

**ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ З ДІОДНОМАТРИЧНИМ
ДЕТЕКТУВАННЯМ (ВЕРХ-ДМД) ПРИ ОДНОЧАСНОМУ КОНТРОЛІ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ
АНТИБІОТИКІВ ХІНОЛОНОВОГО РЯДУ І ХЛОРАМФІНЕКОЛУ
У МЕДІ**

Проблема безпечності та якості продукції актуалізується в умовах глобалізації агропродовольчих ринків та жорсткої конкуренції. Підвищення якості харчових продуктів – це об'єктивний процес, що зумовлений значною кількістю регламентів й високим рівнем контролю, а також постійно зростаючою вимогливістю споживачів. Для вітчизняних суб'єктів господарювання питання впровадження світових систем менеджменту якості продуктів харчування є одним з першочергових, адже нерозривно пов'язане з їх конкурентоспроможністю на ринку.

Мед як цінний харчовий продукт та ефективний лікувальний засіб широко застосовується у харчовій, фармацевтичній та парфумерній промисловості. Проте, забезпечити внутрішнє споживання власним виробництвом меду, більшість країн не може внаслідок обмеженого потенціалу медозбору. До того ж, у світі відчувається дефіцит підсолоджувачів – цукру, кукурудзяного сиропу, меду на рівні 8–12 млн т/рік. Тому, попит на мед та інші продукти бджільництва у розвинених країнах перевищує пропозицію. Маючи всі передумови для підвищення експортного потенціалу галузі бджільництва, Україна реалізує лише близько 3–5 тис. тонн виробленого меду щорічно в інші країни, переважно ЄС. Однією з причин такого становища є невідповідність якості вітчизняної продукції бджільництва світовим вимогам харчової безпеки. За умов глобалізації світової економіки для забезпечення конкурентоспроможності продукції галузі бджільництва України особливо гостро постає проблема забезпечення якості та безпеки продукції відповідно до світових вимог.

Питання визначення вмісту антибіотиків у меді постало в зв'язку з тим, що в Європі мед вважається натуральним лікувальним засобом, а не продуктом щоденного вжитку, тому вимоги до якості такої продукції досить високі. При оформленні документів на експорт необхідно надати експертний висновок про відсутність в продукті антибіотиків. Якщо ж мед містить антибіотики хінолонового ряду і хлорамфеніколу, а також такі препарати як стрептоміцин, тетрациклін або левоміцетин, продукт не допускають до продажу в Європі [1,2].

Під якістю продукції бджільництва розуміють кількісний вираз певних однорідних її властивостей, що характеризують міру спроможності даної продукції задовольняти потреби споживачів згідно з умовами використання і цільовим призначенням. При цьому, слід враховувати обов'язкові параметри безпечності — науково обґрунтовані та затверджені у встановленому законодавством порядку параметри (санітарні нормативи), включаючи максимальні межі залишків, максимальні рівні, допустимі добові дози і кількості включень, недотримання яких у харчових продуктах може призвести до шкідливого впливу на здоров'я людини [3].

Основні положення щодо вимог, яким повинен відповідати мед для вільного пересування в межах внутрішнього ринку ЄС, встановлені Директивою Ради 2001/110/ЄС відносно меду. У ній з урахуванням внесених змін до неї установлюються визначення щодо різних видів меду. Затверджені загальні правила щодо його складу, а також визначена основна інформація щодо маркування, щоб гарантувати вільний рух меду у межах країн ЄС, та щоб споживач не був введений в оману щодо якості продукту. У цій директиві також визначені інтереси споживача, які стосуються географічних характеристик меду [4].

Відповідно до стандартів ЄС, контроль якості та безпечності меду, окрім органолептичних та фізико-хімічних показників, передбачає також визначення гранично допустимих залишків антибіотиків, сульфаніламідних препаратів, пестицидів, важких металів, радіонуклідів.

