

УДК 637.072

А. Н. Никитенко¹, Н. В. Карницкая², В. А. Клапкова²¹Белорусский государственный технологический университет²Институт мясо-молочной промышленности**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
БЕТА-АДРЕНОСТИМУЛЯТОРОВ В МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

В статье представлены результаты разработки методики определения содержания бета-адреностимуляторов в продукции животноводства. В ней проанализирован вопрос использования гормональных препаратов в кормах сельскохозяйственных животных, существующие угрозы и опасности для здоровья человека. Определены максимально допустимые уровни содержания остатков кленбутерола и рактопamina в пищевых продуктах животного происхождения. Охарактеризованы существующие способы определения содержания бета-адреностимуляторов физико-химическими и химико-биологическими методами. Объектами исследования являлись говядина мороженая кусковая, печень говяжья и молоко. В исследуемых образцах определено содержание кленбутерола и рактопamina методом иммуноферментного анализа. На основе полученных данных установлены основные метрологические характеристики определения содержания в продукции животноводства кленбутерола – диапазон определяемых концентраций от 0,02 до 2000,00 нг/кг, относительное стандартное отклонение повторяемости 0,8% (мясо), 0,7% (молоко), относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности 1,0% (мясо), 0,9% (молоко); рактопamina – диапазон определяемых концентраций от 0,02 до 8100,00 нг/кг, относительное стандартное отклонение повторяемости 0,3% (мясо), 0,4% (печень говяжья), относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности 0,8% (мясо) и 0,9% (печень говяжья). Расширенная стандартная неопределенность измерений содержания кленбутерола и рактопamina не превысила 1%. Полученные результаты будут использованы для разработки методики определения содержания бета-адреностимуляторов иммуноферментным методом при контроле качества и безопасности продукции животноводства, предназначенной для питания людей.

Ключевые слова: рактопамин, кленбутерол, бета-адреностимулятор, иммуноферментный метод, повторяемость, прецизионность.

A. N. Nikitenko¹, N. V. Karnickaya², V. A. Klapkova²¹Belarusian State Technological University²Institute of Meat and Dairy Industry**DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION
OF BETA-AGONISTS CONTENT IN MEAT AND DAIRY PRODUCTS
BY ENZYME IMMUNOASSAY**

The article presents the results of the development of methods for determining the content of beta-agonists in livestock products. The paper analyzes the issue of the use of hormones in the feed for farm animals, existing threats and risks to human health, determines the maximum allowable levels of clenbuterol residues and ractopamine in the animal products, describes the existing methods for determining the content of beta-agonists physical-chemical and chemical-biological methods. The objects of investigation were frozen beef slabs, beef liver, milk. The content of ractopamine and clenbuterol in the samples was determined by ELISA method. Based on the data basic the metrological characteristics of the determination of clenbuterol in animal products were established – the detectable concentration range from 0.04 to 2000 ng/kg, the relative standard deviation of repeatability 0.8% (meat), 0.7% (milk), the relative standard deviation of intermediate precision of 1.0% (meat), 0.9% (milk), and ractopamine – detectable concentration range from 0.02 to 8100 ng/kg, the relative standard deviation of repeatability 0.3% (meat), 0.4% (beef liver), the relative standard deviation of the intermediate precision of 0.8% (meat) and 0.9% (beef liver). Extended standard uncertainty measurements of clenbuterol and ractopamine did not exceed 1%. The results will be used to develop the methods for determining the content of beta-agonists by ELISA quality control and safety of animal products for human consumption.

Key words: ractopamine, clenbuterol, beta-agonists, enzyme immunoassay method, repeatability, precision.

Введение. Одним из международных широко обсуждаемых вопросов обеспечения безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов является применение в животноводстве гормональных препаратов, в том числе бета-адреномиметиков. Данная группа препаратов стимулирует рост, вызывает снижение массы жировой ткани и гипертрофию мышечных волокон, что в конечном итоге приводит к получению постного мясного сырья. Особое внимание уделяется применению рактопамина и кленбутерола, обладающих избирательным действием к бета-адренорецепторам [1, 2].

