

## **ОЦІНКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ СУЛЬФАНІЛАМІДІВ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ СКРИНІНГОВИХ ВИПРОБУВАНЬ**

*Д. В. Янович, Г. Л. Мисько*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

*У статті висвітлено питання щодо придатності скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей сульфаніламідів (сульфагуанідину, сульфадіазину, сульфатіазолу, сульфамеразину, сульфаметазину, сульфаметоксипіридазину, сульфаметоксазолу, сульфадиметоксину, сульфахлорпіразину) у меді. Зроблено висновки про відповідність даного методу до вимог європейського законодавства: Рішення Євро комісії (2002/657/ЄС) та Рекомендації референс-лабораторій Євросоюзу (CRLs) в галузі контролю залишкових кількостей 20/1/2010 щодо оцінки придатності аналітичних методів та інтерпретації отриманих результатів.*

Потенціальні можливості галузі промислового бджільництва України визначають її місце в першій десятці найбільших світових виробників меду. Зростання попиту Європейського ринку на екологічно чисті продукти харчування, та високий, порівняно з вітчизняним, рівень їх цін, створює привабливу ситуацію для вітчизняних виробників меду. Об'єм експорту меду з України невідмінно зростає. На кінець 2013 року цей показник становив приблизно 22 % від 75 тис. тонн меду, виробленого в Україні протягом року. Не зважаючи на десятикратне збільшення об'єму експорту меду протягом 2003–2013 років, Україна займала лише 23 місце в світі за цим показником. Динаміка експорту меду з України показує щорічне зростання його об'єму майже вдвічі. Можливість України збільшувати експорт меду підтверджується повним вичерпанням безмитних квот на цей продукт у третьому кварталі 2014 року. Так, станом на січень 2014 року об'єм експорту українського меду склав 27,2 тис. тонн. Найбільшими споживачами українського меду серед країн ЄС є Німеччина (45% експорту) та Польща (21% експорту). Об'єм експорту до США складає приблизно 12%. За прогнозами, на кінець 2014 року за рівнем експорту меду до країн ЄС, Україна посяде шосте місце в світі.

Основною перешкодою на шляху збільшення експорту українського меду до країн ЄС, є невідповідність показників безпеки нашого меду вимогам країн імпортерів. Щорічні звіти RASFF показують, що проблема забруднення меду залишковими кількостями антимікробних препаратів надалі залишається актуальною. Серед виявлених забруднень меду, такі залишки ветеринарних препаратів, як сульфаніламідів[4], займають перші позиції. Відсутність у вищезгаданій звітності випадків виявлення забруднень меду показує більшу ефективність системи державного експортного контролю, ніж стан проблеми забруднення меду в цілому. У вітчизняному меді за останніми даними, найчастіше виявляють залишки таких груп антибіотиків та антимікробних препаратів, як хлорамфенікол, нітрофуран, нітроїмідазол, сульфаніламідів, тетрацикліни та аміноглікозиди.

В Україні не зареєстровано жодного препарату для лікування бджіл, який містить вищезгадані діючі речовини, оскільки їхнє використання заборонене, як в європейському, так і в українському бджільництві. Тому, виявлення залишків згаданих речовин у меді, є наслідком несанкціонованого застосування бджолярами контрабандних препаратів або медичних препаратів доступних у роздрібних аптеках гуманної медицини.

Із вищенаведеного переліку залишків антимікробних препаратів, сульфаніламідів заслуговують на особливу увагу, що пов'язано з їх розповсюдженістю в гуманній та ветеринарній медицині та наявністю великої кількості сполук, що належать до цієї групи.

У країнах ЄС допустимий вміст залишкових кількостей сульфаніламідів у продуктах тваринництва регламентовано максимально допустимими рівнями (МДР). Вони встановлюються згідно з вимогами до чутливості методів контролю сульфаніламідів у вищезгаданих продуктах тваринного походження.