Антибіотики - це речовини, що виробляються рослинами, тваринами і особливо мікроорганізмами (бактеріями, променистими грибами, дріжджами і плесенями) для боротьби з іншими конкурентними видами живих істот. Зараз виявлені сотні антибіотичних речовин, з яких лише дуже небагато знайшли практичне застосування в медицині, ветеринарії та тваринництві. В даний час особливо широко застосовують пеніцилін, біоміцин, тераміцин, тетрациклін і стрептоміцин.

Антибіотики, які зустрічаються в харчових продуктах, можуть мати наступне походження:

- 1) природні;
- 2) утворюються в результаті виробництва харчових продуктів;
- 3) знаходяться в продуктах в результаті лікувально-профілактичних і ветеринарних заходів;
- 4) присутні в продуктах за рахунок застосування їх в якості біостимуляторів;
- 5) використовувані як консервуючі речовини.

У бджільництві антибіотики використовують у двох напрямках. По-перше, великі лікувальні дози, розраховані на знищення мікроорганізмів - збудників захворювань, застосовуються для лікування сімей, хворих нозематозом або гнильцями. По-друге, малі дози (значно менше лікувальних) дають здоровим бджолиним сім'ям для збільшення їхньої продуктивності.

Антибіотики хінолонового ряду - еноксацин (ЕНО), данофлораксацин (ДАНО), ломефлораксацин (ЛОМЕ), енофлораксацин (ЕНОР), діфлораксацин (ДІ), оксолінова кислота (ВКБ) і хлорамфенікол (ХЛФ) часто

використовуються у ветеринарії і тваринництві, тому залишкові їх кількості можуть зустрічатися в харчових продуктах тваринного походження [5]. Вживання в їжу меду, що містить залишкові кількості цих антибіотиків, негативно позначається на організмі людини, у зв'язку з цим їх вміст нормується. Максимально допустимі рівні залишків фторхінолонів діфлораксацину, данофлораксацину, оксолінової кислоти в меді натуральному квітковому не повинні перевищувати 0,05 -0,1 мг/кг. В Україні відсутні нормативні документи з одночасного кількісного визначення залишків хінолонів і хлорамфеніколу в меді натуральному квітковому.

Сучасні методи аналізу дозволяють виявити практично всі забруднюючі мед речовини. Наразі існують три найпоширеніших методи тестування меду на наявність в ньому антибіотиків та інших заборонених залишків ветпрепаратів. Це –тестування меду:

- за допомогою радіоімунного лічильника Charm II;
- методом твердофазного імуноферментного аналізу;
- залишкові кількості заборонених речовин визначають також рідинною хроматографією високого тиску (ВЕРХ-УФ) та хромато-масс-спектрометрією (ГХ-МС);
- для виявлення у пилку генетично модифікованих організмів використовують полімеразну ланцюгову реакцію.

Кожний з перерахованих методів аналізу меду має свої переваги та недоліки. ВЕРХ-УФ та ГХ-МС передбачають використання дорогого устаткування та потребують висококваліфікованого обслуговування. За допомогою радіоімунного лічильника Charm II можна зробити тільки якісний аналіз, до того ж, досить часто CharmII видає хибно позитивні результати досліджень меду на антибіотики. Використання імуноферментних тест-систем дає можливість з високою чутливістю не тільки якісно, але й кількісно визначити залишкові кількості антибіотиків в меді, проте проведення тестування за допомогою даного методу потребує найбільше часу.

Розробка ефективних методів для визначення залишкових кількостей антибіотиків є актуальним завданням. В даний час існує вже велика кількість доступних способів контролю залишкових кількостей антибіотиків у харчових продуктах [7]. Однак ці методи тривалі й вимагають на стадії пробопідготовки великих обсягів токсичних органічних розчинників для екстракції і концентрування хінолонів [6].