Рактопамин с 1999 г. утвержден Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов США, с 2003 г. Агентством по инспекции пищевых продуктов Канады в качестве кормовой добавки для промышленного животноводства крупного рогатого скота, а в 2005 г. — для промышленного свиноводства, поскольку увеличивает прирост массы тела на 10% и снижает потребность в кормах на 6%. Использование стимуляторов роста разрешено в 24 странах, включая США, Канаду, Австралию, Новую Зеландию, Бразилию, но запрещено в 160 странах, среди которых Евросоюз, Китай, Россия. Директива Евросоюза 96/22/ЕС содержит общий запрет на использование агонистов бета-адреномиметиков [3]. В Китае за последние 10 лет зарегистрировано 17 случаев отравления продуктами, содержащими бета-адреностимуляторы, в результате которых пострадало более 1000 человек [4]. В Россию с 7 декабря 2012 г. запрещен импорт мясных продуктов, содержащих остаточные количества бета-адреномиметиков, а лекарственные препараты на их основе не включены в «Реестр лекарственных средств и кормовых добавок, зарегистрированных к применению на территории Российской Федерации» [1]. В Республике Беларусь действует постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия от 16 декабря 2005 г. № 78, согласно которому продукты, поставляемые в другие страны, должны быть полностью свободны от остатков бета-адреностимуляторов [5].

Побочными эффектами применения бета-адреномиметиков для человека являются: тахикардия, мышечный тремор, гипокалемиа, тахифилаксия, чувство беспокойства, головные боли, повышение артериального давления и т. д. Все это делает особенно опасным потребление мяса, содержащего остатки бета-адреностимуляторов людьми, страдающими сердечно-сосудистыми заболеваниями [6].

Объединенная программа ФАО/ВОЗ установила максимально допустимый уровень рактопамина 0,1 мкг/кг для мяса свиней и крупно-

го рогатого скота; 0,04 мг/кг для печени свиней и крупного рогатого скота и 0,09 мг/кг для почек свиней и крупного рогатого скота [7].

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что для определения бета-адреностимуляторов в продуктах применяют: ионно-обменную, газовую, иммуно-аффинную, высокоэффективную жидкостную хроматографии [5, 8–9]. Однако высокая стоимость проведения исследований и обслуживания оборудования, трудоемкость и длительность пробоподготовки ограничивает широкое применение данных методов. Кроме того, известный радиоиммунологический метод определения гормонов имеет недостатки: ограниченный срок жизни радиоактивной метки, высокая вероятность загрязнения окружающей среды [8]. Согласно имеющимся в научной литературе сведениям, иммуноферментный метод обладает высокой скоростью постановки анализа и простотой регистрации данных [9], поэтому наиболее перспективным является применение данного метода.

Основная часть. Цель данной работы — разработка методики измерения содержания бета-адреностимуляторов (кленбутерола и рактопамина) в мясной и молочной продукции методом иммуноферментного анализа. Объекты исследования — говядина мороженая кусковая, печень говяжья, молоко.

Для испытаний использовали фотометр микропланшетный EL×800. Схема измерения содержания бета-адреностимуляторов представлена на рисунке. Для оценки характеристик методики определяли повторяемость и промежуточную прецизионность. Близость между результатами исследований, полученных в условиях повторяемости (одна и та же лаборатория, один испытатель, одно и то же оборудование и реагенты, испытания в течение короткого промежутка времени) оценивали по СТБ ИСО 5725-2 п. 7, СТБ ИСО 5725-3 п. 8.2, СТБ ИСО 5725-4 п. 5 [10–12]. Оценка показателей промежуточной прецизионности проводилась в соответствии с СТБ ИСО 5725-6-2002 [13].