Тому актуальним питанням залишається розробка та впровадження скринінг-методів визначення залишкових кількостей сульфаніламідів у меді.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили в лабораторії інструментальних методів контролю ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Визначення залишкових кількостей сульфаніламідів проводили методом імуноферментного аналізу ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) з використанням тест-систем Рідаскрин “Сульфаніламідів” Art. №:R3004 Lot 14402 фірми R-Biopharm (Німеччина). Для підготовки зразків та проведення аналізу використовували ацетонітрил (Lab-Scan) та етилацетат (Merck).

Матеріалом дослідження були зразки меду, додатково перевірені з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії на відсутність у них цільового аналіту. Збагачення контрольних зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводили стандартними розчинами. В роботі використовували сертифіковані субстанції сульфаніламідів: сульфагуанідину (SGD), сульфадіазину (SDZ), сульфатіазолу (STZ), сульфамеразину (SMR), сульфаметазину (SMZ), сульфаметоксипіридазину (SMP), сульфаметоксазолу (SMX), сульфадиметоксину (SDM) та сульфаклорпіразину (SCP), одержаних від фірми Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). Основні стандартні розчини з концентрацією 1 мг/мл вказаних сульфаніламідів готувались шляхом розчинення в ацетонітрилі окремо кожного сульфаніламідів. Робочі стандартні розчини кожного сульфаніламідів та комплексний стандартний розчин усіх дев'яти сульфаніламідів готувались шляхом двостадійного розведення основних стандартних розчинів: в першій стадії ацетонітрилом (до концентрації 10 мкг/мл), а в другій (до концентрації 50 нг/мл) 0,1 н розчином HCl.

**Результати й обговорення.** Регламентуючі документи Державного департаменту ветеринарної медицини України встановили вимоги щодо межі чутливості методик визначення сульфаніламідів у меді, на рівні меншому ніж 7 мкг/кг для всіх представників групи, за винятком сульфатіазолу, для якого межа виявлення має бути не вищою 3 мкг/кг.

З урахуванням вищезазначених вимог, у ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок у 2006 році була розроблена методика одночасного групового визначення 9 сульфаніламідів у меді з використанням ВЕРХ/ФЛД [2]. Після затвердження розробленої методики Науково-технічною радою Державного департаменту ветеринарної медицини України, її впровадили в багатьох лабораторіях ветеринарної медицини України. За результатами моніторингових досліджень експортних зразків меду проведених у 2006-2013 рр. лабораторією інструментальних методів контролю було виявлено, що найбільш розповсюдженими забруднювачами меду в Україні серед сульфаніламідів були сульфатіазол та сульфадіазину.

Подальше вдосконалення розробленої методики було спрямовано на внесення змін у порядок пробопідготовки зразків меду. Одночасно проводились роботи з адаптації розроблених умов пробопідготовки зразків меду для подальшого скринінгового аналізу імуноферментним методом ELISA (гетерогенний твердофазний конкурентний аналіз). З'ясувалось, що методи пробопідготовки зразків меду, викладені в інструкціях до комерційних тест-систем, не завжди забезпечують потрібний поріг чутливості для аналізованої групи сульфаніламідів. Оскільки, у деяких тест-наборах специфічність антитіл до сульфадіазину — 75%, а до сульфатіазолу може складати менше 50% від потрібного

рівня, нашу увагу ми зосредили на вивченні валідаційних параметрів методики власне для сульфатіазолу.

Оцінка придатності розробленої нами модифікації методики проводилась відповідно до критеріїв зазначених у Рішенні Єврокомісії (2002/657/EC)[3] від 12 серпня 2002, щодо виконання аналітичних методів та інтерпретації їх результатів, та відповідно до рекомендацій референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010 щодо оцінки придатності скринінгових методів за проведення визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів.

Розроблені нами умови пробопідготовки зразків меду дозволяють збільшити чутливість методики за рахунок більш високого ступеня екстрагування сульфатіазолу, що дозволяє наблизитись до встановленої регуляторної межі визначення сульфатіазолу 3 мкг/кг.

За розгляду питання оцінки придатності методики були вивчені такі основні поняття:

— правильність (точність, надійність) — відповідність між результатами випробування і загальноприйнятим еталонним значенням;

— специфічність — здатність методу відрізнити аналіт, який визначається від інших субстанцій;

— межа відсікання — межа відповіді або сигналу, одержаного при застосуванні методу, що вказує на наявність у зразку аналіту на рівні цільвої концентрації або вище;

— робастність — здатність аналітичної методики не зазнавати впливу малих контрольованих аналітиком змінв умовах виконання методики.

