют скрининговые экспресс-методы контроля безопасности пищевых продуктов. Среди них лидирующее положение занял иммуноферментный метод анализа.

Иммуноферментный анализ (далее – ИФА) является одним из наиболее активно развивающихся направлений иммунохимии как в нашей стране, так и за рубежом. Это обусловлено тем, что в ИФА уникальная специфичность иммунохимического анализа сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки. В патентной и научной литературе появляется все больше сведений о рекордных пределах обнаружения веществ данным методом. Высокие результаты достигаются благодаря использованию способности ферментов-биокатализаторов создавать каскадные системы усиления различных химических сигналов.

В основе иммуноферментного анализа лежит взаимодействие антигенов (определяемых антибактериальных препаратов) с антителами в лунках микротитровального полистиролового планшета. Планшет сенсibilизирован антителами «захвата», специфичными к антителам к тому или иному антибактериальному препарату (антигену).

Основными достоинствами метода ИФА являются: высокая стабильность реактивов, простота методов регистрации, скорость постановки анализа и дешевизна оборудования. Все это позволяет применять данный метод в широких масштабах, в том числе, в медицине, сельском хозяйстве, биологической промышленности, охране окружающей среды, а также в научных исследованиях [5].

В целях снижения риска для потребителя, необходимо осуществление постоянного ветеринарного контроля импортируемого мяса в Республику Беларусь на наличие бета-агонистов, что должно исключать его попадание с продуктами животноводства в организм человека.

В связи с этим становится весьма актуальной необходимость проведения исследований по разработке и применению скрининговых экспресс-методов выявления стимуляторов роста (в частности, бета-агонистов) в продуктах убоя сельскохозяйственных животных, которые на первом этапе контроля позволяли бы исключать поступление в Республику Беларусь мяса и субпродуктов, содержащих бета-агонисты.

В процессе работы проведено изучение возможности применения набора реактивов RIDASCREEN® β -Agonists для проведения испытаний ИФА-методом для определения бета-агонистов в мясных продуктах.

Сущность метода заключается во взаимодействии антигена (бета-агониста) с антителами, приводящем к образованию комплекса антиген-антитело, последующей окраске комплекса с помощью субстрата и хромогена и измерении оптической плотности полученного раствора.

Измеренная при 450 нм оптическая плотность обратно пропорциональна массовой концентрации бета-агонистов в растворе. Массовая концентрация бета-агонистов в пробе определяется по градуировочной зависимости, построенной по 6 градуировочным растворам.

Перед началом проведения исследований по содержанию бета-агонистов в мясной продукции методом иммуноферментного анализа необходимо сделать подготовку к проведению испытаний.

Данная подготовка включает в себя:

- отбор образцов;
- предварительная подготовка набора реагентов;
- приготовление растворов;
- подготовка пробы;
- подготовка микротитровального планшета;
- измерение содержания бета-агонистов.

В планшет добавляются стандарты, начиная с наименьшей концентрации и заканчивая стандартом наивысшей концентрации, так как это сведет к минимуму риск искажения стандартной кривой.

Осуществляется приготовление раствора промывочного буфера.

Подготовка пробы проводилась следующим образом:

- отделяется жир и гомогенизируется проба, к 2,0 г. гомогенизированной пробы добавляется 7 см^3 0,1 моль/дм³ раствора соляной кислоты;
- перемешивается на вортексе в течение 30 минут при максимальной скорости;
- центрифугируется проба в течение 10 минут при 2000 об/мин. при комнатной температуре 20–25 °С;
- переносится 4 см³ надосадочной жидкости в новую пробирку;
- используется роторный испаритель для высушивания пробы на водяной бане при температуре 60–70°С при пониженном давлении;
- разводится высушенное вещество в 600 мм³ буфера для разбавления проб, перемешивается на вортексе в течение 1 минуты при максимальной скорости..

Высчитывается необходимое количество лунок, исходя из того, что для каждой пробы проводится два параллельных определения, затем отделяется необходимое количество стрипов и помещают их в рамку микротитровального планшета. Остальные стрипы помещают в фольгированный пакет с осушителем, закрываем и храним в холодильнике при температуре 2–8°С.

После выполнения подготовки к исследованию проводится измерение и расчет содержания бета-агонистов.

В лунки микротитровального планшета вносится дозатором по 25 мм³ каждого градуировочного раствора в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов. В соответствующие лунки микротитровального планшета вносится дозатором по 25 мм³ растворов двух параллельных проб каждого анализируемого образца. В каждую лунку добавляется по 75 мм³ раствора конъюгата.

Аккуратными движениями планшета перемешивается содержимое в течение 1 минуты. Инкубируется планшет в течение 30 минут при комнатной температуре 20–25 °С в защищенном от света месте. По окончании инкубации жидкость из лунок выливается путем резкого переворачивания планшета.

Далее в каждую лунку вносится многоканальным дозатором по 300 мм³ моющего буфера и затем выливается его резким переворачиванием планшета. Процедуру промывки лунок буфером повторяется еще 3 раза, после чего планшет промакивается чистым листом фильтровальной бумаги.

Сразу же после промывки в лунки планшета добавляется отмеренные дозатором 100 мм³ раствора субстрата. Перемешивается содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола. Инкубируется планшет в течение 30 минут при комнатной температуре 20–25 °С в защищенном от света месте.

Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносится по 100 мм³ стоп-буфера и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивается содержимое лунок.