Запропоновано спосіб одночасного визначення 6 антибіотиків хінолонового ряду і хлорамфеніколу в меді натуральному квітковому методом ВЕРХ з діодноматричним детектуванням: енофлораксацина, данофлораксацина, ломефлораксацина, діфлораксацина, оксолінової кислоти і хлорамфеніколу з використанням спрощеної, швидкої і безпечної пробопідготовки QuEChERS. Межі виявлення антибіотиків при масі наважки 5 г склали 0,002-0,04 мг/кг. Відносне стандартне відхилення результатів аналізу не перевищує 0,09. Тривалість аналізу становить близько 1 години.

У роботі використовується рідинний хроматограф з діодноматричним детектором Flexar DAD (Perkin-Elmer, США). Розділення проводили на колонці (150 × 3,9 мм) XTerra™ RP₁₈ (3 мкм) (Waters, США) в режимі градієнтного елюювання рухомої фази.

В даний час для швидкого вилучення пестицидів і очищення екстрактів застосовують спосіб дисперсної твердофазної екстракції QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe - швидкий, простий, дешевий, ефективний, точний і надійний) [7]. Екстракцію цільових компонентів проводять ацетонітрилом в присутності буферних солей. Очищення екстрактів від ліпідів, жирів і білків здійснюють насипними сорбентами Bondesil-PSA, C₁₈ графітованої сажею, іонообмінними смолами та їх комбінаціями.

В роботі цей прийом застосовується для вилучення залишкових кількостей антибіотиків в меді, а також в інших харчових продуктах і очищення їх екстрактів. Вибір співвідношення сульфату магнію, адсорбентів Bondesil-PSA і C₁₈ здійснювали за максимальним значенням ступенів вилучення хінолонів та ХЛФ з реальних об'єктів, і вони склали на 5 г проби: сульфату магнію - 0,9 г, Bondesil-PSA і C₁₈ по 0,15 м.

Градувальні характеристики лінійні в діапазоні 0,05-10 мкг/мл ($R^2 \geq 0,99$) для кожного антибіотика. Межі визначення антибіотиків у пробах з урахуванням навішування і концентрування екстракту варіюються від 0,008 до 0,12 мг / кг. Відносне стандартне відхилення результатів аналізу не перевищує 0,09. У більшості проаналізованих зразків меду встановлено перевищення залишкових кількостей фторхінолонів. Ступінь вилучення залежно від матриці коливається від 62 до 100%.

Огляд методики одночасного визначення залишкових кількостей антибіотиків хінолонового ряду і хлорамфеніколу у меді натуральному квітковому методом ВЕРХ-ДМД показав її ефективність, доступність, безпечність прийому пробопідготовки QuEChERS та високу точність при аналізі реальних об'єктів. Дана методика може бути використана для виявлення залишкових кількостей антибіотиків у меді натуральному квітковому.

Список використаних джерел

1. Директива Ради 2001/110 ЄС від 20 грудня 2001. Official Journal of the European Communities від 12.1.2002, L 10/47-52[Електронний ресурс]. –Режим доступу:http://www.swap-rural.org.ua/files/ua/food_safety/council_directive_2001_110.pdf
2. Гробов О. Ф., Клочко Р. Т. Критерии оценки меда и продуктов пчеловодства –требования ВТО/ О. Ф. Гробов, Р. Т. Клочко[Електронний ресурс]. –Режим доступу: <http://www.rnsp.info/UserFiles/user/164.pdf>
3. Каганець О. Оцінка меду за міжнародними та національними критеріями / О. Каганець[Електронний ресурс]. –Режим доступу: http://www.nbu.gov.ua/portal/chem_biol/Piapk/2010_1/10odkinc.pdf
4. Мед натуральний. Технічні умови: ДСТУ 4497-2005. К.: Держспоживстандарт України, 2005. –36с. – (Національний стандарт України).
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М. : Новая волна. 2005. С. 842–850.
6. Gigosos P.G., Revesado P.R., Cadahia O. et. al. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection // J. Chromatogr. A. 2000. V. 871. P. 31 -36.

7. Pecorelli I., Galarini R., Bibi R. et. al. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 483. P. 81-89.