Для проведення валідації даної скринінг-методики було досліджено 20 зразків матриці (контрольного чистого меду) та 20 збагачених зразків стандартним розчином сульфатіазолу на рівні 3,0 мкг/кг. Підготовку підготовлених зразків виконували за нової розробленою методикою, а дослідження згідно з інструкцією до тест-системи, наданої фірмою-виробником. Аналіз проводили у різні дні, з урахуванням можливих змін експлуатаційного режиму, що мають безпосередній вплив на виконання даних досліджень. Статистичну обробку результатів проводили програмним забезпеченням Statistica 6.0.

У таблиці представлені результати, отримані в процесі валідації скринінг-методу.

*Таблиця*

**Результати аналізу контрольних та збагачених сульфатіазолом зразків меду**

Назва зразка	Концентрація аналіту мкг/кг		Витяг, %
	додано	отримано	
Контрольний зразок меду	-	0,91±0,12	-
Збагачений зразок меду	3	2,76±0,23	91,88

Для подальшого використання даної методики необхідно провести обрахунок технічного порогу та межі відсікання з допомогою графічного подання здатності виявлення ССВ. Обчислення проводили згідно з Методичними вказівками з оцінки придатності методик імуноферментного аналізу для скринінгового визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднювачів у харчовій сировині тваринного походження [1].

На рисунку зображено графічне подання технічного порогу та межі відсікання у методиці.

Технічний поріг методики, що розраховується як найвище значення межі відповіді контрольного зразка з урахуванням похибки вимірювання для досліджуваної матриці, становить 1,17 мкг/кг.

Межа відсікання вказує, що проба містить аналіт у концентрації, що дорівнює цільовій концентрації скринінгу або перевищує її. В результаті досліджень нами було встановлено межу відсікання на рівні 2,48 мкг/кг.