Измеряется оптическая плотность лунок планшета не позднее чем через 30 мин после добавления стор-буфера с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм [7].

Результаты проведенных исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследований

Вид продукции	№ пробы	Значение массовой концентрации бета-агонистов в пробе, мг/кг
Говядина охлажденная I категории	1	< 100,00
	2	< 100,00
Мясо свинины	1	< 100,00
	2	< 100,00
Печень свиная	1	< 100,00
	2	< 100,00
Говядина замороженная I категории	1	< 100,00
	2	< 100,00

Из полученных результатов видно, что в образцах для исследования бета-агонисты не были обнаружены.

Заключение. Использование стимуляторов роста сельскохозяйственных животных, во-первых, увеличивает конверсию корма, стимулирует рост мышечной ткани животных, что обуславливает повышение продуктивности животноводства; во-вторых, эти препараты оказывают выраженное жиросжигающее действие, что обеспечивает получение постного мяса, пользующегося большим спросом на рынке.

Вместе с тем, при поступлении с мясом в организм человека эти вещества могут вызывать симптомы пищевого отравления, а при хроническом поступлении бета-агонистов в организм возможны нарушения обмена веществ и другие побочные явления.

Следовательно, чтобы снизить риск для потребителя, необходимо осуществлять постоянный надзор за использованием стимуляторов роста в животноводстве, что должно исключать их попадание с продуктами животноводства в организм человека.

В сравнении с другими методами по контролю содержания бета-агонистов, метод иммуноферментного анализа обладает рядом преимуществ: высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05 нг/мл; стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА; возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала; простота проведения реакции; относительно низкая стоимость диагностических наборов.

Таким образом, метод иммуноферментного анализа является перспективным для определения количества бета-агонистов в мясной продукции. Разработка методики выполнения измерений будет являться целью дальнейших экспериментальных исследований.

Список использованных источников

1. Зайцева, Н.В. Опыт обоснования гигиенических нормативов безопасности пищевых продуктов с использованием критерия риска здоровья населения / Н.В. Зайцева // Материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации, Москва, 12-13 декабря 2013 г.

Zajceva, N.V. Opyt obosnovaniya gigenicheskikh normativov bezopasnosti pishhevyh produktov s ispol'zovaniem kriterija riska zdorov'ja naselenija / N.V. Zajceva //

Materialy plenuma Nauchnogo soveta po jekologii cheloveka i gigiene okruzhajushhej sredy Rossijskoj Federacii, Moskva, 12-13 dekabnja 2013 g.

2. Kuiper, H.A. Illegal use of β – adrenergic agonists: European Community / H.A. Kuiper, M.Y. Noordam, M.M. H van Dooren – Flipsen, R. Schilt, A.H. Roos // Journal of Animal Science. – 1998. – V.76. – P.195 – 207.

3. Remy, R. Residues of growth promoting substances in meat / R. Remy, W. De-beuckelaere // Association des Consommateurs- Test-Achats S.C. Contract No. B5-1050/93/006893 1994. – P. 71.

4. Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 16 декабря 2005 г. №78 «Об утверждении Правил осуществления контроля за содержанием вредных веществ и их остатков в живых животных и продукции животного происхождения при экспорте их в страны Европейского Союза». – Минск, 2005. – 35 с.

Postanovlenie Ministerstva sel'skogo hozjajstva i prodovol'stvija Respubliki Belarus' ot 16 dekabnja 2005 g. №78 «Ob utverzhenii Pravil osushhestvlenija kontrolja za sodержaniem vrednyh veshhestv i ih ostatkov v zhivyh zhivotnyh i produkcii zhivotnogo proishozhdenija pri jeksporte ih v strany Evropejskogo Sojuza». – Minsk, 2005. – 35 s.

5. Галкин, А.В. Иммуноферментный метод экспресс-контроля продовольственного сырья и пищевых продуктов на содержание потенциально опасных химических соединений / А. В. Галкин, В. И. Комаров, Е. А. Иванова // Хранение и переработка сельхозсырья. – М., 1998. – №5. – С. 21 – 24.

Galkin, A.V. Immunofermentnyj metod jekspress-kontrolja prodovol'stvennogo syr'ja i pishhevyh produktov na sodержanie potencial'no opasnyh himicheskikh soedinenij / A. V. Galkin, V. I. Komarov, E. A. Ivanova // Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ja. – M., 1998. – №5. – S. 21 – 24.

6. Резников, А.Г. Методы определения гормонов. Справочное пособие / А.Г. Резников. – Киев, 1980. – 400 с.

Reznikov, A.G. Metody opredelenija gormonov. Spravochnoe posobie / A.G. Reznikov. – Kiev, 1980. – 400 s.

7. RIDASCREEN® β -Agonists Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of β -Agonists. – Art. No.: R1704. – P. 1–20.

*O. Dymar, I. Pyzhik, T. Smaliak, V. Klapkova, N. Karnitskaya
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

DEVELOPMENT OF THE METHODOLOGY GUIDELINES FOR THE DETERMINATION OF BETA-AGONISTS IN MEAT PRODUCTS BY ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY METHOD

Summary

The article deals with the results of the work on the development of the methodology guidelines on the identification of beta-agonists in meat products by enzyme-linked immunoassay and the experimental development of this method.

Keywords: beta-agonists, methodology guidelines, enzyme-linked immunoassay, meat.