Результаты оценки характеристик методики и исследований содержания кленбутерола и рактопамина иммуноферментным методом представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1
Содержание бета-адреностимуляторов

Гормон	Продукция	Содержание, нг/кг	МДУ, мкг/кг
Кленбутерол	Мясо	0,5	0,1
	Молоко	0,2	—
Рактопамин	Мясо	0,4	0,1
	Печень	0,5	0,04

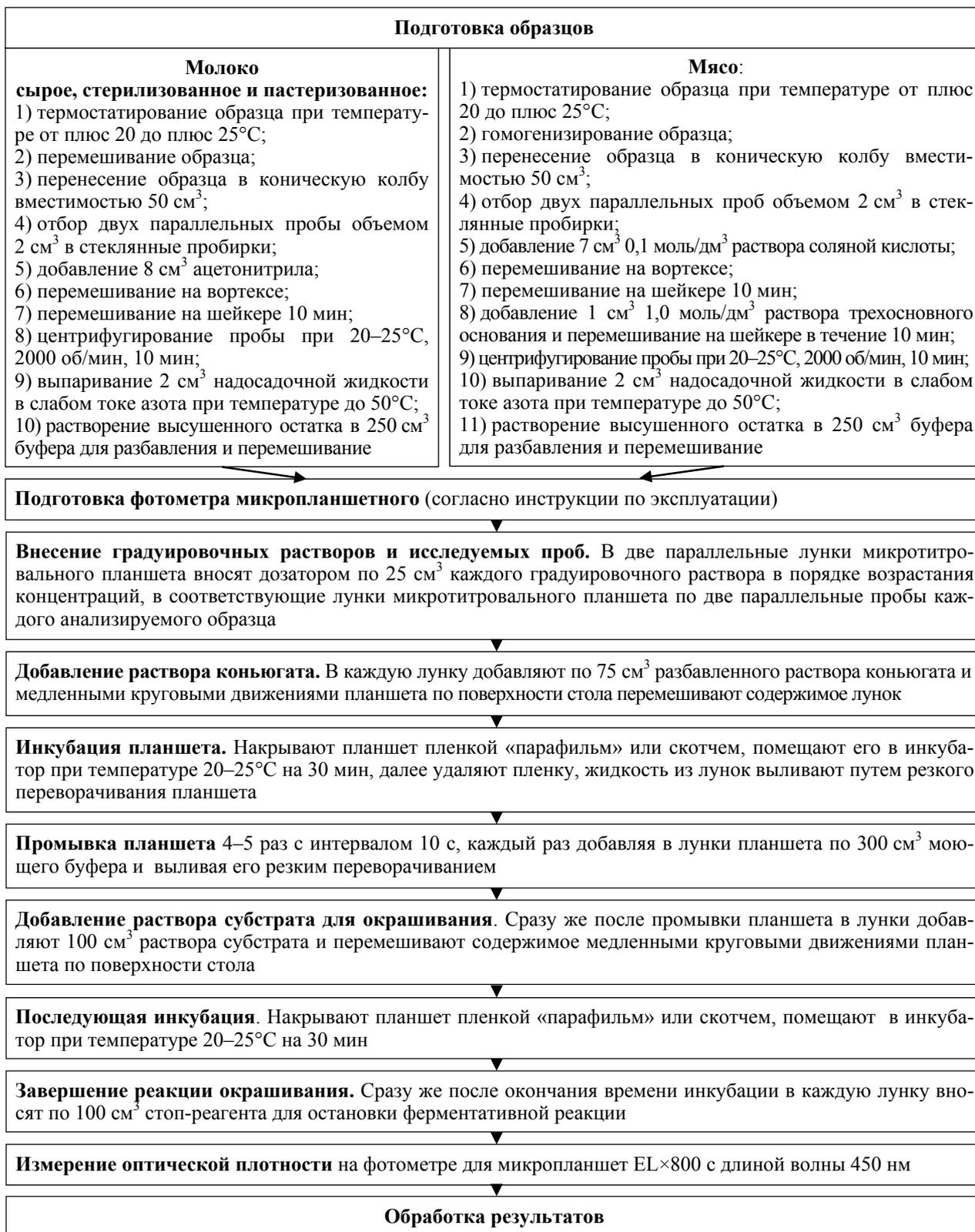


Схема измерения остатков бета-адреностимуляторов

Как видно из представленных данных в табл. 1, содержание гормонов в продуктах не превысило допустимые уровни. Согласно данным, приведенным в табл. 2, при определении содержания кленбутерола СКО повторяемости образцов го-

