

УДК 577.18:637.14.04/07:543.544.943.3

Студ. В.В. Рымашевская
Науч. рук. доц. О.В. Стасевич
(кафедра физико-химических методов сертификации продукции, БГТУ)

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ

Антибиотики – вещества природного или полусинтетического происхождения, которые попадают в продовольственное сырье, в том числе молоко, в результате нарушения правил доения сельскохозяйственных животных в период их лечения. В соответствии с нормативными документами содержание антибиотиков в молоке не допускается, в связи с тем, что их систематическое поступление в организм человека с пищей может вызвать различные аллергические реакции, нарушение обмена веществ, изменить микрофлору кишечника и т.д. Для исключения попадания остатков ветеринарных препаратов в продукцию необходимо применение входного контроля поступающего сырья. В производственных условиях наиболее удобно использовать экспресс-методы контроля, которые должны быть валидированы, т. е. обеспечивать достоверные результаты.

Целью данного исследования является валидация методик качественного определения антибиотиков в сухом молоке при помощи иммуноферментного анализа (ИМФ) в соответствии с [1] и методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Объектом исследования было выбрано сухое молоко («Беллакт», Республика Беларусь). Предметом экспериментального исследования были выбраны наиболее часто обнаруживаемые в молоке антибиотики β -лактамовой, тетрациклиновой групп, пенициллин (ПН) и тетрациклин (ТН) соответственно, а также стрептомицин (СН) и хлорамфеникол (ХЛ). При проведении валидации методик были рассчитаны и проанализированы на соответствие критериям приемлемости два параметра: специфичность и предел обнаружения.

При валидации методики определения антибиотиков ИМФ анализом использовали тест-наборы «4SENSOR» KIT 060 (Бельгия), представляющие собой микролунку, содержащую рецепторы и анти-тела и тест-полоску со специфичными линиями связывания.

Для оценки специфичности валидируемого метода, т.е. подтверждения способности аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов, было приготовлено и проанализировано десять образцов молока (холостая проба), не содержащих антибиотики и десять образцов молока, содержащих 4 мкг/дм³ ПН, 20 мкг/дм³ ТН, 200 мкг/дм³ СН, а

также 10 мкг/дм³ ХЛ. Критерием приемлемости являлось следующее условие – при анализе молока с внесенными антибиотиками на тест-полосках должны отсутствовать соответствующие специфичные линии связывания или иметь интенсивность окраски ниже, чем у контрольной линии, а при анализе холостой пробы на тест-полосках должны присутствовать все специфичные линии связывания, при этом их интенсивность должна быть выше, чем у контрольной линии. В результате проведенных исследований было выявлено, что на тест-полосках молока с антибиотиками отсутствовали специфичные линии определяемых соединений, а на тест-полоске холостого раствора специфичные линии присутствовали. Таким образом, критерии приемлемости для специфичности выполнялись.

Валидация предела обнаружения представляет собой подтверждение способности методики выявлять определяемые компоненты в минимальных концентрациях, входящих в интервал предела обнаружения, заявленного в методике. Было приготовлено и проанализировано десять образцов молока (холостая проба), не содержащих антибиотики и десять образцов молока, содержащих антибиотики в концентрациях, входящих в диапазон обнаружения, в соответствии с [1]: 2, 3 мкг/дм³ ПН, 8, 9, 10 мкг/дм³ ТН; 150, 160, 200 мкг/дм³ СН, а также 0,3 мкг/дм³ ХЛ. Критерий приемлемости заключается в том, что при анализе образцов молока с антибиотиками в концентрации, входящей в диапазон обнаружения, на тест-полосках должны отсутствовать соответствующие им специфичные линии связывания во всех проверенных образцах. Было установлено, что данным методом были обнаружены антибиотики в следующих концентрациях: 3 мкг/дм³ ПН, 8 мкг/дм³ ТН, 200 мкг/дм³ СН, а также 0,3 мкг/дм³ ХЛ. Таким образом, критерий приемлемости выполнялся.

В качестве альтернативного метода определения антибиотиков в молоке была разработана и валидирована методика качественного определения количеств ТН и ХЛ в молоке с помощью ТСХ.

В качестве неподвижной фазы служили силикагелевые пластины Kieselgel 60 F254 (Merck, США). Пробы наносили в объеме 5 мкл. Детектирование веществ на пластинах осуществляли визуально при облучении УФ-светом при 254 нм. Идентификацию антибиотиков осуществляли путем сравнения окраски пятна и показателя R_f в соответствующей элюирующей системе с окраской и показателем стандартного образца соответствующего антибиотика.

Перед определением валидационных характеристик были проведены исследования по подбору состава элюирующей системы. Ре-

зультаты подбора элюирующей системы и R_f значения для ТН и ХЛ в различных условиях представлены в таблице.

Таблица – Значения R_f для ТН и ХЛ в различных элюирующих системах

Соотношение растворителей, % об.	R_f ХЛ	R_f ТН
А. хлороформ : этанол (10:1)	0,54	0,07
Б. хлороформ : этанол (9:2)	0,63	0,20
В. хлороформ : этанол (8:3)	0,88	0,05
Г. хлороформ : этанол (8,5:2,5)	0,79	0
Д. хлороформ : этанол : муравьиная кислота (9:2:0,5)	0,77	0,06
Е. хлороформ : этанол : муравьиная кислота : вода (9:2:0,5:0,5)	0,79	0
Ж. ацетонитрил : этанол : р-р щавелевой кислоты (63 мг/мл) в воде с рН=2	1	0,72

Как видно из таблицы, в системах А, Г, Д и Е тетрациклин поднимался незначительно от линии старта, а в системе Ж – происходило забрасывание ХЛ к линии фронта. Таким образом, оптимальной системой для проведения ТСХ анализа образцов, содержащих ТН и ХЛ, являлась смесь Б.

Для оценки специфичности данной методики были приготовлены растворы с 20 мкг ТН, 10 мкг ХЛ, а также образец молока с данными антибиотиками в соответствующей концентрации. Критерий приемлемости заключался в том, что пятна ТН и ХЛ должны обнаруживаться как в пробе с молоком, так и в пробах, содержащих стандартные растворы антибиотиков. Для оценки предела обнаружения антибиотиков в молоке методом ТСХ была установлена минимальная концентрация их определения: 2 мкг (ТН) и 0,3 мкг (ХЛ). Критерий приемлемости был аналогичным как и для метода ИМФ и выполнялся.

Таким образом, была осуществлена валидация методики качественного определения антибиотиков в сухом молоке по таким характеристикам как специфичность и предел обнаружения методами ИМФ и ТСХ, следовательно они могут быть использованы для обнаружения антибиотиков в молоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по качественному экспресс определению количеств бета-лактамовых, тетрациклиновых групп, стрептомицина и хлорамфеникола в молоке с использованием тест-набора «4SENSOR» KIT 060