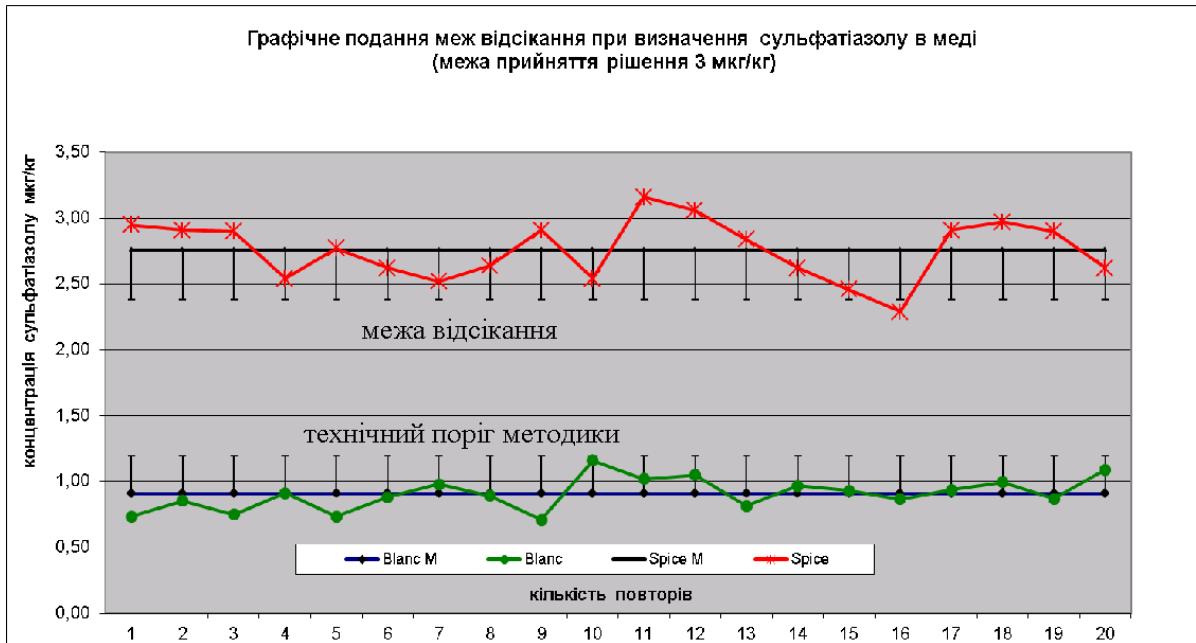


Рис. Графічне зображення технічного порогу та межі відсікання у методиці

Якщо межу відсікання перевищено, далі необхідно здійснити підтверджуюче дослідження вмісту сульфатіазолу методом вискоєфективної рідинної хроматографії з флуорометричним детектуванням (ВЕРХ/ФЛД).

Отже, згідно з отриманими результатами, скринінг-метод по визначенню залишкових кількостей сульфатіазолу відповідає вимогам Рішення ЄС 2002/657 за наступними параметрами: правильність (точність, надійність), специфічність і робастність і може бути рекомендованою для роботи у виробничих лабораторіях фірм-експортерів меду.

## В И С Н О В К И

1. Проведено валідацію скринінг-методику ІФА для визначення залишкових кількостей сульфаніламідів у зразках меду.

2. Встановлено відповідність валідаційних параметрів розробленої методики: правильність (точність, надійність), специфічність і робастність згідно до вимог Рішення ЄС 2002/657. Підтверджено придатність її застосування для скринінгових цілей.

3. Показано збільшення рівня витягу сульфатіазолу в 2,1 рази.

**Перспективи подальших досліджень.** В наступному буде проводитись впровадження запропонованої скринінг-методику у виробничих лабораторіях фірм-експортерів меду.

## FITNESS ASSESSMENT METHOD FOR DETERMINATION OF RESIDUES SULFONAMIDES SCREENING TEST

*D. Yanovych, G. Mysko*

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives

### S U M M A R Y

The article highlights the issue of suitability screening ELISA method for the determination of residual amounts of sulfonamides (sulfaguanidine, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine,

sulfamethazine, sulfamethoxyipyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfahloropyrazine) in honey. The conclusions of this method of compliance with EU: European Commission Decision (2002/657 / EC) and the Recommendations of the EU reference laboratories (CRLs) in the control of residual amounts of 01.20.2010 on the assessment of the suitability of analytical methods and the interpretation of the results.

## **ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СКРИНИНГОВЫХ ИСПЫТАНИЙ**

*Д. В. Янович, Г. Л. Мысько*

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных  
препаратов и кормовых добавок

### **А Н Н О Т А Ц И Я**

В статье освещены вопросы пригодности скрининг-метода иммуноферментного анализа для определения остаточных количеств сульфаниламидов (сульфагуанидина, сульфадиазина, сульфатиазола, сульфамеразина, сульфаметазина, сульфаметоксипиридазина, сульфаметоксазола, сульфадиметоксина, сульфаклорпиразина) в меде. Сделаны выводы о соответствии данного метода требованиям европейского законодательства: Решение Еврокомиссии (2002/657/ЕС) и Рекомендаций референс-лабораторий Евросоюза (CRLs) в области контроля остаточных количеств 20/1/2010 по оценке пригодности аналитических методов и интерпретации полученных результатов.

### **Л І Т Е Р А Т У Р А**

1. *Свежова Н. В.* Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. I. Теоретические основы / Н. В. Свежова, В. Е. Шаркова, Д. Б. Громов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 1. — С. 3–9.
2. *Янович Д., Коробова О., Мелікян С.* Методичні вказівки кількісного визначення в меді залишкових кількостей сульфаниламідів із застосуванням методу вискоєфективної рідинної хроматографії із флюорометричним детектуванням (ВЕРХ/ФЛД) // Затверджено наказом № 98 — 15.12.2006.
3. Commission Decision 2002/657 of August 2002 Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC).
4. *Mutinelli F.* European legislation governing the authorisation of veterinary medical products with particular reference to the use of drug for the control of honey bee diseases // *Apiacta*. — 2003. — 168. — P. 156.