вядины S_r составило 0,8%, молока – 0,7%, а СКО промежуточной прецизионности говядины S_R – 1,0%, молока – 0,9%. Предел промежуточной прецизионности определения кленбутерола для говядины был 2,9%, молока – 2,6%.

Таблица 2

Основные характеристики методики определения содержания бета-адреностимуляторов

Гормон	Продукция	Диапазон измерений, нг/кг	Относительное стандартное отклонение		Стандартная неопределенность u , нг/кг	Расширенная стандартная неопределенность U , нг/кг, $K = 2, P = 95\%$
			повторяемости S_r , %	промежуточной прецизионности S_R , %		
Кленбутерол	Мясо	От 0,02 до	0,8	1,0	0,5	0,1
	Молоко	2000,00 включ.	0,7	0,9	0,5	0,1
Рактопамин	Мясо	От 0,02 до	0,3	0,8	0,2	0,6
	Печень	8100,00 включ.	0,4	0,9	0,4	1,6

Расширенная стандартная неопределенность измерений кленбутерола, рассчитанная по альтернативному методу, как для говядины, так и для молока составила 0,1 нг/кг при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Результаты определения содержания рактопамина показали, что СКО повторяемости образцов говядины кусковой S_r – 0,3%, печени – 0,4%, а СКО промежуточной прецизионности говядины S_R – 0,8%, молока – 0,9%. Расширенная стандартная неопределенность измерений рактопамина при доверительной вероятности $P = 0,95$ для говядины кусковой – 0,6 нг/кг, для молока – 1,6 нг/кг.

Заключение. Проведенные экспериментальные исследования позволили установить основ-

ные метрологические характеристики (повторяемость и промежуточную прецизионность, расширенную стандартную неопределенность) измерения бета-адреностимуляторов иммуноферментным методом. Данные статистической обработки полученных результатов легли в основу разработки методики определения содержания бета-адреномиметиков в мясной и молочной продукции методом иммуноферментного анализа с использованием фотометра микропланшетного EL×800. Эта методика может быть широко использована для контроля качества и безопасности продукции животноводства в сельском хозяйстве, в пищевой промышленности и медицине, а также в научно-исследовательских целях.

Литература

1. Данилевская Н., Дельцов А., Субботин В. К вопросу об использовании рактопамина в промышленном животноводстве // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2014. № 5. С. 12–17.
2. Smith D. J., Shappell N. W. Technical note: epimerization of ergopeptine alkaloids in organic and aqueous solvents // J. Anim. Sci. 2002. No. 80. P. 1616–1622.
3. Commission of the European Communities. 1996. Commission decision 1996/23/EC // Off. J. Eur. Commun. L125. No. 10. P. 3–15.
4. Wang P., Yang L., Wang R. Determination of β_2 -agonists in porcine urine by molecularly imprinted solid phase extraction followed ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection // Analytical Letters. 2013. No. 46. P. 734–744.
5. 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: постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 16 декабря 2005 г. № 78. Минск, 2005. 35 с.
6. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Издательство Новая Волна, 2010. 1216 с.
7. Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission / ФАО; ВОЗ. July, 2012. P. 1–40.
8. Резников А. Г. Методы определения гормонов: справ. пособие. Киев, 1980. 400 с.
9. Галкин А. В., Комаров В. И., Иванова Е. А. Иммуноферментный метод экспресс-контроля продовольственного сырья и пищевых продуктов на содержание потенциально опасных химических соединений // Хранение и переработка сельхозсырья. 1998. № 5. С. 21–24.
10. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-2-2002. Введ. 01.03.2007. Минск: Государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь: БелГИСС, 2002. 56 с.
11. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-3-2002. Введ. 01.03.2007. Минск: Государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь: БелГИСС, 2002. 30 с.
12. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-4-2002. Введ. 01.03.2007. Минск: Государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь: БелГИСС, 2002. 37 с.

13. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике: СТБ ИСО 5725-6-2002. Введ. 01.03.2007. Минск: Государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь: БелГИСС, 2002. 48 с.

References

1. Danilevskaya N., Deltsov A., Subbotin V. To a question about the use of ractopamine in animal industry. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* [Veterinary farm animals], 2014, no. 5, pp. 12–17 (in Russian).
2. Smith D. J., Shappell. N. W. Technical note: epimerization of ergopeptine alkaloids in organic and aqueous solvents. *J. Anim. Sci.*, 2002, no. 80, pp. 1616–1622.
3. Commission of the European Communities. 1996. Commission decision 1996/23/EC. *Off. J. Eur. Commun*, L125, no. 10, pp. 3–15.
4. Wang P., Yang L., Wang R. Determination of β_2 -agonists in porcine urine by molecularly imprinted solid phase extraction followed ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Analytical Letters*, 2013, no. 46, pp. 734–744.
5. Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus of December 16, 2005 no. 78 “On approval of rules to monitor the content of harmful substances and their residues in live animals and animal products while exporting them to the European Union”. Minsk, 2005. 35 p. (in Russian).
6. Mashkovskiy M. D. *Lekarstvennye sredstva* [Drugs]. Moscow, New Wave Publ., 2010. 1216 p.
7. Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission. July, 2012, pp. 1–40.
8. Reznikov A. G. *Metody opredeleniya gormonov: spravochnoe posobie* [Methods for determination of hormones. Reference manual]. Kiev, 1980. 400 p.
9. Galkin A. V., Komarov V. I., Ivanova E. A. ELISA express control of food raw materials and food products for the maintenance of potentially hazardous chemicals. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and processing of agricultural raw materials], 1998, no. 5, pp. 21–24 (in Russian).
10. STB ISO 5725-2-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Minsk, The State Committee for Standardization of Belarus, BelGISS Publ., 2002. 56 p. (in Russian).
11. STB ISO 5725-3-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Minsk, The State Committee for Standardization of Belarus, BelGISS Publ., 2002. 30 p. (in Russian).
12. STB ISO 5725-4-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 4: Basic methods for determining the correctness of a standard measurement method. Minsk, The State Committee for Standardization of Belarus, BelGISS Publ., 2002. 37 p. (in Russian).
13. STB ISO 5725-5-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 6: Use in practice of accuracy values. Minsk, The State Committee for Standardization of Belarus, BelGISS Publ., 2002. 48 p. (in Russian).

Информация об авторах

Никитенко Анастасия Николаевна – кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: dennast9@mail.ru

Карницкая Наталья Валентиновна – младший научный сотрудник. Институт мясо-молочной промышленности (220075, г. Минск, пр. Партизанский, 172, Республика Беларусь). E-mail: karnn@mail.ru

Клапкова Виктория Александровна – младший научный сотрудник. Институт мясо-молочной промышленности (220075, г. Минск, пр. Партизанский, 172, Республика Беларусь). E-mail: klapk@mail.ru

Information about the authors

Nikitenko Anastasia Nikolaevna – PhD (Engineering), Senior Lecturer, Department of Physical-Chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dennast9@mail.ru

Karnickaya Natalia Valentinovna – Junior Researcher. Institute of Meat and Dairy Industry (172, Partizansky Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: karnn@mail.ru

Klapkova Victoria Alexandrovna – Junior Researcher. Institute of Meat and Dairy Industry (172, Partizansky Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: klapk@mail.ru

Поступила 23.02.2016